



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Dipartimento di Scienze
Biomediche,
Sperimentali e Cliniche

Unità di Endocrinologia

Settore scientifico disciplinare:
MED/13

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche

CICLO XXVI

COORDINATORE:
Prof. Persio Dello Sbarba

***“RICERCA DI NUOVI TARGET
TERAPEUTICI NEL CARCINOMA
CORTICOSURRENALICO E STUDIO DEI
MECCANISMI DI AZIONE DEL
FARMACO MITOTANE”***

COORDINATORE:
Prof. Gianni Forti

TUTORE:
Prof. Massimo Mannelli

DOTTORANDO:
Dr.ssa Giada Poli

Al mio piccolo grande Amore, Ambra

Sommario

INTRODUZIONE.....	1
1. Le ghiandole surrenali.....	1
2. Il carcinoma corticosurren al ico	6
2.1. Epidemiologia	7
2.2. Presentazione clinica.....	8
2.3. Classificazione e stadiazione	9
2.4. Prognosi.....	11
2.5. Approcci terapeutici.....	12
2.6. Aspetti genetici del carcinoma corticosurren al ico.....	20
2.7. Modelli cellulari	48
2.8. Mitocondri e Cancro.....	50
2.9. Proteomica e caratterizzazione di biomarcatori tumorali	52
SCOPO DELLA TESI.....	56
MATERIALI E METODI	57
1. Casistica.....	57
2. Estrazione, purificazione e determinazione del contenuto proteico.....	58
3. DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis)	59
4. Identificazione delle proteine mediante NanoLC-nanoESI-MS/MS	60
5. SDS-PAGE	62
6. Western Blot.....	63
7. Classificazione funzionale delle proteine e analisi delle vie di segnalazione... ..	64
8. Diagnosi istologica e immun o istochimica.....	64

9.	Analisi statistica	65
10.	Materiali	66
11.	Colture cellulari	66
12.	Misurazione in hplc (high performance liquid chromatography) dei livelli intracellulari di DDD e DDE	66
13.	Valutazione della proliferazione cellulare delle H295R	67
13.1.	Saggio MTS.....	67
13.2.	Conta Cellulare.....	68
13.3.	Incorporazione di [³ H] timidina.....	68
14.	Microscopia elettronica a trasmissione e morfometria mitocondriale	69
15.	Valutazione dell'apoptosi mediante analisi citofluorimetrica con strumento muse.....	69
16.	Preparazione della frazione mitocondriale	70
17.	Analisi del consumo di ossigeno.....	70
18.	Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale	70
19.	Western Blot.....	71
20.	Analisi statistica	71
	RISULTATI.....	72
1.	Analisi proteomica mediante 2D-DIGE per l'identificazione di nuovi potenziali target terapeutici per il carcinoma corticosurrenalico	72
1.1.	Profilo proteomico differenziale tra ACC e surrene sana	72
1.2.	Analisi DIA.....	73
1.3.	Analisi BVA	74
1.4.	Analisi dei pattern	77

1.5. Classificazione funzionale delle proteine identificate e analisi delle correlazioni biologiche.....	79
1.6. Validazione delle proteine differenzialmente espresse in Western Blot ed immunostochimica	80
2. Effetti morfofunzionali del Mitotane sui mitocondri delle cellule tumorali umane della corteccia surrenalica.....	83
2.1. Il mitotane si accumula nelle H295R in maniera correlata alla dose somministrata	83
2.2. Il mitotane riduce la vitalità e la proliferazione cellulare delle H295R in maniera dose- e tempo-dipendente	84
2.3. L'effetto del mitotane è specifico per le cellule surrenali	88
2.4. Il mitotane induce la morte per apoptosi nelle H295R.....	89
2.5. Il mitotane induce un' alterazione morfologica a livello dei mitocondri nelle H295R in maniera dose- e tempo-dipendente.....	92
2.6. Il mitotane induce alterazioni quantitative morfometriche a livello dei mitocondri delle H295R	94
2.7. Il trattamento con mitotane determina una perturbazione del potenziale di membrana mitocondriale nelle H295R.....	96
2.8. Il trattamento con mitotane determina una diminuzione del consumo di ossigeno nei mitocondri isolati dalle cellule H295R.....	98
2.9. Il mitotane svolge la sua azione sugli enzimi della catena respiratoria, su proteine strutturali di membrana dei mitocondri e sull'attività delle caspasi nelle H295R.....	99
DISCUSSIONE.....	102
BIBLIOGRAFIA.....	112
PUBBLICAZIONI	142

RINGRAZIAMENTI.....158

INTRODUZIONE

1. Le ghiandole surrenali

L'importanza delle ghiandole surrenali come organi endocrini e il ruolo degli ormoni surrenalici nella fisiologia e nelle patologie sono stati riconosciuti da oltre un secolo (Addison T, 1868; Oliver G et al., 1895); di fatto la storia dell'endocrinologia del surrene quasi coincide con lo studio dell'endocrinologia stessa. Le ghiandole surrenali sono due organi endocrini multifunzionali posti ai lati della colonna vertebrale, a contatto con il polo superiore dei reni, che producono e secernono ormoni coinvolti nella regolazione di numerosi processi fisiologici essenziali, quali la regolazione dei livelli ematici di glucosio, il ricambio delle proteine, il metabolismo dei lipidi, il mantenimento dell'equilibrio idroelettrolitico dell'organismo e del tono cardiovascolare, la modulazione delle risposte tissutali a danni o infezioni, l'adattamento allo stress. La regolazione della sintesi degli ormoni surrenalici dipende da determinate caratteristiche delle ghiandole surrenali, tra le quali l'architettura, l'apparato enzimatico delle singole cellule e l'apporto ematico.

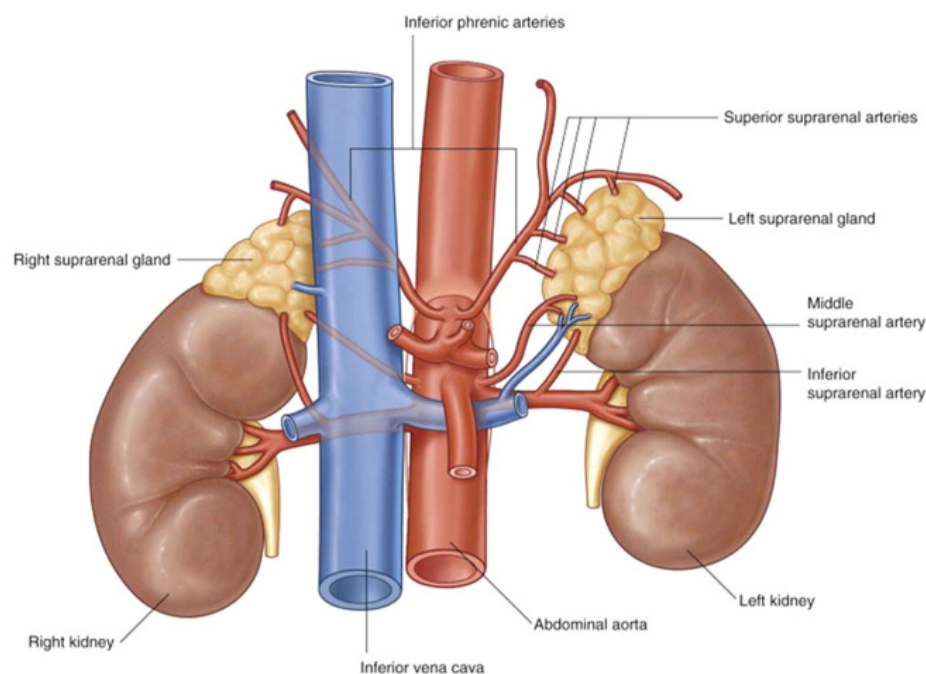


Figura 1: Anatomia delle ghiandole surrenali. Nell'immagine sono schematizzati l'afflusso arterioso, il drenaggio venoso e le connessioni delle ghiandole surrenali. Figura tratta da Drake, Fig. 4.150, © Churchill Livingstone.

Quest'ultimo deriva dalle arterie surrenali superiore, media ed inferiore, i cui rami si organizzano a formare una rete capillare che consente al sangue di diffondere dalla corticale, più esterna, verso l'area centrale, seguendo una direzione tale da controllare l'accesso degli steroidi ormonali al circolo e di concentrarli centralmente, con conseguente modulazione delle attività degli enzimi coinvolti nella sintesi di ormoni steroidei e catecolamine. Il drenaggio venoso delle ghiandole surrenali avviene attraverso la vena surrenale centrale, che sbocca a destra nella vena cava inferiore e a sinistra nella vena renale (Molina P.E., 2004). Sono organi pari e asimmetrici, di piccole dimensioni (con parametri variabili in relazione a caratteristiche quali sesso, età e condizioni fisiologiche), localizzati in posizione retroperitoneale, che presentano una forma irregolarmente piramidale con base inferiore: la ghiandola posta a destra ricorda un cappello frigio, mentre quella di sinistra ha un aspetto semilunare (Balboni GC et al., 1990). Ciascuna ghiandola surrenale si suddivide in due zone principali, la corticale e la midollare (Fig.2): la prima, più esterna, rappresenta circa il 90% del peso della surrene ed è responsabile della sintesi degli ormoni steroidei surrenalici, quali glucocorticoidi, mineralcorticoidi e androgeni; la seconda, più interna, costituisce il restante 10% della massa della ghiandola e sintetizza le catecolamine, adrenalina e noradrenalina, in risposta ad una stimolazione simpatica diretta.

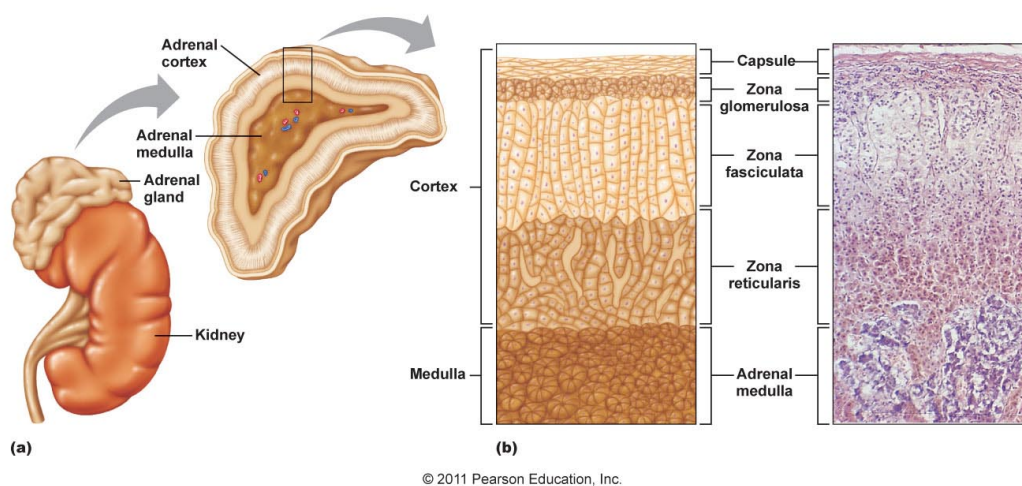


Figura 2: Suddivisione in zone della ghiandola surrenalica

Corticale e midollare hanno una diversa origine embriologica: la prima deriva dal mesoderma mentre la seconda dal neuro ectoderma. La porzione corticale compare intorno alla quarta settimana di gestazione come ispessimento dell'epitelio celomatico nella zona della cresta urogenitale; a partire da

quest'ultimo, attraverso un processo di iperplasia cellulare, si ha l'accrescimento della ghiandola e la formazione di due distinte porzioni, la zona fetale, più interna, dotata di attività steroidogenica e responsabile dell'accrescimento dell'intera ghiandola, che regredisce e scompare dopo la nascita, e la zona definitiva (o adulta), più esterna, funzionalmente quiescente fino alle fasi finali della gestazione, che andrà a costituire la porzione corticale permanente (Mesiano S, Jaffe RB, 1997). La midollare, invece, si forma tra il primo ed il secondo trimestre di gravidanza a partire da cellule che originano dalle creste neurali (tessuto neuroectodermico) e che progressivamente migrano attraverso la corticale fetale e differenziano in cellule cromaffini (Crowder R, 1957) (Keene M, Hewer E, 1927).

La **corticale della surrene** è composta da tre zone principali (Fig.2) che si differenziano per l'aspetto morfologico e per tipo di ormoni steroidei prodotti. Possiamo distinguere, andando dalla capsula verso la midollare, una zona glomerulare (che occupa il 15% della massa), una zona fasciolata (la più estesa, che occupa il 75%) e una zona reticolare (10%).

la *zona glomerulare* è costituita da uno spessore di poche cellule contenenti abbondante reticolo endoplasmatico liscio, che producono, per lo più sotto stimolazione del sistema renina-angiotensina, il principale mineralcorticoide, l'aldosterone, che interviene nella regolazione dell'omeostasi idrosalina mediante un'azione di induzione del riassorbimento di ioni Na^+ e di inibizione di quello di ioni K^+ a livello dei tubuli renali;

la *zona fasciolata*, la più ampia, è costituita da cellule organizzate in colonne e ricche di gocce lipidiche, che sintetizzano i glucocorticoidi, cortisolo e corticosterone, coinvolti nella regolazione del metabolismo di carboidrati e proteine (azione iperglicemizzante) e nell'adattamento allo stress (azione antiflogistica ed anti-allergica); la secrezione del cortisolo è sotto il controllo diretto dell'ormone ipofisario ACTH (Adrenocorticotropic Hormone), regolato a sua volta dal rilascio dell'ormone CRH (Corticotropin Releasing Hormone) da parte dell'ipotalamo, entrambi controllati da un meccanismo di feedback negativo da parte dello stesso cortisolo;

la *zona reticolare*, la più interna, a contatto con la midollare della surrene, è composta da una rete di cellule interconnesse che producono, sotto il controllo di ACTH ed LH (Luteinizing Hormone), gli ormoni androgeni DHEA (deidroepiandrosterone) e DHEAS (deidroepiandrosterone solfato), che

contribuiscono a determinare e mantenere i caratteri sessuali secondari (Balboni GC et al., 1990).

Tutti gli ormoni steroidei prodotti dalla corticale surrenalica vengono sintetizzati a partire dal colesterolo, che può derivare dalla membrana plasmatica o dal deposito citoplasmatico steroidogenico (Fig.3).

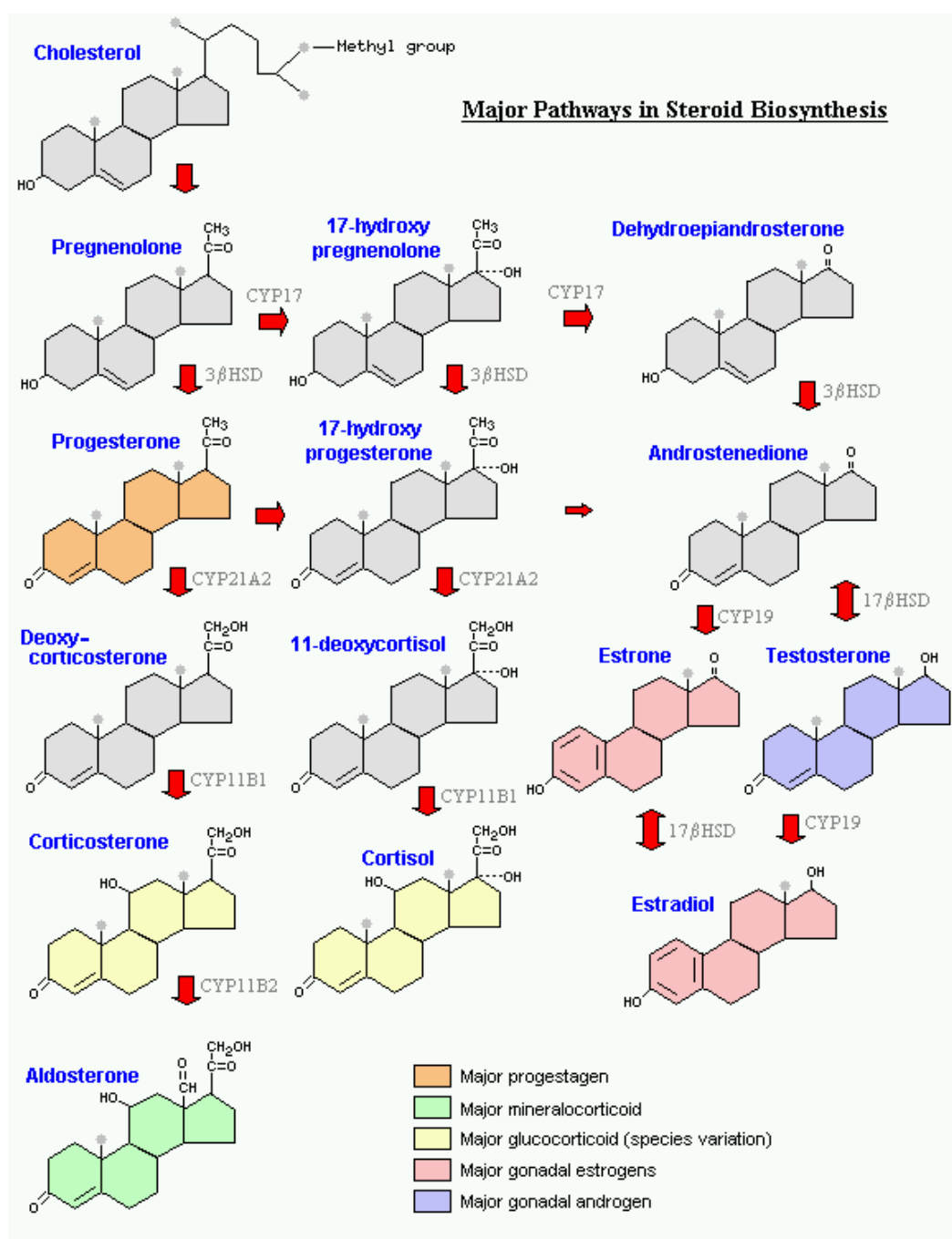


Figura 3: Tappe del processo steroidogenico nella ghiandola surrenalica.

La tappa iniziale della sintesi di glicocorticoidi e mineralcorticoidi avviene all'interno dei mitocondri, dove il colesterolo che è stato trasferito per mezzo della proteina StAR (Steroid Acute Regulatory protein), viene convertito in pregnenolone da parte di un enzima appartenente alla famiglia del citocromo P450, l'enzima di clivaggio della catena laterale (CYP11A1), presente a livello della membrana mitocondriale interna di tutte le cellule steroidogeniche. Il pregnenolone viene quindi trasferito nel reticolo endoplasmatico liscio microsomiale, dove può essere convertito in progesterone, dalla 3β -idrossisteroide deidrogenasi (3β -HSD), o in 17α -idrossipregnenolone, dalla 17α -idrossilasi, come accade nelle cellule della zona fasciolata e reticolare: il progesterone viene quindi convertito dalla 21β -idrossilasi in 11 -deossicorticosterone, che viene a sua volta trasformato in corticosterone dalla 11β -idrossilasi; il 17α -idrossipregnenolone viene invece convertito in 17α -idrossiprogherone dalla 3β -HSD. L'ultima tappa della sintesi dei glucocorticoidi avviene nuovamente nel mitocondrio, e prevede la formazione di cortisolo da parte dell'enzima 11β -idrossilasi a partire dall' 11 -deossicortisolo, derivante a sua volta da una idrossilazione del 17α -idrossiprogherone. Sia il 17α -idrossipregnenolone che il 17α -idrossiprogherone possono essere convertiti dalla $17,20$ -liasi rispettivamente in deidroepiandrosterone (DHEA) ed androstenedione. Nelle cellule della zona glomerulare sono assenti sia l'attività 17α -idrossilasica, per cui il pregnenolone può essere convertito solo in progesterone, sia l'attività 11β -idrossilasica; tuttavia, la produzione di corticosterone avviene ugualmente grazie alla presenza di un altro enzima, l'aldosterone sintetasi, che catalizza tutte le reazioni necessarie alla produzione di aldosterone.

La **midollare della surrene** costituisce la porzione centrale della ghiandola ed è formata da cellule più grandi rispetto a quelle corticali, i feocromociti, cellule cromaffini disposte a rete che producono le catecolamine come risposta allo stress, indotto da un insulto fisico o psicologico, sotto stimolazione nervosa mediata dall'acetilcolina e attraverso l'interazione con i recettori adrenergici, di tipo sia α che β . Essendo questa una risposta di tipo "*fight or flight*", gli effetti fisiologici comprendono: attivazione, allerta, dilatazione delle pupille, piloerezione, sudorazione, broncodilatazione, tachicardia, vasocostrizione periferica, aumento delle resistenze vascolari, inibizione dell'attività della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale, contrazione degli sfinteri, rilascio della muscolatura liscia uterina. La maggior parte di questi eventi richiede dispendio di energia, che deriva dalla mobilitazione dei substrati da fegato,

muscolo e tessuto adiposo attraverso l' induzione, mediata dalle catecolamine stesse, dei processi di glicogeno- e lipo-lisi. Le catecolamine che vengono prodotte sono *adrenalina* e *noradrenalina*: la prima deriva dalla metilazione della noradrenalina e rappresenta l'80% delle catecolamine prodotte dalla midollare; sono sintetizzate a partire dalla tirosina, che viene attivamente trasportata nelle cellule e sottoposta ad una serie di reazioni enzimatiche: la prima di queste è rappresentata dalla sua idrossilazione ad L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) ad opera dell'enzima tirosina idrossilasi, la cui attività è regolata da un meccanismo di feed-back negativo da parte della noradrenalina; la reazione seguente prevede la decarbossilazione della L-DOPA a dopamina da parte della DOPA decarbossilasi, che utilizza il piridossal-fosfato come cofattore. La dopamina così formata viene inclusa in vescicole secretorie, all'interno delle quali l'enzima dopamina- β -idrossilasi idrossila la dopamina a noradrenalina utilizzando la vitamina C come cofattore; infine, la noradrenalina, rilasciata nel citoplasma attraverso un meccanismo di esocitosi, viene convertita dalla feniletanolamina-N-metiltransferasi ad adrenalina, che viene trasportata nuovamente nelle vescicole mediante trasporto attivo ATP-mediato. In seguito a stimolazione simpatica mediata dall'acetilcolina si ottiene la secrezione delle catecolamine; in particolare, il neurotrasmettitore interagisce con i recettori nicotinici colinergici espressi dalla membrana plasmatica delle cellule cromaffini e induce la depolarizzazione di queste cellule, con conseguente attivazione dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti: l'influsso di calcio che ne deriva determina l'esocitosi delle vescicole secretorie, che rilasciano il proprio contenuto (catecolamine, cromogranine, ATP, adrenomedullina, prodotti proopiomelanocortinici) nello spazio interstiziale, da dove, attraverso il circolo sanguigno, raggiungono i loro organi bersaglio; a livello degli specifici distretti vengono, quindi, metabolizzate dalle monoaminossidasi (MAO) e dalle catecol-O-metiltransferasi (COMT) (Molina PE, 2004).

2. Il carcinoma corticosurrenalico

I tumori della corteccia surrenalica (ACT) sono costituiti per la maggior parte da adenomi benigni, mentre il carcinoma primario della corteccia surrenalica (ACC) è un tumore raro ma altamente aggressivo di derivazione epiteliale (De Lellis RA et al., 2004), che rappresenta lo 0,2% di tutti i tipi di tumore (Zini L et al., 2011). La sua rarità è il principale fattore limitante per lo studio dei meccanismi fisiopatologici che ne sono alla base (Ragazzon B et al., 2011) e

benché negli ultimi 20 anni siano stati fatti progressi nella conoscenza delle basi molecolari di questo tipo di tumore, una chiara comprensione di questa patologia rimane ancora scarsa. La gestione dei pazienti fa inoltre riferimento per la maggior parte a trials clinici retrospettivi, perciò risulta di fondamentale importanza un approccio di tipo multidisciplinare e multicentrico per incrementare e migliorare la conoscenza di questo tipo di tumore e sviluppare terapie più mirate.

2.1. Epidemiologia

I tumori surrenalici sono piuttosto comuni, dal momento che colpiscono dal 3 al 10% della popolazione, e sono costituiti per la maggior parte da piccoli adenomi benigni non funzionanti (ACA) (Mansmann G et al., 2004); si presentano secondo tre diverse modalità: incidentaloma, definito come una massa surrenale imprevista scoperta per un'indagine di imaging eseguita per altri motivi (Berland LL et al., 2010), sindrome ormonale come la Sindrome di Cushing o sindrome da eccesso di androgeni, e sindrome tumorale (Groussin L et al., 2007).

L'ACC è invece un tumore solido raro (Wajchenberg BL et al., 2000; Kebebew E et al., 2006) che costituisce meno del 5% di tutti gli incidentalomi surrenalici, con una prevalenza di 1-2 casi l'anno per milione di persone (Kebebew E et al., 2006; Vaughan Jr ED, 2004; Roman S, 2006; Koschker AC et al., 2006). Ha una distribuzione bimodale, caratterizzata da un'incidenza relativamente alta nei bambini con età inferiore ai 5 anni e negli adulti tra la quarta e la quinta decade di vita, ma può comunque presentarsi a qualsiasi età; negli adulti l'età media alla diagnosi è di 45 anni (Wajchenberg BL et al., 2000). Le donne sono colpite più frequentemente rispetto agli uomini, con un rapporto di 1,5:1 (Wajchenberg BL et al., 2000; Roman S, 2006; Dackiw AP et al., 2001) e sviluppano con maggior probabilità tumori funzionanti. In età pediatrica questo tipo di tumore è generalmente più raro (0,3-0,4 casi per milione all'anno) (Wieneke JA et al., 2003), fatta eccezione per il Sud del Brasile, dove l'incidenza sale a 2,9-4,2 casi per milione l'anno (Pianovski MA et al., 2006); ciò è stato attribuito principalmente all'alta prevalenza di una mutazione germinale descritta a livello della sequenza genica codificante l'oncosoppressore p53 (TP53 R337H) (Latronico AC et al., 2001; Ribeiro RC et al., 2001; Seidinger AL et al., 2011; Figueiredo BC et al., 2006; Garritano S et al., 2010; Pinto EM et al., 2004).

2.2. Presentazione clinica

I pazienti con ACC solo raramente presentano i classici sintomi correlati alla presenza di un tumore, come la cachessia o la sudorazione notturna (Allolio B et al., 2006; Luton JP et al., 1990). Ci sono tre principali scenari clinici in cui si configurano i pazienti con ACC: dal 40 al 60% dei pazienti presenta tumori secernenti e di conseguenza manifesta segni e sintomi tipici dell'eccesso di ormoni secreti (Koschker AC et al., 2006; Abiven G et al., 2006; Libe R et al., 2007) (Allolio B et al., 2006; Fassnacht M et al., 2009; Luton JP et al., 1990); un terzo presenta sintomi aspecifici dovuti alla crescita locale della massa tumorale, come dolore addominale e mal di schiena, indigestione o sazietà precoce (Fassnacht M et al., 2009; Luton JP et al., 1990); circa un 20-30% degli ACC viene diagnosticato incidentalmente mediante procedure diagnostiche per problematiche mediche non correlate (Fassnacht M et al., 2010).

Per quanto riguarda i tumori secernenti si parla di sindrome di Conn, di Cushing o virilizzante in seguito a eccessiva produzione di aldosterone, cortisolo o androgeni rispettivamente (Lafemina J et al., 2012). L' ipercortisolismo è la forma più comune di secrezione (50-80% di ACC ormone-secernenti) e causa sintomi che includono plethora, diabete mellito, debolezza muscolare, atrofia e osteoporosi; gli ormoni più comunemente prodotti dopo il cortisolo sono gli androgeni surrenalici (40-60% degli ACC ormone-secernenti), che causano irsutismo, virilizzazione e irregolarità mestruali nelle donne, mentre sono generalmente privi di effetti evidenti nei pazienti maschi; la co-secrezione di androgeni e cortisolo è fortemente indicativa della presenza di tumore corticosurrenalico maligno (Luton JP et al. 1990, Wajchenberg BL et al. 2000, Allolio B et al. 2004, Abiven G et al. 2006); infine, la secrezione di aldosterone (che normalmente determina ipertensione e ipopotassemia) è rara negli ACC (Abiven G et al., 2006; Seccia TM et al., 2005). Alcuni tumori maligni possono invece secernere precursori degli steroidi o addirittura steroidi inattivi e conseguentemente danno origine a manifestazioni cliniche correlate all'effetto della massa tumorale: in questi casi, al momento della manifestazione, il tumore è generalmente piuttosto voluminoso, e in media misura tra i 10 e i 13 cm (Fassnacht M et al., 2009; Abiven G et al. 2006; Sturgeon C et al., 2006); solo una minoranza di tumori ha dimensioni inferiori ai 6 cm (9-14%) (Sturgeon C et al., 2006; Paton BL et al., 2006). La diffusione metastatica più comune avviene nei polmoni (45%), nel fegato (42%) o nei linfonodi (24%), mentre si ritrova con

minor frequenza a livello di ossa, pancreas, milza e diaframma (Brennan MF, 1987; Cohn K et al., 1986).

2.3. Classificazione e stadiazione

La valutazione patologica dei tumori corticosurrenali ha fatto dei progressi sostanziali negli ultimi quarant'anni. Inizialmente si pensava che il fattore principale nella determinazione del potenziale maligno di questi tumori fosse la grandezza del tumore stesso; anche se questo parametro ha tuttora una certa importanza a livello diagnostico, sono stati sviluppati algoritmi diagnostici allo scopo di includere una larga varietà di parametri clinici, istologici e immunoistochimici (Hough AJ et al., 1979; van Slooten H et al., 1985; Weiss LM, 1984). Mediante questo approccio è stato possibile definire un set di criteri diagnostici da poter utilizzare per l'identificazione di quei tumori che possiedono, ma ancora non manifestano, un potenziale maligno: il sistema di Weiss è stato quello che ha ricevuto maggiori consensi nella pratica clinica (Aubert S et al., 2002). Esso consiste di 9 caratteristiche istologiche, ad ognuna delle quali viene assegnato punteggio 1 se presenti e punteggio 0 se assenti, che comprendono:

- alto grado nucleare
- tasso mitotico >5/50 campi ad alta risoluzione
- figure mitotiche atipiche
- tumori con cellule chiare ≤ 25%
- architettura diffusa (più di un terzo del tumore)
- necrosi microscopica
- invasione delle strutture venose
- invasione delle strutture sinusoidali
- invasione capsulare

In presenza di almeno 3 di queste caratteristiche il tumore si identifica come un ACC, che ricorre o metastatizza in circa l'80% dei casi; al contrario, un punteggio inferiore a 3 è indice di tumore benigno (Weiss LM et al., 1989). Tuttavia, rimane incerta la diagnosi di malignità per tumori con punteggio 2; infatti, nonostante l'applicazione di questo sistema abbia notevolmente contribuito a classificare la maggior parte dei tumori corticosurrenali, esistono casi che non vengono inclusi nella classificazione. Proprio a causa di questi casi difficili, alcuni patologi hanno provato a sviluppare tecniche di supporto per raffinare l'approccio a questi tumori. Una tecnica istochimica utilizza la

colorazione della reticulina per evidenziare la rottura della rete di reticulina che è stata osservata negli ACC (Volante M et al., 2009; Papotti M et al., 2011). In letteratura sono stati inoltre descritti metodi immunocistochemici mirati a separare gli adenomi (ACA) dai carcinomi: la maggior parte di essi è incentrata sulla proliferazione delle cellule tumorali (Cibas ES et al., 1990; Arola J et al., 2000; Sasano H et al., 1995; Morimoto R et al., 2008); l'utilizzo di immunomarkers come il Ki67, indice del tasso di proliferazione cellulare, è risultato efficace nel discriminare gli ACC dagli ACA (Wachenfeld C et al., 2001; Sasano H et al., 2006; Schmitt A et al., 2006): gli ACC tendenzialmente mostrano un indice di marcatura per il Ki67>5%. Tale indice costituisce inoltre un fattore predittivo di ricorrenza in seguito a resezione del tumore primario e di riduzione dell'intervallo di sopravvivenza libero da malattia (McNicol AM et al., 1997; Morimoto M et al., 2008).

Talvolta risulta difficile però essere certi che un particolare tumore in sede retro peritoneale rappresenti un ACC, caso che generalmente si verifica per diffusione attraverso la ghiandola surrenalica e/o perdita di differenziazione corticosurrenale. In questi casi, una batteria di immunocolorazioni può fornire indicazioni sulla differenziazione corticosurrenale (Zhang H et al., 2008), che include, ma non si limita a queste, le seguenti proteine espresse nella maggior parte degli ACC:

- α -inibina (Arola J et al., 2000; 1998)
- calretinina (Jorda M et al., 2002)
- sinaptofisina (Schroder S et al., 1992)
- melanA (Mart1) (Ghorab Z et al., 2003)
- fattore steroidogenico 1 (SF-1) (Sbiera S et al., 2010; Duregon E et al., 2013)

Gli ACC mostrano un alto grado di eterogeneità intratumorale e non è raro trovare tumori costituiti da numerose aree e noduli con differenti fenotipi istologici. Sono state descritte alcune varianti istologiche dell'ACC per le quali non risulta applicabile il tradizionale score di Weiss (Papotti M et al., 2010) (Wong DD et al., 2011): la più comune è chiamata variante oncocitica, che deve il nome alla prevalenza di oncociti, definiti cellule con citoplasma abbondante e granuloso, correlato all'accumulo di mitocondri e di reticolo endoplasmatico (Erlandson RA et al., 1991; Macchi C et al., 1998; Hoang MP et al., 2002; Song SY et al., 2004; Ohtake H et al., 2010; Wong DD et al., 2011). L'altra variante più rappresentata dell'ACC è chiamata mixoide per la produzione di abbondanti sostanze extracellulari mixoidi (Brown FM et al., 2000; Suresh B et al., 2005;

Karim RZ et al., 2006; Raparia K et al., 2008; Papotti M., 2010; Hsieh MS et al., 2011; Zhang J et al., 2011; Sheng JY et al., 2012). Infine, sono stati descritti gli ACC sarcomatoidi (carcinosarcomi)(Coli A et al., 2010).

Un parametro importante nella classificazione e nella determinazione della prognosi dell'ACC è la stadiazione del tumore. Nel 2004, l'Organizzazione Mondiale della Sanità introdusse un sistema basato sulla tradizionale classificazione proposta da MacFarlane (MacFarlane DA, 1958), modificata in seguito da Sullivan e collaboratori (Sullivan M et al., 1978), che prende il nome di sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) (DeLellis RA et al., 2004) (Fassnacht M et al., 2009). Questo sistema di classificazione è stato recentemente messo in discussione a causa di numerose lacune e ne è stato introdotto un altro dal Network Europeo per lo studio dei tumori surrenalici (ENSAT) (Fassnacht M et al., 2009). Il sistema di stadiazione ENSAT definisce quattro stadi: tumori a stadio 1 (massa tumorale ≤ 5 cm) e stadio 2 (>5 cm) sono confinati alla ghiandola surrenalica; i tumori allo stadio 3 si estendono nel tessuto circostante (ad esempio, tessuto adiposo para-surrenalico o organi adiacenti) o hanno invaso linfonodi loco regionali; lo stadio 4 è caratterizzato dalla presenza di metastasi a distanza.

STADIO	UICC/WHO	ENSAT
I	T1, N0, M0	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0	T2, N0, M0
III	T3, N0, M0 T1-2, N1, M0	T1-2, N1, M0 T3-4, N0-1, M0
IV	T3-4, N1, M0 T1-2-3-4, M1	T1-4, N0-1, M1

Tabella 1: Sistema TNM per la classificazione del carcinoma coticosurrenalico con le modifiche proposte dall'ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) rispetto ai parametri stabiliti da UICC (International Union Against Cancer) e WHO (World Health Organization).

2.4. Prognosi

Complessivamente, l'ACC è caratterizzato da prognosi infausta e il fattore prognostico più importante è costituito dallo stadio tumorale al momento della

diagnosi; la prognosi dei tumori con stadio I o II è migliore di quella di ACC di stadio III o IV (Icard P. et al., 2001; Abiven G. et al., 2006) e il quadro peggiore si delinea per coloro che presentano metastasi a distanza. Generalmente i pazienti pediatrici hanno una prognosi migliore dovuta alla precoce identificazione del tumore che si manifesta con sintomi caratteristici correlati alla massa funzionante. Purtroppo però negli adulti la maggioranza degli ACC è silente da un punto di vista ormonale (Latronico AC et al., 1997), e questo rende estremamente difficile e rara una diagnosi precoce: circa il 70% dei pazienti, infatti, presenta un tumore allo stadio III o IV al momento della diagnosi. La sopravvivenza media di pazienti con patologia metastatica (stadio IV) al momento della diagnosi è inferiore a un anno (Ayala-Ramirez M et al., 2013), e rimane comunque limitata a 5 anni solamente per una percentuale di pazienti al di sotto del 35% (Patalano A et al., 2009; Luton JP et al., 1990; Allolio B et al., 2004; Abiven G et al., 2006; Libe R et al., 2007): la prognosi infausta è dovuta anche al fatto che in circa l'80% dei casi i pazienti vanno incontro a recidive locali o sviluppano metastasi (Dackiw AP et al., 2001).

La sopravvivenza dei pazienti con ACC non è sostanzialmente cambiata negli ultimi 20 anni dal momento che una scarsa comprensione dei meccanismi fisiopatologici, l'eterogeneità di questa patologia, il cui esito clinico può variare anche all'interno di uno stesso stadio tumorale, e la sua rarità rimangono fattori limitanti per una conoscenza più approfondita di questo tipo di tumore (Bilimoria KY et al., 2008).

2.5. Approcci terapeutici

A tutt'oggi, l'unico trattamento efficace per la cura dell' ACC localizzato è la completa resezione chirurgica del tumore (Dackiw AP et al., 2001); le terapie adiuvanti vengono utilizzate allo scopo di diminuire le possibilità di ricaduta, ma circa l'80% di questi pazienti sviluppa recidive locali o distanti anche dopo asportazione chirurgica. Per quanto riguarda il trattamento della patologia ad uno stadio avanzato o non operabile, qualsiasi terapia deve essere considerata un palliativo, anche se la combinazione di alcuni chemoterapici ha mostrato parziali benefici (Else T et al., 2014).

2.5.1. Chirurgia

Ad oggi, l'unico trattamento efficace per la cura dell'ACC localizzato è rappresentato dalla resezione chirurgica. In generale, le indicazioni per un'adrenalectomia comprendono la presenza di secrezione ormonale autonoma o

di un elevato rischio di malignità (dimensioni del tumore superiori ai 5 cm, caratteristiche radiografiche, invasione locale, coinvolgimento dei linfonodi). La resezione completa (R0) rappresenta l'unico strumento per una cura a lungo termine, associandosi ad una prognosi migliore; inoltre, preservare l'integrità della capsula surrenalica risulta fondamentale per ridurre il rischio di recidiva locale (Zeiger MA et al., 2009). L'adrenalectomia in open (OA) rappresenta lo standard di intervento per tutti i pazienti con ACC asportabile ed è la procedura richiesta in caso di tumori invasivi (Kuruba R and Gallagher SF, 2008), mentre rimane aperto il dibattito sull'utilizzo della tecnica di adrenalectomia in laparoscopia (LA) in casi di sospetto tumore maligno, soprattutto a causa degli effetti negativi riportati, quali frammentazione del tumore, recidive locali, carcinomatosi peritoneale (Gonzalez RJ et al., 2005) (Cobb WS et al., 2005) (Miller BS et al., 2010) (Leboulleux S et al., 2010). Tuttavia, esistono anche dati a supporto dell'uso di una chirurgia meno invasiva, con la possibilità di ottenere risultati comparabili a quelli della chirurgia in open, senza rischi di carcinomatosi o recidive (McCauley LR and Nguyen MM, 2008) (Brix D et al., 2010) (Porpiglia F et al., 2010).

2.5.2. Radioterapia

In passato, la radioterapia è stata spesso valutata come inefficace nel trattamento dell'ACC e questo tipo di tumore era considerato radioresistente (Lipsett MB et al., 1963; Hutter AM and Kayhoe DE, 1966; Luton JP et al., 1990; Schulick RD and Brannan MF, 1999); tuttavia, vi sono evidenze che ciò non sia del tutto vero e la radioterapia viene proposta come adiuvante nei casi ad elevato rischio di recidiva locale, in presenza di metastasi oppure come cura palliativa per controllare i sintomi locali (Schteingart DE et al., 2005; Fassnacht M and Allolio B, 2006; Polat B et al., 2009; Sabolch A et al., 2011).

2.5.3. Mitotane

Il mitotane [1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane, o,p'-DDD], è un derivato del DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane), pesticida sul quale furono condotti studi di tossicità negli anni quaranta e cinquanta che dimostrarono un effetto a livello della corticale surrenalica, dovuti principalmente all'isomero ortho-para' (o-p'-DDD, o mitotane); essendo stati osservati effetti anti-steroidogenici e adrenolitici, il mitotane fu proposto come trattamento per l'ACC (Nelson AA and Woodard G, 1949) (Bergental DM et al., 1960) (Metz SA, 1973), ed è rimasto fino ad oggi il trattamento di elezione per i

pazienti con ACC allo stadio avanzato, da solo, o in combinazione con altri agenti citotossici. Terzolo e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con mitotane come agente adiuvante determina un netto prolungamento della sopravvivenza libera da malattia (Terzolo M et al., 2007), e sebbene studi retrospettivi abbiano sollevato alcune problematiche riguardo ai risultati ottenuti, la maggior parte degli esperti concorda che la terapia con mitotane come adiuvante debba essere applicata ai pazienti con tumori clinicamente o istologicamente aggressivi, anche in seguito a resezione completa del tumore (Balasubramaniam S and Fojo T, 2010; Fassnacht M et al., 2011; Lacroix A, 2010). L'effetto antitumorale del mitotane è correlato al mantenimento di adeguati livelli del farmaco nel plasma (Baudin E et al., 2001; Haak HR et al., 1994; Terzolo M et al., 2000; van Sloten H et al., 1984). La somministrazione del farmaco avviene per via orale sotto forma di pasticche da 500 mg (Lysodren; HRA Pharma Paris, Bristol-Myers Squibb) e i suoi livelli sierici vengono monitorati affinché si mantengano entro il range terapeutico, che è stato stabilito tra i 14 e i 20 mg/L (Terzolo M et al., 2000): pazienti con livelli plasmatici di o,p'-DDD pari o superiori a 14 mg/L presentano un miglioramento in termini di sopravvivenza (Hermsen IG, 2011), mentre livelli plasmatici di o,p'-DDD superiori a 20 mg/L si associano ad un' aumentata insorgenza di effetti collaterali, soprattutto a livello gastrointestinale, neurologico ed endocrino (Baudin E et al., 2001). Il trattamento con mitotane determina anche insufficienza surrenalica, e i pazienti trattati devono quindi effettuare la terapia sostitutiva con idrocortisone; recentemente è stato dimostrato che il mitotane induce l'espressione del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (van Erp NP et al., 2011), osservazione confermata mediante un approccio di tipo steroidomico (Chortis V et al., 2013), con conseguente aumento del metabolismo del cortisolo, e questo contribuisce a spiegare la necessità di raddoppiare la sostituzione dell' idrocortisone nei pazienti trattati con mitotane. All'interno della ghiandola surrenalica il mitotane viene metabolizzato a 1,1-(o,p)dichlorodiphenyl)-2,2 dichloroethene (o,p'DDE) e 1,1-(o,p)dichlorodiphenyl)acetic acid (o,p'DDA) attraverso un'idrossilazione in posizione α e β , rispettivamente (Cai W et al., 1995; Lindhe et al., 2002), e questa trasformazione metabolica è fondamentale perché esso abbia un effetto terapeutico.

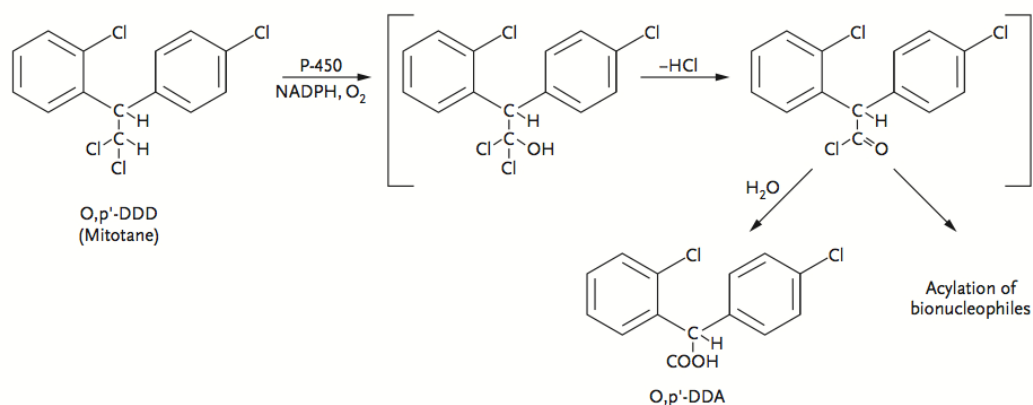


Figura 4: Metabolismo del Mitotane.

Uno studio recente di follow-up a lungo termine (Kasperlik-Zaluska AA and Cichocki AJ, 2005) ha evidenziato come le concentrazioni plasmatiche di DDE siano più strettamente correlate ad un miglioramento a livello clinico o a remissione rispetto ai livelli del mitotane stesso. Al contrario, un recente studio multicentrico retrospettivo su un consistente numero di pazienti ha mostrato che solo la rilevazione dell' o-p'-DDA sembra essere utile nel predire una risposta terapeutica (Hermsen LG et al., 2011). Tuttavia il monitoraggio dei metaboliti del mitotane non è sempre realizzabile e ancora non è entrato nella pratica clinica. Nonostante venga utilizzato da oltre 50 anni, però, i meccanismi molecolari di azione del mitotane sono ancora in gran parte sconosciuti. E' nota la sua capacità di legare le proteine surrenaliche (Cai W et al., 1995) (Cai W et al., 1997) e di accumularsi in maniera selettiva nelle zone fascicolata e reticolare della corticale (Martz F and Straw JA, 1977) (Lindhö O et al., 2002): esso determina un blocco del processo steroidogenico, in particolare della produzione di cortisolo, andando ad interferire con la funzione di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del colesterolo, quali StAR, CYP450_{sc} e CYP11B1 (Asp V et al., 2010) (Lin CW et al., 2012). A livello cellulare inibisce significativamente in maniera dose-dipendente la proliferazione e la secrezione di cortisolo nella linea cellulare H295R (Lindhö O and Skogseid B, 2010); il mitotane è anche in grado di rendere più sensibili alle radiazioni ionizzanti le H295R e le SW13, riducendo la riparazione del DNA e interferendo con la proliferazione (Cerquetti L et al., 2010). Recentemente è stato osservato che concentrazioni non citotossiche di mitotane sono in grado di interferire con la trascrizione genica di una serie di enzimi steroidogenici nelle cellule H295R inibendo la secrezione di cortisolo (Lin CW et al., 2012). Inoltre, dati recenti suggeriscono che sia coinvolta una down-regolazione degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale (Poli G et al., 2013; Hescot S et al., 2013), ma le vie di segnalazione che determinano questi

cambiamenti non sono state identificate, nemmeno in seguito all'introduzione di tecniche altamente innovative come i microarrays di espressione genica e approcci di tipo proteomico (Zsippai A et al., 2012; Stigliano A et al., 2008; Lehmann TP et al., 2013). In studi precedenti era stato osservato che l'attività del mitotane sembra essere influenzata dall'espressione dell'enzima RRM1 (Ribonucleotide Reductase Large Subunit): una ridotta espressione di questo gene è associata con un prolungamento della sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con ACC trattati con MTT come adiuvante, e il silenziamento specifico di RRM1 è in grado di ripristinare la sensibilità al mitotane nella linea cellulare tumorale SW13, poco sensibile al farmaco, *in vitro* (Volante M et al., 2012). Inoltre, Germano e collaboratori hanno dimostrato che nelle cellule di ACC la modulazione del gene RRM1 è associata con specifici profili di sensibilità al mitotane in combinazione con gemcitabina, un agente chemioterapico utilizzato per il trattamento degli ACC in stadio avanzato che ha come target specifico RRM1 (Germano A et al., 2014); rimane tuttavia ancora sconosciuta l'interazione funzionale tra mitotane e RRM1, anche se si potrebbe affermare che l'enzima interferisce con la metabolizzazione del mitotane grazie alla sua attività reduttasica. Rimane, comunque, ancora da chiarire il meccanismo d'azione molecolare di questo farmaco, la cui comprensione rappresenta un prerequisito necessario per lo sviluppo di composti meno tossici.

2.5.4. Chemioterapici citotossici

Il ruolo della chemioterapia citotossica nel trattamento dell'ACC rimane ancora da chiarire completamente. In generale, la risposta dei pazienti rimane bassa e tale refrattarietà può essere spiegata con il fatto che l'ACC esprime il gene *MDR-1* (multidrug resistance), con produzione di elevati livelli di p-glicoproteina, una proteina di membrana che agisce da pompa di efflusso dei farmaci (Abraham J et al., 2002). L'utilizzo di antagonisti della p-glicoproteina potrebbe migliorare l'efficacia della terapia citotossica; inoltre, è stata dimostrata *in vitro* l'efficacia del mitotane nel limitare il fenomeno di "multidrug resistance" inibendo l'espressione di *MDR-1*, ed è su questo che si basa la corrente associazione tra farmaci citotossici e mitotane. Ad oggi, sono due i regimi terapeutici raccomandati per i pazienti in stadio avanzato della malattia: mitotane in combinazione con etoposide, doxorubicina e cisplatino (EDP/M) (Berruti A et al., 1998; Berruti A. et al., 2005) e mitotane plus streptozocina (Sz/M) (Khan TS et al., 2000). Essi sono stati confrontati durante un recente trial ampio, randomizzato, e multicentrico (il FIRM-ACT, "First International Randomized

trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment") con il fine di verificarne l'efficacia nell'aumentare la sopravvivenza dei pazienti. Da tale trial è emerso che il regime EDP/M, pur non determinando un miglioramento significativo della sopravvivenza complessiva, presenta una maggiore efficacia antitumorale rispetto al trattamento Sz/M (Fassnacht M et al., 2012). Un protocollo alternativo a questi potrebbe essere eventualmente rappresentato dal trattamento metronomico (somministrazione dei farmaci a piccole dosi continue) con capecitabina plus gemcitabina (Sperone P et al., 2010).

2.5.5. Terapie target specifiche

La possibilità di sviluppare nuove strategie terapeutiche target-specifiche per il trattamento del carcinoma corticosurrenalico si basa sulle conoscenze acquisite nell'ambito delle basi biologiche e molecolari di questa patologia, soprattutto in rapporto alle alterazioni a livello delle vie di regolazione di crescita e sopravvivenza cellulari.

Terapia anti-IGF-IR. L'over-espressione dell'IGF-II è uno degli eventi più comuni nell'ACC, per cui la sua via di segnalazione è stata una delle prime ad essere considerata come possibile target terapeutico selettivo; in particolare, l'attenzione è stata focalizzata sul legame dell'IGF-II al recettore dell'IGF-I, che determina l'attivazione della via di segnalazione che coinvolge PI3K/Akt e le MAP chinasi, mediandone gli effetti di induzione dei processi di proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulari (Pollak M, 2008), che si associano alla possibilità di migrazione delle cellule tumorali ed allo sviluppo di metastasi (Rosenzweig SA and Atreya HS, 2010). Sulla base di incoraggianti dati preliminari ottenuti con l'inibizione dell'IGF-IR nel trattamento di mieloma multiplo e tumori ematologici, un antagonista altamente selettivo dell'IGF-IR (NVP-AEW541), dotato di attività anti-tumorale è stato utilizzato in esperimenti *in vitro* per testarne l'efficacia anche nel trattamento dell'ACC (Garcia-Echeverria C et al., 2004; Barlaskar FM et al., 2009). Sono stati, poi, sviluppati anticorpi monoclonali diretti contro lo stesso recettore, quali: il cixutumumab (IMC-A12), testato sia singolarmente che in associazione con il mitotane, che è in grado di ridurre la crescita tumorale in xenotrapianti murini di cellule H295R (Barlaskar FM et al., 2009); il figitumumab (CP-751,871) (Haluska P et al., 2010).

Un'altra categoria di molecole indagata come antitumorali nell'ACC è quella degli inibitori a piccola molecola delle tirosin-chinasi: essi, infatti, agiscono

bloccando l'attività tirosin-chinasica dell'IGF-IR che è alla base dell'attivazione della cascata di segnalazione intracellulare a valle del recettore. Tra questi, l'OSI-906 è in fase di studio per quel che riguarda la sua efficacia nel controllo della progressione dell'ACC in un trial clinico su pazienti con carcinoma corticosurrenalico di stadio IV (Carden CP et al., 2009) (Demeure MJ et al., 2011).

Terapia anti-mTOR. mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) è uno degli effettori a valle della via di segnalazione PI3K/Akt che media l'integrazione del segnale proveniente da molti recettori a tirosin-chinasi, compreso l'IGF-IR, e rappresenta uno dei target emergenti nella terapia antitumorale (Zhou H et al., 2010; Populo H et al., 2012). E' stato recentemente dimostrato che la segnalazione IGF-IR/mTOR è attivata nei tumori corticosurrenalici pediatrici e che l'uso di un inibitore di mTOR, l'everolimus (RAD001), consente di ridurre efficacemente la proliferazione cellulare *in vitro* e la crescita tumorale in xenotrapianti murini (Doghman M et al., 2010), suggerendo la possibilità di un nuovo approccio terapeutico per l'ACC.

Terapia anti-EGFR. I dati sull'espressione del recettore dell'EGF nei tumori corticosurrenalici hanno portato a tentare di utilizzare questa via di segnalazione come target specifico per la terapia anti-tumorale. In particolare, è stata testata l'efficacia di inibitori delle tirosin-chinasi specifici per l'EGFR, quali gefitinib (come agente singolo) ed erlotinib (in combinazione con l'agente citotossico gemcitabina), ma con risposte minime, se non nulle (Samntra V et al., 2007) (Quinkler M et al., 2008).

Terapia anti-FGFR. Nonostante l'asse IGF-II/IGF-IR sia il sistema a tirosin-chinasi maggiormente over-espresso nell'ACC, i dati provenienti dalle analisi dei microarray mostrano come anche l'espressione dei membri della famiglia FGFR sia spesso aumentata (Giordano TJ et al., 2003; de Fraipont F et al., 2005; Slater EP et al., 2006; West AN et al., 2007). Pur essendo stati sviluppati degli inibitori del FGFR, quali l'inibitore a piccola molecola dovitinib (Xin X et al., 2006; Loilome W et al., 2009; Kim KB et al., 2011) e l'antagonista del FGFR FP-1039 (Zhang H et al., 2007; Tolcher A et al., 2009), non è ancora stato attuato alcun trial clinico per valutarne l'efficacia nel trattamento dell'ACC.

Terapia anti-VEGFR. La dimostrazione che lo sviluppo e la crescita dei tumori necessitano di un adeguato apporto sanguigno (Folkman J, 1992) ha portato a considerare la possibilità di utilizzare i meccanismi della via angiogenica come

target terapeutico; in particolare, è stato utilizzato il recettore del VEGF come bersaglio di un anticorpo monoclonale, il bevacizumab, che risulta avere una modesta efficacia in casi di tumore del colon, della mammella e del polmone (Hurwitz H et al., 2004; Bergers G and Hanahan D, 2008), ma che non ha dato risultati soddisfacenti per quel che riguarda l'ACC (Wortmann S et al., 2010). Di più recente sviluppo sono, poi, gli inibitori dell'attività tirosin-chinasica diretti contro il VEGFR, quali sunitinib e sorafenib; anch'essi, però, non sembrano apportare miglioramenti significativi nel trattamento dell'ACC (Quinkler M et al., 2011; Berruti A et al., 2012).

Antagonisti della via di segnalazione Wnt/ β -catenina. L'importanza del ruolo della segnalazione Wnt/ β -catenina nello sviluppo di molti tipi di tumore è alla base dell'interesse nella ricerca di agenti in grado di inibire questa via. In particolare, a partire dai dati sul coinvolgimento della β -catenina nella patogenesi dell'ACC, è stato sviluppato un inibitore della formazione del complesso trascrizionale TCF/ β -catenina, il PKF115-584, che è stato testato sulla linea cellulare tumorale H295R: si è osservato che tale composto è in grado di inibire la proliferazione delle cellule, bloccandone l'entrata nella fase S del ciclo cellulare ed inducendo apoptosi. Tale molecola agisce anche annullando l'effetto pro-proliferativo del fattore SF-1 (Doghman M et al., 2008). Un'altra molecola scoperta durante lo screening di possibili agenti inibenti la segnalazione di Wnt è il composto CWP232291: esso agisce, sia *in vitro* che *in vivo*, inducendo la degradazione della β -catenina in modelli pre-clinici di mieloma multiplo (Cha JY et al., 2010). Nonostante questi risultati siano promettenti, l'uso di inibitori della segnalazione di Wnt viene considerato con cautela, dato il coinvolgimento di questa via in molti processi cellulari e, di conseguenza, la possibilità che si determinino effetti tossici collaterali nell'uso di inibitori di tale via (Garber K, 2009).

Tiazolidinedioni (TZD). I Tiazolidinedioni (TZD) sono una classe di farmaci antidiabetici in grado di ridurre l'insulino-resistenza e la cui azione è mediata dal loro legame con il fattore di trascrizione nucleare ligando-dipendente PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor): una volta attivato, esso dimerizza con il recettore X dell'acido retinoico 9-cis ed il complesso così formato si lega allo specifico response element (PPRE, "PPAR- γ Response Element") a livello del promotore dei geni bersaglio (Jude-Aubry C et al., 1997; Reginato MJ et al., 1998). Oltre ai ben noti effetti sull'up-take del glucosio e sull'adipogenesi (Miyazaki Y et al., 2001a; 2001b; 2002), i TZD, a dosi più alte, sembrano agire anche sulla crescita di tumori solidi, inibendo la proliferazione ed inducendo la

differenziazione cellulare (Blanquicett C et al., 2008). Nel caso dei tumori corticosurrenalici, i livelli di espressione del PPAR- γ negli ACC non risultano diversi rispetto a quelli dei tumori benigni e della surrene sana. I TZD, in particolare il Rosiglitazone (RGZ) ed il Pioglitazone (PGZ), mostrano azione anti-proliferativa sia *in vitro* che *in vivo* (Betz MJ et al., 2005; Ferruzzi P et al., 2005; Cantini G et al., 2008; Luconi M. et al., 2010); inoltre, è stato osservato che il Rosiglitazone è in grado di indurre il processo di autofagia nella linea cellulare H295R, di deregolare il ciclo cellulare nella linea SW13 (Cerquetti L et al., 2011) e di avere azione inibitoria sull'espressione dell'enzima steroidogenico CYP11B2 e sulla produzione di aldosterone (Uruno A et al., 2011). Rimangono, tuttavia, da chiarire il meccanismo d'azione e le vie di segnalazione intracellulare coinvolti nella mediazione dell'effetto anti-tumorale di tali farmaci.

Agonisti inversi di SF-1. Il fattore SF-1 gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo delle gonadi e della surrene e nella regolazione dell'espressione degli enzimi steroidogenici; alterazioni nei suoi livelli di espressione sono state riscontrate in casi di ACC sia pediatrici che dell'adulto, suggerendo il suo coinvolgimento nella tumorigenesi corticosurrenalica (Lalli E, 2010; Schimmer BP and White PC, 2010). Doghman M. e collaboratori hanno testato alcuni agonisti inversi di SF-1, che si sono rivelati in grado di down-regolare in maniera selettiva la proliferazione SF-1-dipendente nelle cellule H295R e di inibire la produzione di ormoni steroidei (Doghman M et al., 2009), suggerendo la possibilità di considerare questo fattore come nuovo target terapeutico.

2.6. Aspetti genetici del carcinoma corticosurrenalico

2.6.1. Alterazioni cromosomiche e sub-cromosomiche

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nella comprensione della patogenesi dei tumori corticosurrenalici, e questi risultati sono stati raggiunti grazie all'avvento di differenti strategie:

1. Identificazione di alterazioni genetiche in rare sindromi familiari e conseguente valutazione della loro eventuale presenza anche nei tumori sporadici.
2. Studio delle vie di segnalazione che si sono rivelate importanti in altri tipi di tumore.
3. Utilizzo di tecniche altamente efficienti come il profilo di espressione genica, di metilazione e i microRNA per l'individuazione di nuove vie di segnalazione.

4. Studi mediante modelli animali con uno o più difetti genetici per una più approfondita conoscenza delle vie di segnalazione.

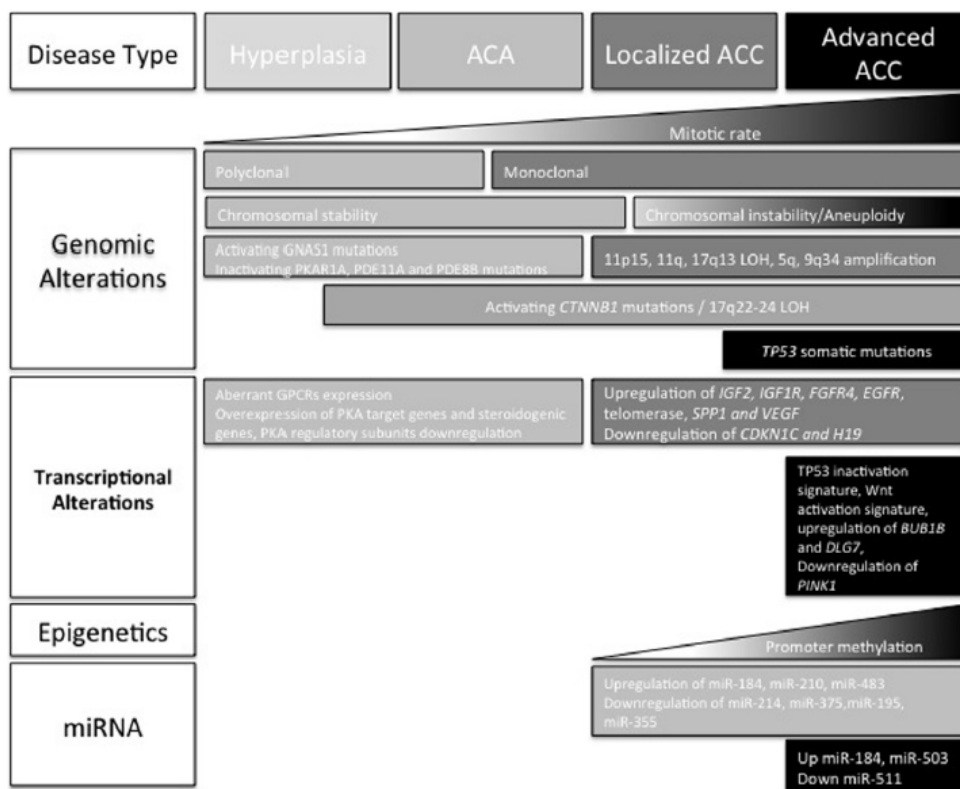


Figura 5: Rappresentazione schematica delle alterazioni molecolari coinvolte nell'insorgenza della patologia surrenalica. Alcune alterazioni, in comune tra gli ACC e le forme benigne (iperplasia e ACA), sono considerate eventi precoci nel processo tumorigenico, mentre alterazioni esclusive dell'ACC sono considerate eventi tardivi. Figura tratta da Lerario AM et al., Molecular and cellular endocrinology, 2014.

Comunemente l'ACC si presenta in forma sporadica, ma esistono alcune rare sindromi genetiche che predispongono all'insorgenza dei tumori corticosurrenalici: i geni che causano queste sindromi sono stati infatti trovati coinvolti anche nella tumorigenesi di alcuni ACT sporadici.

- la **Sindrome di Li-Fraumeni** è una patologia a trasmissione autosomica dominante, dovuta, nel 70% dei casi, a mutazioni germinali a livello del gene *TP53* (Birch JM et al., 1994; Varley JM et al., 1999; Soon PS et al., 2008a) che comportano l'incapacità dell'oncosoppressore di indurre l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA ed il processo di apoptosi in caso di danno al DNA (Herbet M et al., 2009). Tale sindrome si associa ad ACC nel 3-4% dei casi in età inferiore ai 20 anni (Soon PS et al., 2008a) e ad altri tumori, quali sarcomi

dei tessuti molli, osteosarcomi, tumore della mammella, tumori cerebrali, leucemia;

– la **Sindrome di Beckwith-Wiedemann** è dovuta ad un difetto dell'imprinting genomico a livello del braccio corto del cromosoma 11 (11p15), in un locus comprendente i geni *IGF-2* (Insuline-like Grow Factor 2), *CDNK1C* (Cyclin-Dependent Kinase inibitor 1C; *p57kip2*) e *H19*, che spesso comporta la perdita del locus materno e l'amplificazione di quello paterno (Barlaskar FM and Hammer GD, 2007). Il 5% di pazienti con la S. di Beckwith-Wiedemann sviluppa ACC così come altri tumori, compresi il neuroblastoma, l'epatoblastoma, il rabdomiosarcoma (Soon PS et al., 2008a);

– la **Sindrome MEN-1 (Multiple Endocrine Neoplasia type 1)** è causata da mutazioni inattivanti nel gene *MEN 1* (11q13), a cui si associano tumori ipofisari, tumori delle paratiroidi, tumori del pancreas endocrino (Thakker RV, 1998), ma anche un elevato rischio di sviluppare lipomi, angiomi e tumori corticosurrenali, soprattutto adenomi (Skogseid B et al., 1992; Burgess JR et al., 1996; Barzon L et al., 2001; Waldmann J et al., 2007) e, raramente, carcinomi (Skogseid B et al., 1992; Burgess JR et al., 1996; Waldmann J et al., 2007; Soon PS et al., 2008a);

– la **Sindrome di Carney** è dovuta all'insorgenza di mutazioni inattivanti a livello del gene *PRKAR1A* (Protein Kinase A Regulatory subunit), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q22-24), che si riscontrano in casi sporadici di ACC (Bertherat J et al., 2003);

– l'**iperplasia surrenale congenita (CAH)** è una malattia autosomica recessiva causata dalla mancanza di un enzima nella via di sintesi del cortisolo, generalmente la 21 β -idrossilasi, che determina un aumento della stimolazione della corticale surrenalica da parte di CRH ed ACTH, con conseguente iperplasia, eccessiva produzione dei precursori del cortisolo ed elevati livelli di androgeni; raramente si associa allo sviluppo di ACC;

– la **Sindrome di McCune-Albright (MAS)** è caratterizzata da mutazioni a carico del gene *GNAS-1*, responsabili di un'attivazione costituzionale della proteina G α e della via di segnalazione di cAMP (Weinstein LS et al., 1991) con conseguente aumento della crescita e dell'attività cellulare (Schwindinger WF et al., 1992; Ringel MD et al., 1996); questa patologia è caratterizzata da displasia fibrosa che coinvolge più ossa, macchie caffelatte, pubertà precoce ed eccessiva produzione di ghiandole endocrine multiple (tiroide, ghiandole surrenaliche,

ipofisi) (Weinstein LS et al., 1991). Nei tumori corticosurrenali sono state trovate poche mutazioni somatiche GNAS.

– la **Sindrome di Gardner** è causata da mutazioni germinali inattivanti il gene APC (Nishisho L et al., 1991), regolatore a valle della via di segnalazione di Wnt, che agisce come classico gene soppressore tumorale contrastando l'attivazione di Wnt. Questa patologia è caratterizzata dallo sviluppo di polipi multipli a livello del colon con un aumentato rischio di sviluppare precocemente il tumore al colon, l'ipertrofia congenita dell'epitelio pigmentato della retina, denti soprannumerari, osteomi del cranio e molti tipi di differenti tumori, inclusi quello gastrico, dell'intestino tenue, periampollare, fibrosarcoma, astrocitoma e papillare della tiroide (Nishisho L et al., 1991; Half E et al., 2009). Inoltre, si è visto che una quota considerevole di pazienti sviluppa iperplasia nodulare bilaterale della corteccia surrenalica, generalmente benigna e non funzionante, ma sono stati descritti anche ACC (Marshall WH et al., 1967; Kartheuser A et al., 1999).

– la **Sindrome di Lynch** è una malattia genetica autosomica dominante caratterizzata da un alto rischio di sviluppare il tumore del colon retto. La base molecolare di questa sindrome è costituita da mutazioni a livello dei geni coinvolti nella riparazione del DNA, in particolare nei geni MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (Karamurzin Y et al., 2012). Oltre al tumore del colon retto, tra i diversi tipi di tumore che sono stati associati a questa sindrome è stato descritto anche l'ACC.

– **Neurofibromatosi di tipo 1** (Wagner AS et al., 2005) e **sindrome di Werner** (Takazawa R et al., 2004) sono state raramente trovate associate ad ACT. In particolare, deve ancora essere determinato il relativo contributo dei difetti molecolari caratteristici di queste sindromi agli ACC sporadici.

La comprensione delle relazioni tra l'ACC e le sindromi tumorali ereditarie ha permesso di progredire nella conoscenza dei meccanismi della tumorigenesi e nella conseguente identificazione di nuovi possibili target terapeutici.

2.6.2. L'origine clonale degli act

Lo studio della clonalità tumorale è un importante prerequisito per stabilire l'origine cellulare dei tumori e per identificare i meccanismi coinvolti nella progressione tumorale. La policlonalità è indice che le cellule tumorali sono sotto

l'influenza di stimoli locali o sistemici, e che, in seguito a questo, accumulano mutazioni genetiche successive, mentre la monoclonalità indica che la progressione tumorale è il risultato finale di una mutazione genetica intrinseca. Per studiare la clonalità tumorale è stata condotta un'analisi del pattern di inattivazione del cromosoma X nel tessuto tumorale derivato da pazienti femmine eterozigoti: questo tipo di analisi è basato sul rationale che solamente un singolo cromosoma X è attivo in ciascuna cellula somatica femminile; di conseguenza, o il cromosoma X materno o quello paterno sono inattivati, in maniera casuale, e questa condizione viene trasmessa stabilmente alla cellula progenitrice (Lyon MF, 1988). Dal momento che l'inattivazione del cromosoma X è casuale, ci si aspetta un'identica proporzione di cellule con il cromosoma X materno e paterno: la presenza di cromosomi X solo materni o paterni in tutte le cellule è indice di monoclonalità del tumore. Da questo studio è emerso che l'ACC è costituito da popolazioni di cellule monoclonali, mentre gli adenomi possono essere sia monoclonali che policlonali (Gicquel C et al., 1994; Beuschlein MH et al., 1994). La presenza di ACA sia monoclonali che policlonali potrebbe essere il risultato di meccanismi patologici differenti oppure di stadi diversi di un processo multi-step comune. Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che la tumorigenesi corticosurrenale sia il risultato di una serie di eventi: fattori estrinseci come fattori di crescita o mitogenici potrebbero promuovere la crescita di una popolazione di cellule tumorali policlonali o parzialmente monoclonali che sarebbero così più suscettibili a mutazioni a livello degli oncogeni e dei geni soppressori tumorali: a questo punto un secondo evento, come una mutazione, potrebbe conferire un vantaggio proliferativo ad un sub-clone di cellule (Gicquel C et al., 2000).

Queste alterazioni genetiche possono essere studiate a livello dell'intero genoma, mediante l'utilizzo di tecniche molecolari come la CGH (comparative genomic hybridization), che permette l'identificazione di anomalie a livello dei cromosomi o piccole variazioni del contenuto di piccole porzioni di essi, l'analisi dei microsatelliti e la LOH.

La CGH è una tecnica molecolare citogenetica che si è dimostrata essere un valido approccio per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche strutturali nei tumori, in particolare per guadagni o perdite di copie di sequenze del DNA (Kallioniemi A et al., 1992). Regioni con guadagni possono includere potenziali proto-oncogeni, mentre regioni con perdite di copie di sequenze possono contenere geni soppressori tumorali. Diversi studi hanno evidenziato differenze significative tra gli ACA e gli ACC (Kjellman M et al., 1996; Sidhu S et al., 2002;

Zhao J et al., 1999; Dohna M et al., 2000): mentre gli ACA sono caratterizzati da poche regioni che presentano perdite o guadagni cromosomici, gli ACC mostrano alterazioni cromosomiche complesse. E' stata inoltre trovata una correlazione positiva tra il numero delle aberrazioni e le dimensioni del tumore negli ACC: questo, probabilmente, è indice del fatto che le alterazioni cromosomiche si accumulano durante la progressione tumorale (Sidhu S et al., 2002). Più recentemente, uno studio condotto mediante l'utilizzo della tecnica Array-CGH ad alta risoluzione per verificare il valore prognostico e diagnostico delle aberrazioni cromosomiche riscontrate nei tumori corticosurrenali (Barreau O et al., 2013) ha confermato la presenza di un maggior numero di alterazioni negli ACC (44%) rispetto agli ACA (10%). Negli ACC sono stati inoltre confermati i guadagni cromosomici più frequentemente osservati sui cromosomi 5,7,12,16,19 e 20 e le perdite sul 13 e sul 22; all'interno di queste regioni sono stati identificati geni ad alto potenziale mitogenico come il fattore di crescita dei fibroblasti 4 (FGF4), la chinasi ciclina-dipendente 4 (CDK4), e la ciclina E1 (CCNE1). In una coorte di pazienti indipendente è stato successivamente confermato il valore diagnostico di 6 loci (5q, 7p, 11p, 13q, 16q e 22q) nella differenziazione tra ACA e ACC (con una sensibilità del 100% e una specificità dell'83%) (Barreau O et al., 2013). Sebbene da questi studi emerga la presenza di diversità genetica ed eterogeneità dei guadagni e delle perdite cromosomiche negli ACC, i cromosomi 4,5,12,17 e 19, sui quali sono state riscontrate più frequentemente aberrazioni genetiche, contengono geni che promuovono o mantengono la trasformazione neoplastica. Nel complesso, quindi, i dati derivanti dall'utilizzo di questa tecnica supportano l'ipotesi della progressione da adenoma a carcinoma, secondo la quale un'attivazione di proto-oncogeni a livello del cromosoma 4 potrebbe costituire un evento precoce nella tumorigenesi surrenale, con progressione verso il carcinoma in seguito ad un'attivazione di oncogeni sui cromosomi 5 e 12 e inattivazione di geni soppressori tumorali come TP53 sul cromosoma 17p e altri geni sull'1p (Sidhu S et al., 2003).

L'analisi LOH è una tecnica applicata con successo all'identificazione dei geni soppressori tumorali (Larsson C et al., 1988) ed è stata utilizzata per studiare i loci cromosomici correlati alle sindromi familiari associate agli ACT. Numerosi studi di perdita di eterozigosità hanno mostrato che la LOH sui cromosomi: 17p13 (Gicquel C et al., 2001; Yano T et al., 1989; Soon PS et al., 2008) (LFS), 11p15 (Gicquel C et al., 1994, 2001; Yano T et al., 1989;) (BWS), 11q13 (Schulte KM et al., 1999, 2000; Kjellman M et al., 1999) (MEN1), 17q22-24 (Bertherat J et al., 2003) (CNC) e 2p16 (Kjellman M et al., 1999) (anch'essa CNC) si verifica più frequentemente negli ACC sporadici piuttosto che negli ACA. Alcuni di questi

studi hanno inoltre mostrato l'assenza di mutazioni dei geni coinvolti nello sviluppo delle sindromi ereditarie, e questo ha indotto a ipotizzare la presenza di altri geni soppressori tumorali all'interno di questi loci e un loro coinvolgimento nella patogenesi degli ACC sporadici.

2.6.3. Mutazioni somatiche

Le alterazioni genetiche che permettono lo sviluppo neoplastico coinvolgono due classi di geni: gli oncogeni e i geni soppressori tumorali.

Oncogeni

Questi geni normalmente funzionano modulando la crescita cellulare e la differenziazione, ma in seguito ad alterazioni perdono la loro capacità. Gli oncogeni codificano fattori di crescita, recettori di fattori di crescita, con e senza attività tirosin-chinasica, proteine di trasduzione del segnale legate alla membrana, chinasi serino-treoniniche citoplasmatiche e fattori di trascrizione nucleari. Mutazioni a carico di questi geni, amplificazioni o traslocazioni cromosomiche determinano crescita cellulare o trascrizione anomala.

- **IGF-II e il locus 11p15**

Il gene IGF-II è localizzato sul braccio corto del cromosoma 11 (11p15), una regione organizzata in due differenti clusters: un dominio telomerico, che include i geni IGF-II (53) e H19 (54), e un dominio centromerico che comprende il gene CDKN1C (p57kip2) (55,56). Il gene IGF-II codifica un importante fattore di crescita fetale, è regolato attraverso il processo di imprinting materno e di conseguenza viene espresso solamente dall'allele paterno (53). Il messaggero del gene H19 non viene tradotto e questo RNA sembra svolgere un'azione di modulazione dell'espressione dell'IGF-II, anche se il ruolo esatto di questo gene nella tumorigenesi surrenalica rimane ancora sconosciuto. Il gene p57kip2 codifica un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti della famiglia CIP/KIP coinvolto nella fase G1/S del ciclo cellulare: la soppressione della sua espressione risulta associata ad un'iperespressione e ad una conseguente iperattivazione delle cicline G1 e delle chinasi da esse dipendenti (CDK) che determinano un'interruzione della regolazione del ciclo cellulare. Anche i geni CDKN1C e H19 sono regolati dall'imprinting parentale, ma, a differenza del gene IGF-II, vengono espressi esclusivamente dall'allele materno; la loro espressione è elevata nei tessuti surrenalici sani mentre risulta soppressa nella maggior parte dei tumori maligni (Gicquel C et al., 1997; Liu J et al., 1997;

Bourcigaux N et al., 2000). L'IGF-II è invece iperespresso in circa il 90% degli ACC (Libe R et al., 2007) ed è stato dimostrato che alterazioni strutturali somatiche del locus 11p15, come l'isodisomia paterna (perdita dell'allele materno e duplicazione dell'allele paterno) o la perdita dell'imprinting a causa della demetilazione dell'allele materno sono le cause dell'iperpressione di questo gene (Ogawa et al., 1993; Rainer et al., 1993).

- **L'oncogene RAS**

Le proteine Ras sono proteine associate alla membrana, che appartengono ad una classe di proteine chiamate piccole GTPasi (small GTPase) coinvolte nella trasmissione del segnale in seguito alla stimolazione di un recettore tirosin-chinasico da parte del ligando. La famiglia delle proteine ras è composta da tre membri, H, N e K: ad oggi sono state riscontrate mutazioni di KRAS (Lin SR et al., 1998) e HRAS (Yano T et al., 1989) in un numero ristretto di ACC, mentre mutazioni a carico di NRAS sono state trovate sia negli adenomi che nei carcinomi (Yashiro T et al., 1994). Nei tumori in cui sono presenti mutazioni a livello di questo gene, si osserva una diminuzione dell'attività GTPasica intrinseca della proteina, con conseguente aumento dei segnali proliferativi.

Ras risulta essere uno tra gli oncogeni più comunemente mutati nei tumori umani (Shields JM et al., 2000).

- **Fattori di crescita**

Diversi fattori di crescita e citochine oltre a quelli del sistema IGF hanno mostrato essere implicati nella regolazione della crescita e della normale funzione della ghiandola surrenalica adulta e fetale: sono stati pertanto indagati anche per un loro possibile ruolo nell'insorgenza e nello sviluppo del carcinoma corticosurrenalico. Questi fattori di crescita includono il fattore di crescita basico dei fibroblasti (b-FGF), fattore di crescita trasformante- α , TGF- α) e il fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), e interleuchine (Hotta M & Baird A, 1986; Feige JJ et al., 1991; 1998; Ilvesmaki V et al., 1993b; Weber MM et al., 1997a,b; de Fraipont F et al., 2000; Turner HE et al., 2003).

b-FGF2

Tra questi fattori di crescita, il b-FGF2 potrebbe rappresentare il principale candidato da valutare nei tumori corticosurrenalici dal momento che è altamente espresso nei tessuti surrenalici e rappresenta uno tra i più potenti mitogeni per la coltura cellulare della surrene adulta e fetale (Mesiano S et al.,

1991; Feige JJ et al., 1998). Nelle ghiandole surrenali fetali umane Mesiano e collaboratori (Mesiano S et al., 1993) hanno mostrato un effetto mitogenico cooperativo tra l'IGF-II e il b-FGF2. E' stato anche dimostrato che il b-FGF2 è mitogenico per la linea cellulare H295R, regola l'espressione sia dell'IGFII che di IGFBP-2, e modula il processo di maturazione del pro-IGFII (Boulle N et al., 2000).

VEGF

L'angiogenesi gioca un ruolo importante nella crescita tumorale e nello sviluppo di metastasi. Attraverso lo studio dell'espressione del VEGF è possibile valutare lo status angiogenico di un tumore. Nell'ACC è stata osservata un'iperespressione di questo fattore di crescita rispetto agli adenomi surrenalici (deFraipont F et al., 2000; Bernini GP et al., 2002), che tuttavia non si accompagna ad un'elevata vascolarizzazione: ciò lascia quindi intendere che ci sia una dissociazione tra lo status angiogenico e le potenzialità neoangiogenetiche di questo tumore (Bernini GP et al., 2002). Inoltre, i livelli sierici del VEGF in pazienti con l'ACC sono risultati significativamente più alti rispetto a pazienti con adenomi o a soggetti normali (Kolomecki K et al., 2001). Sebbene sia stata osservata una considerevole diminuzione dei livelli sierici di VEGF già un mese dopo la chirurgia degli ACC (Kolomecki K et al., 2000), il suo impiego come marker tumorale deve ancora essere indagato.

EGFR

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) risulta iperespresso in oltre il 90% degli ACC, mentre gli ACA lo esprimono solo debolmente (Kamio T et al., 1990; Nakamura M et al., 2009). Tuttavia, non sono state identificate mutazioni a livello del gene EGFR e l'espressione del recettore non correla con l'andamento clinico dei pazienti con ACC (Adam P et al., 2010). E' stato osservato che l'inibizione della via di segnalazione dell'EGFR determina una considerevole inibizione della proliferazione nella linea cellulare di carcinoma corticosurrenalico H295R (Quinkler M et al., 2008). Risulta inoltre ben documentata la presenza di un efficiente crosstalk tra le vie di segnalazione dell'IGF1R e dell'EGFR (Huang F et al., 2009): è stato infatti dimostrato che tumori sensibili agli inibitori dell'IGF1R innescano una rapida up-regolazione della segnalazione attraverso il sistema EGFR come meccanismo di resistenza. Per questo motivo, utilizzare come bersaglio entrambe queste vie di segnalazione potrebbe costituire un valido approccio razionale per potenziare l'efficacia dei singoli farmaci.

TGFβ1

Il fattore di crescita trasformante-β1 (TGFβ-1), un altro modulatore multifunzionale della crescita cellulare, è implicato nell'inibizione della proliferazione delle cellule epiteliali e regola l'accrescimento e la normale funzione della surrene adulta e fetale. Due studi differenti hanno dimostrato una riduzione dell'espressione del messaggero del TGF-β1 negli ACC, mentre non sono state riscontrate differenze (né mutazioni) a livello del recettore di questo fattore di crescita (Bocuzzi A et al., 1999; Arnaldi G et al., 2000).

TGFα

Il fattore di crescita trasformante-α si ritrova espresso a livello delle lesioni corticosurrenali che, anche se non sono state trovate marcate differenze tra i tumori maligni e quelli benigni: questo dato suggerisce che l'effetto promuovente la crescita di questo fattore potrebbe non essere specifico per questa tipologia di tumori (Sasano H et al., 1994).

Interleuchine

E' stato analizzato anche il ruolo delle citochine nella ghiandola surrenalica, ma per quanto riguarda il carcinoma sono necessari studi più approfonditi.

Alcune interleuchine, in particolare, l'IL-3 e l'IL-6, si sono dimostrate coinvolte nella produzione degli ormoni steroidei e nella proliferazione delle cellule della corteccia surrenalica. Attraverso il suo recettore, l'IL-3 è capace di mediare la produzione di steroidi, che è risultata essere dipendente dalla via di segnalazione della lipo-ossigenasi: trattando le cellule surrenaliche con l'indometacina si determina infatti un blocco dell'azione citochinica. L'IL-6 agisce in maniera simile, ma l'effetto è mediato dalla via di segnalazione della ciclo-ossigenasi (Michl P et al., 2000; Weber MM et al., 1997).

- **Il fattore steroidogenico 1 (SF-1)**

L'SF-1 è un fattore di trascrizione nucleare, che svolge un ruolo determinante nello sviluppo e nella funzionalità dei tessuti steroidogenici e nella regolazione dell'espressione dell'enzima steroidogenico citocromo p450 nella corteccia surrenalica (Schimmer BP et al., 2010; Lalli E, 2010). Sia negli ACC pediatrici che in quelli adulti è stata ampiamente dimostrata un'iperespressione di SF-1, e questo fornisce una prova della presenza di una correlazione con la tumorigenesi corticosurrenalica (Pianovski MA et al., 2006; Figueiredo BC et al., 2005). L'iperespressione di questo fattore trascrizionale però sembra non essere correlata con lo status funzionale dei tumori

surrenali, ma, a livello delle cellule tumorali surrenaliche, le sue funzioni si associano piuttosto alla modulazione della proliferazione cellulare e all'apoptosi anziché alla steroidogenesi (Almeida MQ et al., 2010; Doghman M et al., 2007).

Recentemente, il gruppo di Almeida (Almeida MQ et al., 2010) ha valutato l'espressione proteica di SF-1 in una coorte di pazienti pediatrici ed adulti e ha confermato una maggior frequenza di amplificazione genica e di iperespressione di SF-1 nei tumori pediatrici rispetto agli adulti: negli adulti, quindi, l'espressione di questo fattore potrebbe essere causata da meccanismi addizionali oltre all'amplificazione genica (Almeida MQ et al., 2010). E' stato inoltre dimostrato che l'aumentata espressione di SF-1 promuove la proliferazione di cellule umane di tumore corticosurrenalico in vitro e innesca la tumorigenesi nei topi (Doghman M et al., 2007; Lichtenauer UD et al., 2007). inoltre, la sua espressione come marker prognostico stadio-indipendente correla significativamente con un andamento clinico negativo in una coorte di ACC adulti (Sbiera S et al., 2010).

Geni soppressori tumorali

In contrasto agli oncogeni, i geni soppressori tumorali svolgono un effetto inibitorio sulla crescita cellulare e sulla sopravvivenza. In accordo all'ipotesi "2-colpi" di Knudson (Knudson AG Jr, 1971), entrambi gli alleli di un gene soppressore tumorale devono essere inattivati affinché il gene in questione prenda parte al processo di tumori genesi. In coloro che presentano una forma ereditaria di malattia, il primo colpo è costituito da una mutazione a livello germinale e pertanto presente in tutte le cellule del corpo; il secondo colpo consiste in una mutazione o in una delezione nel rimanente allele wild-type che si verifica a livello somatico e che predispone di conseguenza alla formazione del tumore.

- **Il gene TP53**

L' oncosoppressore tumorale TP53 rappresenta il gene più frequentemente mutato nei tumori umani (Hollstein M et al., 1991): mutazioni somatiche a carico di questo gene si riscontrano in circa la metà di tutti i tumori umani (Brosh R and Rotter V, 2009; Vogelstein B et al., 2000). Il gene TP53 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 (17p13) e codifica una proteina di 393 aminoacidi, p53, che agisce come fattore trascrizionale, regolando l'espressione di una grande varietà di geni, tra cui p21, mdm1, gadd45, ciclina G, bax, IGF2, IGFBP2 e IGFBP3. (Levine AJ, 1997). TP53 agisce controllando la crescita cellulare e regolando l'integrità genomica: in seguito alla sua attivazione,

innescata da stress genotossico (ad esempio fattori carcinogenici o raggi X) o da stress non genotossico come l'ipossia, induce l'espressione di geni target coinvolti nell'arresto del ciclo nella fase G1/S e nell'apoptosi (Pluquet O and Hainaut P, 2001). Mutazioni a livello germinale del gene TP53 sono presenti generalmente nelle regioni altamente conservate degli esoni 5-8 (Freboung T et al., 1995), e si sono riscontrate anche negli ACC sporadici, con una frequenza del 20-27% (Ohgaki H et al., 1993; Reincke M et al., 1994). Inoltre, questa mutazione si ritrova nel 70% dei pazienti con Sindrome di Li-Fraumeni, tra i quali la frequenza degli ACC è pari al 4% (Varley JM et al., 1999; Hisada M et al., 1998). Mutazioni somatiche di TP53 sono state riscontrate in un 20-35% dei casi di ACC sporadici negli adulti, (Reincke M et al., 1994; Libe R et al., 2007): studi di trascrittomica hanno permesso di progredire nella comprensione del ruolo di p53 nello sviluppo degli ACC sporadici, portando all'identificazione di un sottogruppo di ACC con caratteristiche di elevata aggressività in cui sono più frequenti mutazioni a carico di TP53 e risultano sottoespressi i geni regolati dall'oncosoppressore (quali RRM2B, TP53INP1, MDM2) (Ragazzon B et al., 2010). Si pensa quindi che la mutazione a livello di questo gene rappresenti un evento tardivo nell'evoluzione della trasformazione maligna negli ACT sporadici.

La maggioranza delle mutazioni di TP53 si sviluppa a livello del dominio di legame al DNA, mentre sono meno comuni quelle a carico del dominio di oligomerizzazione (Lomax ME et al., 1998); tra queste ultime, è stata ampiamente studiata la mutazione R337H, che si riscontra comunemente come mutazione germinale nei bambini con ACC nel Sud del Brasile (Ribeiro RC et al., 2001): tra i portatori della mutazione, uno su dieci sviluppa ACC. In questi casi, si verifica una perdita di eterozigotità (LOH) sull'allele wild-type, con la conservazione dell'allele mutato R337H (Figueiredo BC et al., 2006). Sono state descritte anche altre numerose mutazioni missense (Chompret A et al., 2000), così come mutazioni nonsense e delezioni di TP53 (Ohgaki H et al., 1993; Reincke M et al., 1994; Sidhu S et al., 2005; Rossbach HC et al., 2008; Barzon L et al., 2001).

La perdita di eterozigotità sul braccio corto del cromosoma 17 è stata ritrovata nell'80% degli ACC, ma non sempre correla con la presenza della mutazione TP53 (Libe R et al., 2007; Gicquel C et al., 2001): questo porta ad ipotizzare la presenza di un altro soppressore tumorale a livello di questo locus.

Nella linea cellulare di tumore corticosurrenalico, H295R, p53 svolge un ruolo nella regolazione della funzionalità steroidogenica attraverso l'up-

regolazione dell'espressione dei geni codificanti la 3 β -idrossisteroidodeidrogenasi (3 β HSD) e la proteina StAR (steroidogenic acute regulatory protein).

- **MEN1**

Il gene MEN1, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11 (11q13), svolge la funzione di soppressore tumorale. Mutazioni a carico di uno dei nove esoni codificanti predispongono alla neoplasia endocrina multipla: in circa il 90% delle famiglie affette da MEN1 è stata trovata una mutazione germinale inattivante, e tra queste, nel 25-40% dei casi i pazienti sviluppano tumori corticosurrenali e/o iperplasia (Kjellman M et al., 1999; Schulte KM et al., 2000). Sono piuttosto rare anche le mutazioni somatiche del gene MEN1 nei tumori corticosurrenali (Heppner C et al., 1999; Schulte KM et al., 2000), mentre la perdita di eterozigotà sul braccio lungo del cromosoma 13 è stata invece riscontrata in oltre l'80% degli ACC (Kjellman M et al., 1999): ciò suggerisce che all'interno di questa regione cromosomica potrebbe essere presente qualche altro gene soppressore tumorale coinvolto nella tumorigenesi. In alternativa, la LOH del locus 11q13 potrebbe riflettere un fenomeno globale di instabilità cromosomica, dal momento che larghe porzioni del cromosoma 11 vengono frequentemente perse.

- **Il gene PRKAR1A**

La subunità regolatoria R1A della protein chinasi A (PRKAR1A) è una componente fondamentale della via di segnalazione dell'AMP ciclico che è coinvolta nella tumorigenesi endocrina (Bertherat J, 2001; Bossis I et al., 2004). Questo gene, che è localizzato sul locus 17q22-24, è implicato nello sviluppo di una sindrome ereditaria, denominata il Complesso di Carney (CNC) (Kirschner LS et al., 2000a,b). Mutazioni germinali inattivanti di questo gene sono state ritrovate in circa il 45-65% delle famiglie con CNC (Kirschner LS et al., 2000b; Veugelers M et al., 2004). È stata dimostrata la presenza di mutazioni somatiche a carico di questo gene in adenomi corticosurrenali sporadici secernenti, così come il fenomeno di LOH a livello del locus 17q22-24; negli ACC, invece, le delezioni sembrano coinvolgere un' estesa porzione del braccio lungo del cromosoma 17, e questo suggerisce che eventuali alterazioni di *PRKAR1A* svolgano solamente un ruolo minore nella crescita dei tumori corticosurrenali maligni (Bertherat J et al., 2003).

- **Il recettore dell'ACTH**

Il recettore dell'ACTH (ACTH-R) appartiene alla superfamiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G. La proteina-G trimerica è

composta da tre diverse catene polipeptidiche (α , β e γ) ed è responsabile della trasduzione del segnale transmembrana in seguito all'attivazione dell'ACTH-R da parte del ligando. L'attivazione del recettore, chiamato MC2R, causa la dissociazione della proteina G stimolatoria eterotrimerica (Gs), con conseguente rilascio della subunità α e stimolazione dell'adenil-ciclastasi; questo enzima, a sua volta, determina la produzione di AMP ciclico (cAMP) dall'ATP. L'AMP ciclico si lega a questo punto alla subunità regolatoria della PKA causando il rilascio delle subunità catalitiche con conseguente trasduzione del segnale attraverso la fosforilazione, e quindi l'attivazione, dei fattori di trascrizione responsabili dell'induzione dell'espressione genica degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi.

L'interazione dell'ACTH con il suo recettore MC2R è anche alla base della differenziazione delle cellule progenitrici in cellule corticoidi secernenti: bloccando il recettore, si determinano atrofia della corticale surrenalica e riduzione della produzione di glucocorticoidi ed aldosterone (Chida D et al., 2007).

Sono state trovate poche mutazioni a livello di questa via di segnalazione nei tumori corticosurrenalici, (Light K et al., 1995; Latronico AC et al., 1995): ciò suggerisce che l'attivazione dell'ACTH-R e della via di segnalazione a valle sia implicata nella differenziazione cellulare e nella secrezione degli ormoni steroidei piuttosto che nella progressione tumorale.

Un ulteriore sostegno a questo paradigma deriva da uno studio di Reincke e collaboratori (Reincke M et al., 1997), in cui viene esaminata la perdita allelica dell'ACTH-R in 16 tumori benigni e in 4 tumori maligni: la LOH è stata osservata in due dei quattro tumori, ma non negli adenomi iperfunzionanti; l'espressione del recettore invece, valutata sulla base della quantizzazione del messaggero corrispondente, sembra essere upregolata in adenomi corticosurrenalici funzionanti e downregolata in adenomi non funzionanti e negli ACC (Reincke M et al., 1997; 1998). Questi dati suggeriscono quindi un ruolo del recettore nel processo di de-differenziazione cellulare che caratterizza questi tumori.

- **Il gene p16**

Il gene soppressore tumorale p16 è localizzato all'interno della regione cromosomica 9p21 ed è interessato frequentemente da mutazioni nelle linee cellulari di tumori maligni umani. P16 codifica un inibitore delle ciclina chinasi che si lega alle chinasi ciclina dipendenti 4 e 6 e determina l'arresto del ciclo

cellulare dalla fase G1 alla fase S. Da uno studio del 1999 è emerso che la perdita di eterozigotà sul locus 9p21 è presente in quasi la metà degli ACC considerati (tre su sette) e l'immoistochimica per p16 eseguita successivamente ha mostrato assenza di colorazione nei tumori con LOH: questi risultati spingono ad attribuire a questo gene un ruolo nella progressione dei tumori corticosurrenalici (Pilon C et al., 1999), tuttavia studi successivi non hanno confermato questi risultati. Sono quindi necessari ulteriori approfondimenti per chiarire il ruolo di p16 nella tumorigenesi surrenalica.

2.6.4. Vie di segnalazione coinvolte negli act

Beta-catenina

La via di segnalazione di Wnt svolge un ruolo importante nello sviluppo della corteccia surrenalica, e la β -catenina è una componente chiave di questa via di segnalazione (Kim AC et al., 2008). Wnt si lega al suo complesso recettoriale e inibisce così l'attivazione del complesso di degradazione della β -catenina composto da axina, proteina APC (Adenomatous Polyposis Coli) e dalla glicogeno sintasi chinasi 3b (GSK-3): questo porta ad un blocco della fosforilazione della β -catenina da parte della GSK-3 e ad un suo conseguente accumulo nel citoplasma. In seguito alla traslocazione nel nucleo, la β -catenina è disponibile per il legame con la famiglia dei fattori di trascrizione TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) e con le proteine Smad ed il fattore SF-1 (Steroidogenic Factor 1) nelle cellule ad attività steroidogenica (Gummow BM et al., 2003), e induce l'espressione genica di geni target di Wnt (Cadoret A et al., 2002; El Wakil A et al., 2011). Quando la via non è attivata, la quantità di β -catenina viene mantenuta bassa (è attivo il complesso di degradazione, che media una degradazione proteasoma-dipendente) e la sua localizzazione è a livello della membrana plasmatica, dove interviene nel processo di adesione inter-cellulare.

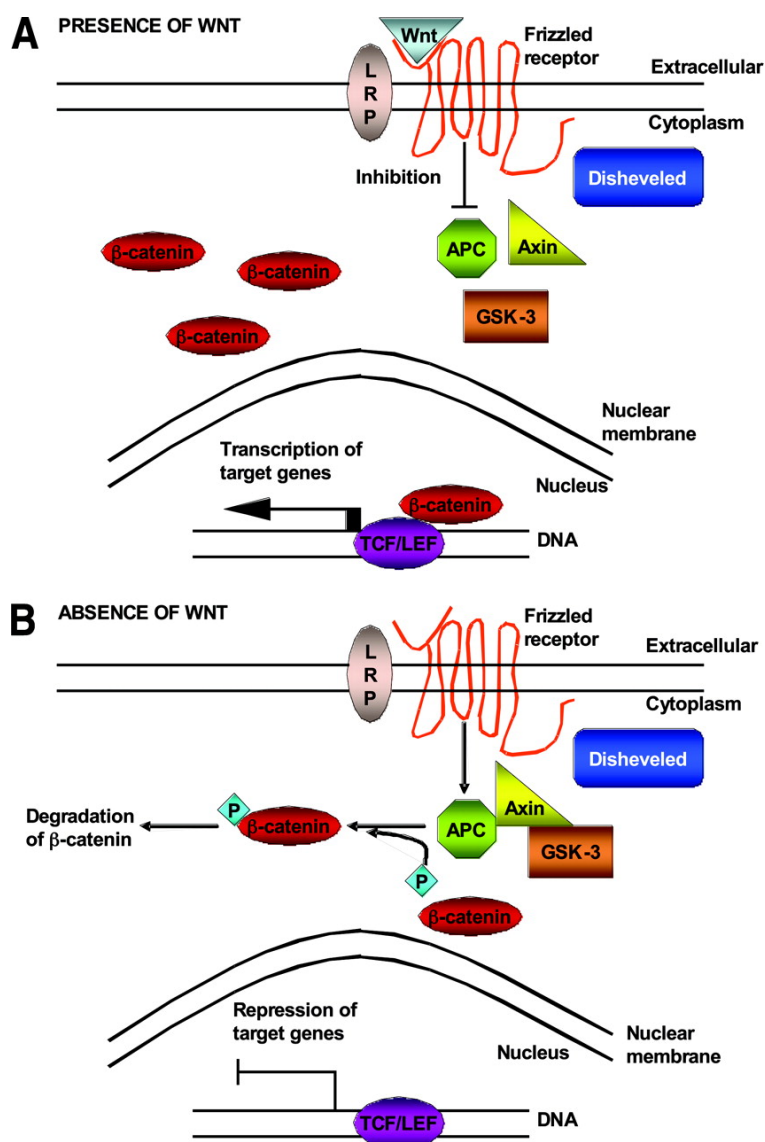


Figura 6: Rappresentazione schematica della via di segnalazione di Wnt. Tratta da Soon PSH et al., 2008, The Oncologist.

Alterazioni genetiche di questa via di segnalazione sono state inizialmente identificate nella poliposi adenomatosa familiare, FAP (familial adenomatous polyposis coli) ed estese successivamente a vari tipi di tumore (Kikuchi A, 2003); pazienti affetti da FAP, portatori di mutazioni germinali attivanti a carico del gene APC, possono sviluppare tumori corticosurrenalicci (Blaker H et al., 2004), ma un'aberrante attivazione della via di segnalazione di Wnt è stata osservata anche negli ACT sporadici: in un sottogruppo di questi tumori, le mutazioni somatiche a carico del gene della β-catenina (CTNNB1) determinano una riduzione o una completa inibizione della fosforilazione della β-catenina da parte della GSK-3, e questo porta ad un accumulo della proteina, che non viene più

normalmente degradata dal sistema dell'ubiquitina-proteasoma (Soon PS et al., 2008). L'accumulo della β -catenina è stato osservato frequentemente negli ACT sia benigni che maligni (Gauloux S et al., 2008; Tadjine M et al., 2008) ma mediante studi di immunohistochemica, è stato visto che negli ACC è presente con maggior frequenza una distribuzione anomala della β -catenina rispetto agli ACA. Negli ACC, inoltre, risultano iperespressi molti dei geni target della segnalazione di Wnt rispetto a quanto accade negli ACA (de Fraipont F et al., 2005; Velázquez-Fernández D et al., 2005; Slater EP et al., 2006; Giordano TJ et al., 2009; de Reyniès A et al., 2009). Tuttavia, poiché le mutazioni di *CTNNB1* non si riscontrano in tutti i casi di ACT positivi per la β -catenina nucleare, soprattutto per quanto riguarda gli adenomi, è probabile che esistano ulteriori meccanismi legati all'attivazione di Wnt in grado di determinare una stabilizzazione costitutiva della β -catenina e di promuovere lo sviluppo e la progressione tumorali. Inoltre, il fatto che le stesse mutazioni siano presenti sia negli adenomi che negli ACC suggerisce che alterazioni della via di segnalazione Wnt/ β -catenina non siano sufficienti per la formazione del carcinoma, pur rimanendo un fattore importante per il suo sviluppo: è stato, infatti, osservato che nelle cellule tumorali della linea H295R, presentanti una mutazione attivante della β -catenina, l'uso di un inibitore dei suoi effetti trascrizionali (PKF115-584) non solo determina un blocco della trascrizione dipendente dalla β -catenina e una inibizione della proliferazione cellulare ma annulla anche l'effetto degli aumentati livelli di SF-1 sulla proliferazione di queste cellule (Doghman M et al., 2008). Gli antagonisti della β -catenina rimangono tuttora in fase di studio preclinico e rimane da dimostrare la loro efficacia per il trattamento dell'ACC. È stato recentemente dimostrato che l'attivazione costitutiva della β -catenina in topi transgenici porta allo sviluppo di tumori benigni aldosterone-secernti e promuove lo sviluppo di tumori surrenalici (Berthon A et al., 2010): Ragazzon e collaboratori hanno suggerito che la presenza di alterazioni a livello di questa via di segnalazione rappresenti un fattore prognostico infausto negli ACC. (Ragazzon B et al., 2010).

Il sistema IGF

Il sistema dell'IGF è coinvolto nello sviluppo della corteccia surrenalica, dove svolge la funzione di promuovere la crescita cellulare e la differenziazione, ed è composto da due ligandi peptidici (IGF1 e IGF2), due recettori per l'IGF (IGF1R e IGF2R o recettore del mannosio 6-fosfato catione-indipendente) e sei proteine ad alta affinità di legame (proteine di legame IGF 1-6) (Hoeflich A et al., 2001; Samani AA et al., 2007).

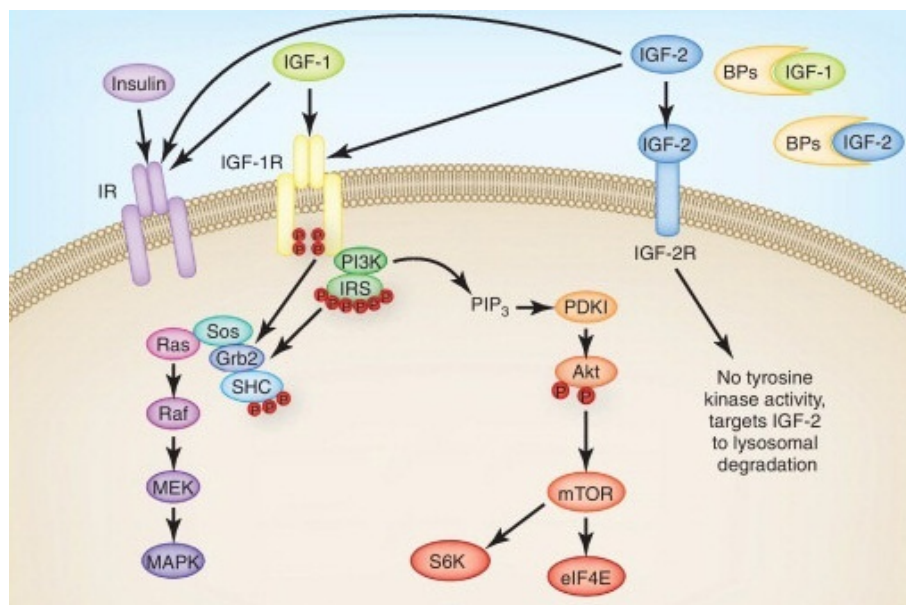


Figura 7: Via di segnalazione dell'IGF.

Sia l'IGF1 che l'IGF2 sono in grado di indurre la steroidogenesi nelle cellule della corteccia surrenalica *in vitro* e *in vivo*, ma non è stata dimostrata un'iperespressione dell'IGF1 negli ACC sporadici (Boulle N et al., 1998); di fatto, l'IGF2 è il gene maggiormente up-regolato nell'80-90% degli ACC, se comparati con gli ACA e con la corteccia surrenalica normale (de Fraipont F et al., 2005; Giordano TJ et al., 2003): livelli di espressione più alti sono stati associati con un fenotipo più maligno e con un maggiore rischio di sviluppare recidive (Boulle N et al., 1998; Gicquel C et al., 2001). Gli effetti dell'IGF2 sono limitati ai tumori, mentre a livello plasmatico le concentrazioni del fattore di crescita rimangono generalmente all'interno del range normale.

Gli effetti proliferativi dell'IGF-II sono mediati dal recettore del fattore di crescita 1 simile all'insulina (IGF1R), che è risultato anch'esso iperespresso nella maggior parte degli ACC (Weber MM et al., 1997), soprattutto nei casi pediatrici (Logie et al., 1999; Almeida et al., 2008; Doghman et al., 2010). Recentemente, Doghman e collaboratori hanno confermato l'iperespressione del recettore negli ACT pediatrici mostrando che la down-regolazione del miR-100 è uno dei meccanismi che sono alla base di questo fenomeno (Doghman M et al., 2010). Gli effetti biologici dell'IGF2 sono modulati *in vivo* da sei proteine di legame dell'IGF (IGFBP), che regolano negativamente o positivamente i fattori di crescita del sistema IGF in relazione alla loro quantità e affinità: cellule H295R e tumori corticosurrenalici che overesprimono l'IGF2 hanno mostrato anche elevati livelli

di IGFBP-2 (Boulle N et al., 1998), suggerendo un ruolo di questa proteina di legame nella regolazione degli effetti dell'IGF2 negli ACC. Inoltre, è stato dimostrato che i livelli di IGFBP2 correlano con lo stadio tumorale negli ACC (Boulle N et al., 2000).

La via di segnalazione di ACTH-cAMP-PKA

La via di segnalazione dell'adenilato ciclasi-ACTH è risultata coinvolta nella patogenesi degli ACT per diversi motivi. Il primo è che sono state ritrovate mutazioni attivanti dei componenti della via di segnalazione dell'adenilato ciclasi anche a livello di altri disordini endocrini umani, come l'adenoma tiroideo e l'acromegalia (Lyons J et al., 1990). In secondo luogo, esiste una correlazione tra i livelli di ACTH circolante e le dimensioni della ghiandola surrenalica, come è stato osservato in pazienti con iperplasia surrenale congenita (CAH) o con sindrome di Cushing (Rosenberg D et al., 2002). Infine, pazienti con CNC e MAS sono portatori di mutazioni a livello dei geni PRKAR1A e GNAS rispettivamente: entrambi i prodotti di questi geni sono componenti della via di segnalazione di cAMP (Kirschner LS et al., 2000; Lumbroso S et al., 2002).

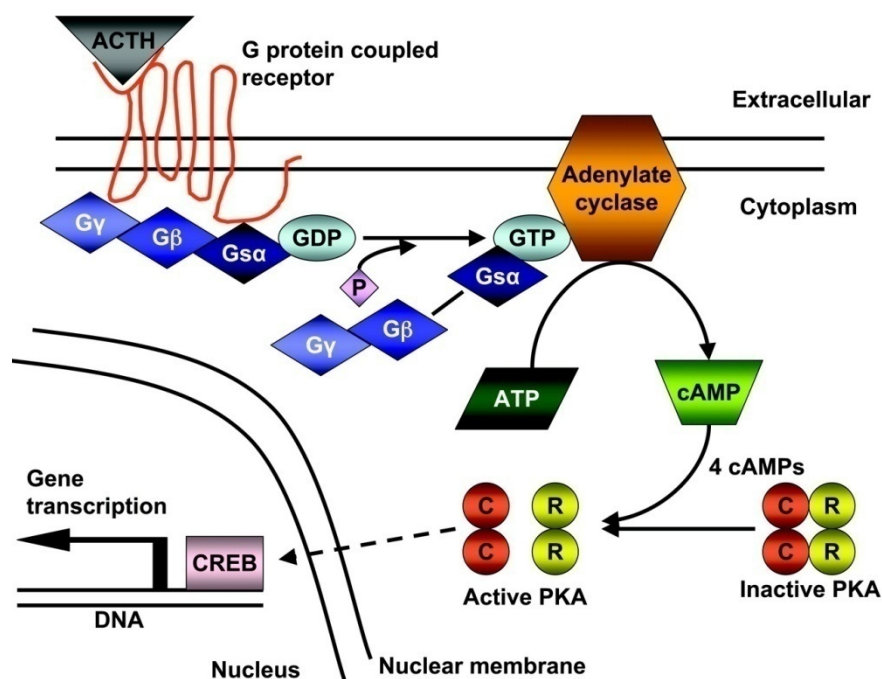


Figura 8: Rappresentazione schematica della via di segnalazione di ACTH, cAMP e PKA.. Tratta da Soon P S H et al. The Oncologist, 2008.

EGFR e la via di segnalazione RAS-RAF-MEK

Il ruolo della cascata di segnalazione del fattore di crescita epidermico (EGF) è stata largamente documentata in molti tipi di tumore, compresi i tumori al seno, al polmone e pancreatici. IL sistema EGF è stato studiato in un numero ristretto di tumori surrenalici, e l'espressione Uno studio abbastanza recente di Kotoula e collaboratori (Kotoula V et al., 2009) prende in considerazione la frequenza delle mutazioni del recettore dell'EGF (EGFR) e delle componenti immediatamente a valle del recettore negli ACC: in una casistica di ACC sono state identificate mutazioni nei componenti della via di segnalazione in 7 campioni su 35 (20%); tra di essi, due campioni sono risultati portatori di mutazioni del gene BRAF, quattro di mutazioni in EGFR, un campione aveva mutazioni di KRAS, e un altro campione due differenti mutazioni in NRAS. Questi dati necessitano di ulteriori conferme ma sono utili per comprendere l'importanza dello studio delle interazioni tra diverse vie di segnalazione, senza il quale non sarebbe possibile ottenere una visione completa dei meccanismi alla base dello sviluppo di questo tumore.

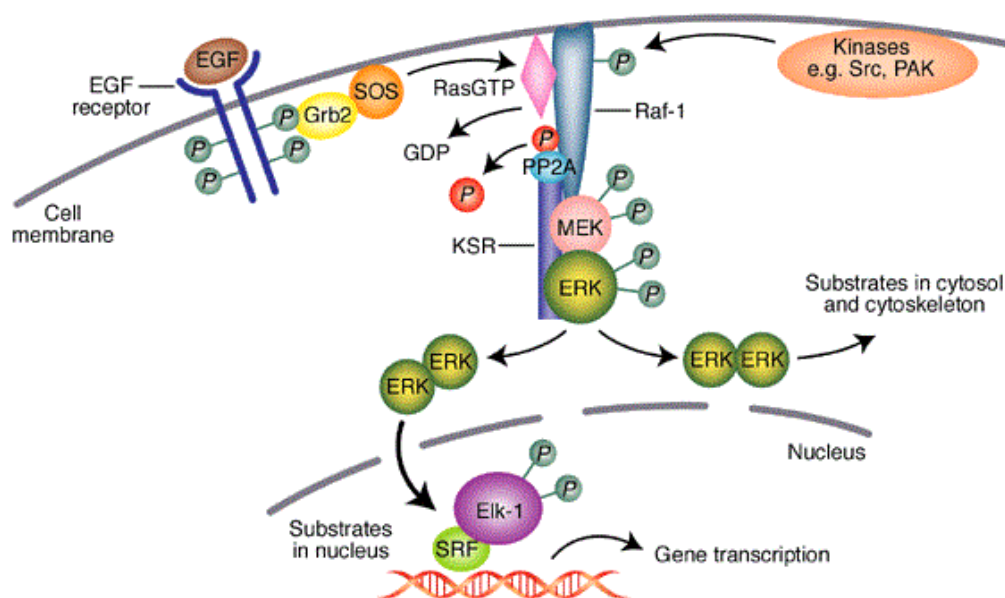


Figura 9: Rappresentazione schematica della via di segnalazione di Ras-Raf-MEK. Expert Reviews in Molecular Medicine © 2002.

2.6.5. Profili di espressione genica

Gli studi di espressione genica globale hanno lo scopo di identificare biomarkers che possano rivelarsi utili a livello diagnostico e prognostico e costituire dei nuovi potenziali target terapeutici. Gli ACA e gli ACC possiedono due differenti profili di espressione (Giordano TJ et al., 2003,2009; de Fraipont F et al., 2005; de Reyniès A et al., 2009). Il gruppo di de Fraipont e collaboratori ha identificato un cluster di geni che discrimina correttamente gli ACA dagli ACC: in particolare, nel loro studio è stato osservato che elevati livelli di espressione di geni coinvolti nelle vie di segnalazione dei fattori di crescita e della proliferazione cellulare, (i cosiddetti IGF2-cluster), caratterizzano il gruppo degli ACC, ed elevati livelli di espressione dei geni coinvolti nella steroidogenesi (il cluster steroidogenico) sono caratteristici degli ACA (de Fraipont F et al., 2005). In maniera analoga, il gruppo di Giordano e collaboratori ha dimostrato che i profili di espressione di 22 ACA e 33 ACC sono notevolmente diversi. Sono stati inoltre correlati i profili di espressione genica degli ACC con l'andamento clinico: Giordano e collaboratori hanno osservato che tumori con un alto grado istologico sono distinti a livello trascrizionale dai tumori a basso grado e i due gruppi mostrano differenti tassi di sopravvivenza; nel gruppo ad andamento sfavorevole, risultano overespressi i geni del ciclo cellulare e quelli della cosiddetta "aneuploidia funzionale" (Giordano TJ et al., 2009). Un altro studio di de Reyniès e collaboratori ha confermato la distinzione tra il gruppo degli ACA e quello degli ACC attraverso la *cluster analysis*, suddividendo il gruppo degli ACC in sottogruppi con andamenti clinici differenti. Nel gruppo ad andamento negativo predominavano i geni correlati al controllo trascrizionale e al ciclo cellulare, mentre i geni correlati al metabolismo cellulare, al trasporto intracellulare, all'apoptosi e alla differenziazione caratterizzavano il gruppo con un andamento migliore. Successivamente, è stato riconsiderato il sottogruppo ad andamento negativo, e risuddiviso in base a tre diversi profili trascrizionali. In una di queste sottoclassi è stata individuata un profilo di inattivazione di TP53; nella seconda era evidente un profilo di attivazione di Wnt, mentre la terza era caratterizzata da un profilo trascrizionale che deve ancora essere identificato (Ragazzon B et al., 2010). E' stato inoltre individuato un set di tre geni altamente predittivi dell'andamento clinico: combinando i livelli di espressione di BUB1B e di PINK1 si è delineato un sottogruppo di ACC con tempi di sopravvivenza totale nettamente differenti, indipendentemente dallo stadio della malattia alla presentazione. In maniera simile, la combinazione dei livelli di espressione di DLG7 e PINK1 potrebbe identificare un sottogruppo con tempi di sopravvivenza libera da malattia in maniera indipendente dallo score di Weiss (de Reyniès A et

al., 2009). Questi risultati sono stati successivamente validati in un'altra coorte di pazienti adulti, ma non nei pazienti pediatrici (Fragoso MC et al., 2012). Osservazioni più recenti hanno inoltre permesso di confermare precedenti studi a livello cromosomico: è stato visto che le regioni cromosomiche 12q e 5q risultano essere trascrizionalmente attive, mentre le regioni 11q, 1p e 17p sono represses (Giordano TJ et al., 2009).

2.6.6. Epigenetica degli act

Negli ultimi anni, con l'avanzamento delle tecniche di indagine a livello molecolare, ha acquistato sempre più importanza lo studio dei cambiamenti che possono verificarsi a livello epigenetico, che hanno mostrato la loro implicazione nella carcinogenesi e pertanto si sono rivelati utili per l'identificazione di nuovi markers diagnostici.

Metilazione del DNA

La modificazione epigenetica meglio caratterizzata è costituita dalla metilazione del DNA, che prevede l'aggiunta di un gruppo metilico sull'anello pirimidinico delle citosine o sull'anello purinico delle adenine, e normalmente interessa i nucleotidi CpG. In una cellula normale, agisce come meccanismo regolatorio per una corretta espressione genica, ma è coinvolta anche in numerosi processi cellulari come l'apoptosi, il ciclo cellulare, il processo di riparazione del DNA danneggiato, la risposta a fattori di crescita, la trasduzione del segnale e l'architettura tumorale: essendo questi tutti processi implicati anche nella tumorigenesi e nella progressione tumorale, ci sono sempre maggiori evidenze che la metilazione del DNA, insieme a modificazioni genetiche, possa essere una delle cause di alterazione dei pattern di espressione genica che danno luogo alla tumorigenesi (Esteller M, 2008; Das PM and Singal R, 2004; Wright KD and Gilbertson RJ, 2010). Studi iniziali sulla metilazione del DNA negli ACT, incentrati su singoli geni, hanno dimostrato che la metilazione a livello del promotore di H19 è coinvolta nella alterata espressione dei geni H19 e IGF2 negli ACC (Gao ZH et al., 2002); la metilazione del promotore di TP53, invece, non sembra essere implicata negli ACC benché lo sia in vari tipi di tumore (Sidhu S et al., 2005). Tre studi recenti hanno preso in considerazione la metilazione del DNA dell'intero genoma. Fonseca e collaboratori, studiando i livelli di metilazione del DNA di 27,578 isole CpG in 6 cortecchie surrenali normali, 27 ACA e 15 ACC, hanno dimostrato una significativa ipermetilazione dei geni soppressori tumorali, dei geni regolatori del ciclo cellulare e dell'apoptosi, come CDKN2A, GATA4, DLEC1, HDAC10, PYCARD e SCGB3A1 negli ACC; i livelli di metilazione

sono risultati inoltre inversamente correlati ai livelli di espressione del messaggero, come atteso (Fonseca AL et al., 2012). Confrontando quindi gli ACT benigni con i maligni, sono state identificate 212 isole CpG significativamente ipermetilate negli ACC. Il gruppo di Rechache ha analizzato il metiloma del DNA di 19 surreni normali, 48 ACA, 8 tumori maligni primari e 12 metastatici e ha osservato un pattern di globale ipometilazione negli ACC, se comparati coi campioni di tessuto normale e tumorale benigno: i pattern di metilazione sono in grado di discriminare i tessuti in normali, benigni, maligni primari e metastatici; molte isole CpG sono risultate differenzialmente metilate nei campioni di ACC confrontati con campioni di tessuto benigno, in particolare quelle associate coi geni KCTD12, KIRREL, SYNGR1 e NTNG2 e quelle all'interno della regione cromosomica 11p15 che comprende i geni IGF2 e H19. Barreau e collaboratori, infine, in una casistica comprendente 51 ACC e 84 ACA, hanno identificato un sottogruppo di ACC caratterizzato da elevati livelli di metilazione dei promotori: geni come H19, GSTP1, GSTM1, GSTT1, PLAGL1, GOS2 e NDRG2 mostrano alti livelli di metilazione e risultano trascrizionalmente silenti. Il grado di metilazione di 553 geni è stato inoltre direttamente correlato con la prognosi (Barreau O et al., 2013), in particolare, è stata dimostrata una sovrapposizione tra i profili trascrizionali di prognosi infausta precedentemente identificati con i pattern ad alta metilazione. Il sottogruppo degli ACC a prognosi infausta che aveva mostrato il profilo molecolare di attivazione di TP53, è risultato quello con elevati livelli di metilazione; al contrario, l'altro sottogruppo di ACC a prognosi infausta, con il profilo trascrizionale di attivazione di Wnt, non ha mostrato elevata metilazione: questi risultati indicano la coesistenza di diversi meccanismi responsabili della disregolazione trascrizionale osservata in questi sottogruppi e rafforzano il concetto che gli ACC con fenotipo simile possono presentare meccanismi molecolari eterogenei coinvolti nella tumorigenesi (Barreau O et al., 2013).

Questi studi osservazionali sono il punto di partenza per una conoscenza più approfondita sul possibile ruolo della metilazione del DNA nella tumorigenesi dell'ACC.

MicroRNA (miRNA)

Il genoma umano viene trascritto allo scopo di produrre RNA codificanti e non codificanti (ncRNA) proteine. Per lungo tempo è stato sottovalutato il ruolo dei ncRNA, ma negli ultimi anni hanno acquisito maggior interesse dal momento che sono risultati essere coinvolti nello sviluppo di vari tipi di tumore, incluso l'ACC (Zsippai A et al., 2011). Tra i ncRNA, sono risultati di particolare interesse i

microRNA, una classe di RNA costituita da 18-25 nucleotidi conservati evolutivamente, che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale andando ad agire direttamente sul messaggero, in particolare sulla sua stabilità e sulla sua traduzione. La funzione dei miRNA è quella di guidare il complesso di silenziamento RNA-indotto (RISC), un complesso multi-proteico che include un membro della famiglia proteica Argonauta legato direttamente al filamento del miRNA, all'estremità 3'UTR del messaggero target, attraverso l'appaiamento di basi (Pratt AJ and MacRae IJ, 2009; Czech B and Hannon GJ, 2011). Sono stati identificati molti miRNA implicati nella regolazione di diversi processi cellulari come la proliferazione, l'apoptosi e la differenziazione: una regolazione anomala dei miRNA, come un'iperespressione o una delezione, svolge un importante ruolo nei processi patologici, inclusi vari tipi di tumore (Cimmino A et al., 2005; Lujambio A and Lowe SW, 2012). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato che alterazioni dei miRNA possono ripercuotersi su centinaia di geni target, con la possibile conseguente implicazione di numerose vie di segnalazione (Patterson EE et al., 2011). Un terzo dei geni codificanti sono regolati dai miRNA e, di conseguenza, cambiamenti a livello della loro espressione potrebbero essere associati con lo sviluppo e la progressione tumorale (Schmitz KJ et al., 2011). Gli effetti di una deregolazione dei miRNA in una cellula tumorale includono il silenziamento di geni soppressori tumorali, l'attivazione di diversi oncogeni e/o di fattori di crescita coinvolti nell'angiogenesi tumorale, nel processo di transizione epitelio-mesenchima e nello sviluppo di metastasi (Lujambio A and Lowe SW, 2012). I miRNA rappresentano inoltre dei buoni candidati per il ruolo di markers tumorali, dal momento che possono essere analizzati nei fluidi biologici, come plasma e urine, essendo più stabili del messaggero (Iorio MV and Croce CM, 2009; Ferracin M et al., 2010; Xiao YF et al., 2013). Il primo studio che si è occupato del ruolo dei miRNA deregolati negli ACC è stato condotto su 7 ACC, 9 ACA cortisolo-secerntenti, 10 ACA non secerntenti e 10 campioni di tessuto surrenalico sano, utilizzando la PCR quantitativa (qPCR): sono emerse differenze significative nell'espressione di 22 miRNA, di cui 14 sono risultati espressi preferenzialmente negli ACC; tra i miRNA upregolati sono stati descritti i miR-184, miR-210 e miR-503, mentre i miR-214, miR-375 e miR-511 sono risultati downregolati (Tombol Z et al., 2009). I livelli di miR-184, miR-503 e miR-511 sono in grado, da soli, di discriminare gli ACT benigni dai maligni (con una specificità tra l'80 e il 97%, e una sensibilità del 100%). Il miR-375, localizzato sul cromosoma 2q35, potrebbe influire sulla patogenesi dell'ACC attraverso un'interazione diretta con alcuni componenti della via di segnalazione della β -catenina (Ladeiro Y et al., 2008). Un altro studio dello stesso anno, in

maniera analoga, ha identificato una “firma di espressione” dei miRNA unica per gli ACC, individuando 14 miRNA upregolati e 9 downregolati; questo gruppo ha inoltre individuato un’ upregolazione significativa a livello di un nuovo miRNA, il miR-483 (con una sensibilità diagnostica dell’80% e una specificità del 100%), che è risultato significativamente upregolato anche negli ACC pediatrici, e una downregolazione del miR-195 e del miR-335 (Soon PS et al., 2009). Il miR-483 è localizzato sul cromosoma 11p15.5, e, più precisamente, all’interno del locus dell’IGF2: è stato quindi ipotizzato che una disregolazione di questo locus determini un’alterazione dell’espressione del miRNA (Soon PS et al., 2009; Patterson EE et al., 2011). Uno studio condotto da Ozata e collaboratori ha permesso di scoprire il potenziale oncogeno del miR-483 sulla linea cellulare di carcinoma corticosurrenalico, NCI-295R: esso agirebbe attraverso l’inibizione di geni coinvolti nel processo apoptotico, quali PUMA/BBC3. In questo studio è stato inoltre osservato che l’ inibizione dei miR-483-3p e miR-483-5p determina una significativa riduzione della proliferazione cellulare, mentre una downregolazione del miR-483-3p, ma non del miR-483-5p, ha come conseguenza un aumento dell’apoptosi. Per interpretare le conseguenze a livello biologico e clinico di questi risultati *in vivo*, gli autori hanno misurato i livelli di espressione della proteina PUMA in campioni tumorali, riscontrando una correlazione inversa con i livelli del miR-483-3p: ciò suggerisce un ruolo per questo miRNA come regolatore proapoptotico nell’ACC (Ozata DM et al., 2011). Dagli studi finora condotti, tuttavia, risulta che la maggior parte dei miRNA differenzialmente espressi negli ACC sono downregolati, e tra questi i più importanti sono costituiti dal miR-99a e dal miR-100: entrambi, secondo analisi di bioinformatica, hanno come target la regione 3’UTR di geni come IGF1R, RPTOR e FRAP1 (mTOR) ed è stata confermata anche a livello sperimentale una loro interazione con diversi componenti della via di segnalazione dell’IGF1 (Doghman M et al., 2010). Infine, recentemente è stato valutato il ruolo dei miRNA come markers prognostici nei pazienti con ACC; studiando i profili di espressione dei miRNA in 6 ACA, 6 ACC non aggressivi e 6 ACC aggressivi, il gruppo di Chabre ha selezionato 8 miRNA (successivamente validati in un’altra casistica) e ha analizzato i livelli sierici di 5 di essi in 56 soggetti (19 controlli sani, 14 ACA, 9 pazienti con ACC non aggressivi e 14 con ACC aggressivi): è emerso che nei pazienti con ACC i livelli sierici del miR-195 e del miR-335 sono diminuiti rispetto ai pazienti sani e a quelli con ACA. Da notare il fatto che sebbene i livelli tissutali del miR-483-5p siano risultati aumentati nella maggior parte degli ACC, i suoi livelli sierici siano elevati solamente nei pazienti con ACC aggressivi. Alti livelli sierici del miR-483-5p e bassi livelli circolanti del miR-195

sono associati con una più breve sopravvivenza libera da malattia e anche una più breve sopravvivenza totale (Chabre O et al., 2013). Lo studio dei miRNA, in conclusione, sembra essere un valido approccio per l'individuazione di possibili biomarkers negli ACC, dal momento che sono stati messi a punto metodi di detezione sensibili e non invasivi; in particolare, i miR-483-p e miR-195 potrebbero costituire dei promettenti biomarkers con valore prognostico altamente specifico per l'andamento clinico nei pazienti con ACC (Raymond VM et al., 2013; Chabre O et al., 2013; Etheridge A et al., 2011).

2.6.7. Mantenimento omeostatico e cancro

La comprensione del normale sviluppo e dell'omeostasi di un organo è essenziale per caratterizzare a livello molecolare il tumore che interessa l'organo stesso: esiste infatti un unico codice di espressione genica tessuto-specifico che caratterizza sia la cellula normale che quella tumorale (Harari A and Hinabnet WB, 2011). A livello della surrene ci sono geni comuni alla ghiandola surrenale fetale e ai tumori surrenalici che risultano up- o downregolati se confrontati con la ghiandola surrenale adulta. Inoltre, la ghiandola surrenalica è costituita da cellule staminali/progenitori responsabili della ripopolazione centripeta della corteccia adulta (Kim AC et al., 2009): numerosi fattori coinvolti nella crescita omeostatica della ghiandola surrenale sembrano svolgere un ruolo anche nella tumorigenesi corticosurrenale. I geni identificati comprendono specifici fattori di crescita e regolatori chiave del ciclo cellulare, oltre che geni non associati in precedenza con la crescita o la funzionalità della ghiandola surrenalica.

L'attivazione della via di segnalazione di Wnt/ β -catenina a livello delle cellule periferiche della corteccia definitiva è coinvolta come fattore cruciale nel mantenimento omeostatico della ghiandola, oltre che nella formazione e nello sviluppo della corticale stessa (Kim AC et al., 2008). Due geni target della β -catenina, Dax-1 e inibina, che regolano la pluripotenza delle cellule staminali progenitrici corticosurrenali e il commissionamento corticosurrenale o gonadico, rispettivamente, hanno evidenziato l'importanza della via di segnalazione di Wnt nel mantenimento omeostatico della corteccia surrenalica.

DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X-chromosome) svolge un ruolo come inibitore della trascrizione genica Sf-1 mediata, in particolare degli enzimi steroidogenici (Crawford PA et al., 1998; Ito M et al., 1997; Yu RN et al., 1998). L'espressione di dax-1 è concentrata nella regione subcapsulare, in concomitanza con la β -catenina.

Inoltre, la β -catenina e Sf-1 si legano al promotore di Dax-1, upregolando la sua espressione, e questo suggerisce che dax-1 agisca come mediatore degli effetti della β -catenina per il mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule staminali progenitrici sottocapsulari (Gummow BM et al., 2006; Jordan BK et al., 2001; Kim AC et al., 2008; Mizusaki H et al., 2003; Scheys JO et al., 2011). Oltre al ruolo nella mediazione del mantenimento della pluripotenza staminale, la via di segnalazione di Wnt induce il differenziamento delle cellule progenitrici verso un fenotipo corticosurrenale (o gonadico) attraverso la regolazione del gene **inibina- α** . L'espressione di questo gene, membro della superfamiglia dei fattori di crescita e differenziamento TGF- β , sembra essere indotta da una convergenza di Sf-1 e della β -catenina sul suo promotore (Gummow BM et al., 2003). E' stato dimostrato un coinvolgimento delle inibine, oltre che delle activine (anch'esse facenti parte della superfamiglia del TGF- β), nella regolazione di diverse funzioni, quali la produzione di ormoni steroidei e l'apoptosi. Il gruppo di Beuschlein (Beuschlein F et al., 2004], in particolare, analizzando il ruolo di questi fattori nella tumorigenesi corticosurrenale, ha dimostrato un'overespressione del gene codificante l'inibina- α negli adenomi surrenalici e in numerosi carcinomi, sebbene alcuni di questi mostrino una riduzione dell'immunoreattività per l'inibina- α : questo dato potrebbe però essere in accordo con un suo potenziale ruolo di soppressore tumorale (Arola J et al., 2000).

La trascrizione di questi due geni target della β -catenina viene indotta a livello nucleare grazie alla formazione di un complesso trascrizionale tra la β -catenina stessa e Sf-1 (Steroidogenic factor-1). Il coinvolgimento di Sf-1 nella proliferazione delle cellule corticosurrenali induce a supporre una potenziale deregolazione della sua espressione alla base dell'eziologia dell'ACC. Infatti, Sf-1 è altamente upregolato nell'ACC, ed è stato visto che topi che overesprimono Sf-1 sviluppano tumori corticosurrenalici derivati da cellule proliferanti sottocapsulari (Almeida MQ et al., 2010; Doghman M et al., 2007; Pianovski MA et al., 2006). Inoltre, questo fattore risulta essere prognostico per l'ACC, dal momento che una sua elevata espressione correla con una riduzione della sopravvivenza a 5 anni (Sbiera S et al., 2010). La funzione di Sf-1 nella corteccia surrenalica è mediata anche da due membri della famiglia dei fattori di trascrizione GATA, GATA-4 e GATA-6, che sono implicati nella regolazione di espressione genica, differenziazione, proliferazione cellulare e apoptosi, e che sono espressi in maniera differenziale nel tessuto corticosurrenalico fetale ed adulto (Kiiveri S. et al., 2002). In particolare, GATA-4 è espresso a livello della surrene fetale, dove, insieme a Sf-1, determina l'upregolazione di geni coinvolti

nella steroidogenesi, quali *inibina- α* , *CYP17* e *StAR* (Tremblay JJ and Viger RS, 2003); *GATA-6*, invece, è espresso dalla surrene adulta e partecipa anch'esso, sempre in sinergia con *SF-1*, all'induzione dell'espressione genica degli enzimi della steroidogenesi (*StAR*, *CYP11A1*, *CYP17*) (Jimenez P. et al, 2003; Tremblay JJ and Viger RS, 2003). Esso è, infatti, il fattore specifico per la differenziazione verso tessuto surrenalico, mentre *GATA-4*, la cui espressione è sotto il controllo dell'ormone ipofisario *LH*, è in grado di indirizzare la differenziazione dei progenitori sub-capsulari verso tessuto gonadico (Looyenga BD and Hammer GD, 2006). La presenza del mRNA e della proteina *GATA-4* è stata riscontrata sia in casi di adenomi che di ACC, ed è stata associata ad un comportamento maggiormente aggressivo del tumore, mentre l'espressione di *GATA-6* risulta generalmente diminuita nei tumori corticosurrenalici, ma è maggiore negli adenomi rispetto ai carcinomi (Barbosa AS et al., 2004; Kiiveri S et al., 2004, 2005).

Nell'ambito del mantenimento omeostatico della ghiandola surrenale, sono coinvolti altri due fattori fondamentali: *Pod1* e *Pref1*.

Pod1 (*Tcf21*, capsulina ed epicardina) è un fattore espresso a livello delle cellule periferiche della corteccia surrenalica (Quaggin SE et al., 1998; Tamura M et al., 2001) che ha dimostrato la capacità di sopprimere l'attività trascrizionale di *Sf-1*, probabilmente regolandone direttamente l'espressione all'interno della capsula surrenalica (Cui S et al., 2004; Tamura M et al., 2001). Questo fattore è risultato essere downregolato negli ACC, oltre che in numerosi tipi di tumore (Arab K et al., 2011; Giordano TJ et al., 2009; Smith LT et al., 2006).

Pref1 (Pre-adipocyte factor 1) (*Pref1/Dik1/FA1/PG2/ZOG*), una proteina transmembrana che condivide alcune caratteristiche strutturali con la classe dei ligandi e recettori di Notch, rappresenta un mediatore cruciale del mantenimento dei progenitori adipocitari indifferenziati (preadipociti) (Smas CM and Sul HS, 1993), ma sembra essere un fattore importante anche nel mantenimento dello stato di quiescenza di numerosi tipi di cellule staminali progenitrici, comprese quelle all'interno della corteccia surrenalica, dal momento che è stata identificata anche a livello periferico della corteccia della ghiandola surrenale adulta (Floridon C et al., 2000; Okamoto M et al., 1997). L'espressione di *Pref1* e della β -catenina nella periferia della corteccia surrenale e il loro coinvolgimento nel mantenimento della nicchia staminale rafforzano l'ipotesi che questo possa costituire uno dei primi step verso la tumorigenesi corticosurrenale. Il gruppo di Turanyi, analizzando 32 ACA e 5 ACC, ha identificato l'espressione di *Pref1* nel 100% dei campioni, anche se tuttora non sono state trovate correlazioni coi dati

clinici che permettano di discriminare gli ACA dagli ACC (Turanyi E et al., 2009). Sono quindi necessari ulteriori studi per capire se l'espressione di Pref1 possa svolgere un ruolo cruciale nella tumorigenesi corticosurrenale.

La crescita e il funzionamento della ghiandola surrenalica sono regolate anche da un rimodellamento strutturale e funzionale della zona fetale, durante il quale è necessario mantenere un equilibrio tra i processi di proliferazione, apoptosi e differenziamento. La funzionalità della corteccia surrenalica è determinata, in ultima analisi, dal numero e dall'attività steroidogenica delle cellule corticosurrenali. Normalmente le cellule vanno incontro ad un numero finito di divisioni, fino ad entrare in uno stato chiamato "senescenza replicativa", caratterizzato da un progressivo accorciamento dei telomeri, le strutture specializzate che si trovano all'estremità dei cromosomi; i telomeri hanno la funzione di stabilizzare i cromosomi durante il processo mitotico, prevenire le ricombinazioni aberranti e la degradazione delle estremità cromosomiche dall'attività degli enzimi. In alcuni tipi cellulari, quali le cellule del compartimento staminale, i gameti e le cellule ad elevato tasso mitotico, comprese quelle tumorali, la lunghezza dei telomeri viene mantenuta grazie all'attività dell'enzima telomerasi, un complesso ribonucleoproteico, comprendente una trascrittasi inversa (TERT) ed uno stampo ad RNA (TERC), che catalizza l'aggiunta di ripetizioni telomeriche all'estremità 3' di ciascun cromosoma (Bekaert S et al., 2004; Cohen SB et al., 2007). Nelle normali cellule surrenaliche adulte tale attività viene persa, per cui i telomeri si accorciano ad ogni divisione cellulare, con conseguente declino del potenziale replicativo (Yang L et al., 2001). Tuttavia, è stato osservato che, ripristinando l'attività telomerasica attraverso la trasfezione della componente hTERT ad attività trascrittasi inversa, si previene l'accorciamento dei telomeri e le cellule vanno incontro a rapida proliferazione; al contrario, cellule corticosurrenaliche tumorigeniche perdono progressivamente le proprie caratteristiche di malignità quando private della stessa attività telomerasica (Sun B et al, 2004). Inoltre, per quanto riguarda l'ACC, è stato osservato che l'attività telomerasica risulta significativamente più elevata nei carcinomi rispetto agli adenomi ed è correlata alle dimensioni del tumore (Mannelli M et al., 2000).

2.7. Modelli cellulari

Le colture primarie di cellule corticosurrenaliche sono indispensabili per lo studio dei meccanismi alla base dei diversi aspetti fisiologici e patologici della surrene, per testare le potenzialità terapeutiche di nuovi agenti farmacologici e

per la realizzazione di modelli animali di xenotrapianto. Tuttavia, esistono delle limitazioni all'utilizzo di tali colture primarie come modelli *in vitro*, legate soprattutto alle difficoltà di isolamento delle cellule corticosurrenaliche e ai fattori di variabilità connessi ai soggetti donatori. Le linee cellulari generalmente utilizzate sono quelle ottenute a partire da carcinomi corticosurrenalici (Rainey WE et al., 2004; Wang T and Rainey WE, 2012) tra le quali:

- **NCI-H295**. Sono cellule derivate da un paziente con diagnosi di ACC e sono in grado di produrre vari tipi di steroidi, tra cui mineralcorticoidi, glucocorticoidi e androgeni (Gazdar AF et al., 1990). A partire da queste cellule, che mostravano originariamente una crescita lenta e la formazione di clusters cellulari, sono derivate le linee H295R, in grado di crescere come un monostrato in adesione (Rainey WE et al., 2004);

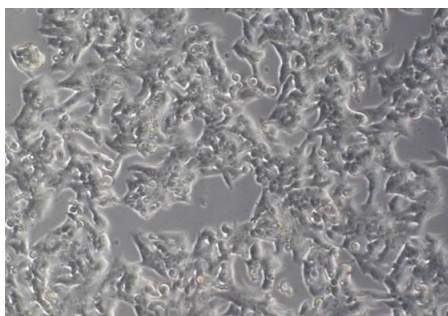


Figura 10: Cellule H295R al microscopio (ingrandimento 10X).

- **SW13**. E' una linea cellulare derivata da un ACC a piccole cellule, priva del fenotipo steroidogenico (Leibovitz A et al., 1973);



Figura 11: Cellule SW13 al microscopio (ingrandimento 10X).

- **CAR47**. Si tratta di una linea cellulare derivata dalle ghiandole surrenali di un paziente affetto dalla Sindrome di Carney e portatore di una mutazione inattivante a carico del gene PRKAR1A (Nesterova M et al., 2008); sono state

usate principalmente per lo studio della via di segnalazione cAMP/PKA, coinvolta anche nella tumorigenesi surrenalica (Almeida MQ and Stratakis CA, 2011);

– **ACT-1.** Sono cellule derivate da un ACC, in grado di esprimere l'enzima HSD3B2 ma prive della capacità di produrre qualsiasi tipo di steroidi corticosurrenalici (Ueno M et al., 2001);

– **RL-251.** E' una linea cellulare derivata da una massa surrenalica e presentante un profilo cariotipico alterato, con numerose delezioni e traslocazioni; per quel che riguarda le funzioni corticosurrenaliche, mostrano una steroidogenesi atipica e risultano insensibili alla stimolazione con ACTH, ma secernono citochine appartenenti alla famiglia delle chemochine CXC, che possiedono attività angiogenica (Schteingart DE et al., 2001).

2.8. Mitochondri e Cancro

I mitocondri controllano numerose funzioni metaboliche e sintetizzano il 95% dell'energia metabolica della cellula. Nelle cellule tumorali, mutazioni a livello del genoma mitocondriale possono portare ad alterazioni della funzionalità dei complessi fra mitocondri e proteine nucleari, con conseguente accumulo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS): i ROS possono portare un vantaggio proliferativo alle cellule e favorire così la crescita tumorale (Greaves LC et al., 2012); mutazioni somatiche a livello del genoma mitocondriale, benchè esso sia di dimensioni notevolmente inferiori rispetto al genoma nucleare, possono quindi contribuire direttamente al processo di tumorigenesi. Già nel 1924, Otto Heinrich Warburg postulò l'ipotesi che il cancro e la crescita tumorale sono in parte causati da un cambiamento della modalità di generare energia da parte delle cellule. Nelle cellule normali, L'ATP viene generato principalmente dalla fosforilazione ossidativa del piruvato che si ottiene dalla scissione del glucosio durante il processo di glicolisi; il metabolismo delle cellule maligne, invece, si basa su un potenziamento dell'attività glicolitica a discapito del processo di respirazione anche in presenza di grandi quantità di ossigeno: questo fenomeno è stato definito "effetto Warburg" (Warburg O et al., 1924). Queste differenze metaboliche permettono alle cellule cancerose di adattarsi anche alle condizioni di severa ipossia che possono verificarsi all'interno dei tumori solidi. Si potrebbe così ipotizzare che queste variazioni dei processi metabolici siano un indice di mutazioni a livello di alcuni geni coinvolti nella relazione tra nucleo e mitocondri piuttosto che dirette cause del tumore: la teoria di Warburg sostiene proprio che

il principale fattore coinvolto nella tumorigenesi sia costituito da una insufficiente respirazione cellulare causata da un danno mitocondriale (Warburg O, 1956).

I mitocondri svolgono un ruolo centrale nella regolazione di numerosi processi cellulari, come il metabolismo o la morte nelle cellule tumorali. Sono state osservate numerose alterazioni a livello funzionale che coinvolgono i mitocondri nella formazione del tumore, come una aumentata produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), una diminuzione della fosforilazione ossidativa e un corrispondente aumento della glicolisi (Chen Y et al., 2009; Weinberg E et al., 2010). Tuttavia, il ruolo specifico svolto dai mitocondri nel processo di tumorigenesi deve ancora essere chiarito, dal momento che questi cambiamenti potrebbero rappresentare i meccanismi chiave delle prime fasi di sviluppo di un tumore o semplicemente potrebbero costituire degli effetti secondari della tumorigenesi. Le vie di segnalazione delle cellule tumorali che sono regolate da chinasi e fosfatasi, sono guidate dallo status redox e potrebbero costituire elementi chiave nella trasformazione maligna. Recenti studi sui meccanismi dell'effetto Warburg hanno evidenziato che il classico shift metabolico verso la glicolisi aerobia e un aumentato uptake del glucosio conferiscono alla cellula tumorale vantaggi funzionali. Questi vantaggi permettono una crescita rapida e la sopravvivenza in condizioni che sarebbero potenzialmente letali per le cellule non tumorali. Il concetto più importante emerso negli ultimi anni, in seguito all'abbandono della teoria che la glicolisi aerobia costituisce un difetto metabolico delle cellule tumorali, è stato che il metabolismo utilizzato da queste cellule costituisca una strategia di sopravvivenza e venga mantenuto grazie ad un controllo regolatorio (Ward PS and Thompson CB, 2012). L'adattamento più riconosciuto è l'utilizzo di intermedi della via glicolitica in numerose reazioni anaboliche fondamentali per la sopravvivenza e la crescita di cellule in rapida divisione. La richiesta di scheletri di carbonio derivati dal glucosio per la sintesi di macromolecole come il glicogeno, i fosfolipidi, i trigliceridi e il malato supera la necessità di una efficiente produzione di ATP (Kroemer G and Pouyssegur J, 2008). Il glucosio viene così metabolizzato in maniera alternativa dalle cellule tumorali attraverso una via dei pentoso fosfati potenziata, che determina la sintesi di nucleotidi e NADPH (Ward PS and Thompson CB, 2012). La mancanza di una dipendenza da parte delle cellule tumorali dalla fosforilazione ossidativa per la produzione di ATP permette inoltre la sopravvivenza cellulare in condizioni di carenza di ossigeno, un microambiente caratteristico del tumore in rapida espansione, che può, talvolta, risentire di una inadeguata angiogenesi (Pouyssegur J et al.,

2006). L'acidificazione locale del microambiente tumorale è causata anche dalla produzione glicolitica di acido lattico e bicarbonato in eccesso. Il pH che ne deriva sembra favorire la crescita e l'invasività tumorale attraverso l'attivazione di catepsine derivate dalle cellule tumorali e di metalloproteasi (Swietach P et al., 2007) e l'inibizione della conseguente risposta immunitaria dell'ospite (Fischer K et al., 2007). Inoltre, il conseguente eccesso di lattato prodotto può essere convertito a piruvato a livello delle cellule stromali associate al tumore per rifornire l'energia all'interno di queste cellule (Koukourakis MI et al., 2006). L'aumentata produzione di ROS a livello mitocondriale, in particolare di superossidi, radicali idrossilici e perossido di idrogeno, determinata da un incremento della fosforilazione ossidativa nelle cellule tumorali, potrebbe costituire un fattore promuovente la carcinogenesi (Zager RA et al., 2006). Il meccanismo di produzione dei ROS e i loro effetti a valle sono al centro degli attuali studi sul ruolo dei mitocondri nel cancro. I ROS in eccesso agiscono non solo come agenti mutageni e promotori dello stress ossidativo, ma costituiscono anche molecole di segnalazione inter- e intra-cellulare, responsabili delle alterazioni dell'espressione genica nucleare e mitocondriale nell'ospite (Verschoor ML et al., 2010).

L' aumentata produzione di ROS da parte dei mitocondri nelle cellule metastatiche è stata anche associata ad una corrispondente upregolazione dei meccanismi di difesa cellulare anti-ossidanti (Kim JY et al., 2001), che sembrano essere implicati nella resistenza alla chemio- e alla radio-terapia (Huang Y et al., 2005).

Sono state trovate frequentemente mutazioni a livello del DNA mitocondriale, probabilmente dovute al fatto che questo DNA non presenta introni, né protezione istonica, e si trova nelle immediate vicinanze dei ROS. In alcuni tipi di tessuti tumorali sono state riscontrate con maggior frequenza mutazioni a carico del DNA mitocondriale rispetto alla mutazione di p53 a livello del DNA nucleare, e questo indica che le mutazioni del DNA mitocondriale potrebbero rappresentare dei validi biomarkers tumorali, in particolare per l'individuazione precoce del tumore (Chatterjee A et al., 2011).

2.9. Proteomica e caratterizzazione di biomarcatori tumorali

L'oncoproteomica gioca un ruolo sempre più importante nella diagnosi dei tumori e nello sviluppo di trattamenti personalizzati. Il termine oncoproteomica si riferisce all'applicazione di tecnologie proteomiche in campo oncologico e parallelamente al campo dell'oncogenomica (Jain, 2002). Le tecnologie in campo

proteomico si sono dimostrate un fondamentale completamento di quelle in campo genomico per la diagnosi dei tumori. Lo studio del *proteoma*, infatti, ovvero dell'espressione proteica relativa all'intero genoma, risulta necessaria per due principali motivi: la correlazione tra quantità di mRNA e quantità di proteina intracellulari è scarsa e variabile tra le diverse proteine e, soprattutto, le proteine vanno incontro a modificazioni co- e post- tradizionali molto complesse, e quindi sono presenti numerose isoforme proteiche corrispondenti ad una singola sequenza genomica; inoltre, le modificazioni post-traduzionali sono il risultato della connessione esistente tra più vie metaboliche e risentono dei fattori ambientali. Dal momento che l'espressione delle diverse isoforme è un processo altamente regolato e controllato e suscettibile di variazioni in seguito a diverse condizioni patologiche o esposizione a farmaci e tossine, la comprensione del significato della variabilità proteica "post-traduzionale" diventa una condizione necessaria per la comprensione delle loro funzioni biologiche e dei meccanismi di regolazione nei quali sono coinvolte. Sono state osservate numerose modificazioni post-traduzionali (PTM) in una proteina, e sono proprio esse le responsabili della struttura terziaria e quaternaria. Alcune interazioni proteina-proteina e la loro localizzazione in base al ruolo svolto sono rappresentate schematicamente in figura (Fig. 12) (Baenzinger, 2003).

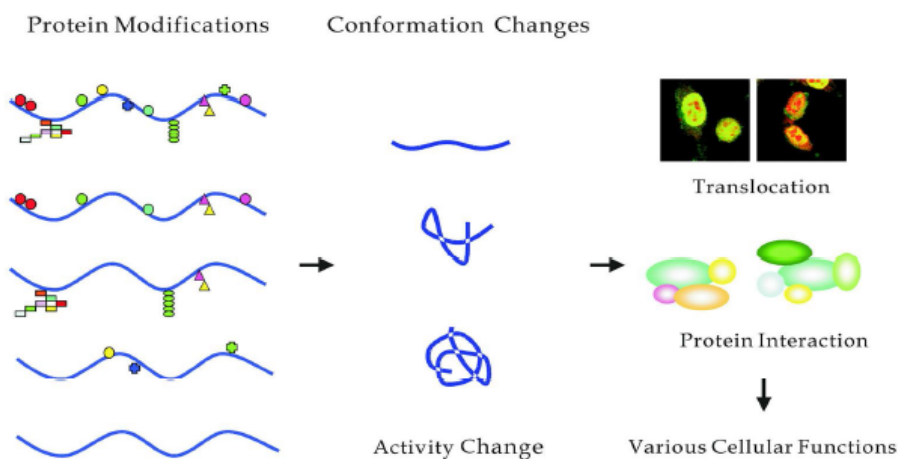


Figura 12: Rappresentazione schematica delle modificazioni post-traduzionali correlate alla regolazione dei processi biologici. Immagine tratta da Seo J and Lee KJ, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004.

Per lungo tempo, l'approccio più utilizzato per l'analisi proteomica è stata l'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide o 2D-PAGE (Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis), seguita dall'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa (Gorg A et al., 2004; Hanash SM, 2000); questa tecnica permette la comparazione diretta dei profili di espressione

proteica di diversi campioni ed è stata utilizzata per identificare proteine differenzialmente espresse tra tessuti normali e tumorali in vari tipi di tumore, come quello del fegato (Seow TK et al., 2001), della vescica (Celis JE et al., 1999), del polmone (Chen G et al., 2002), dell'esofago (Soldes O et al., 1999), della prostata (Meehan KL et al., 2002) e del seno (Bini L et al., 1997).

Più recentemente, è stata sviluppata una variante al tradizionale approccio 2D-PAGE, e l'applicazione di questa tecnica ha permesso l'identificazione di potenziali biomarkers da poter utilizzare per la diagnosi precoce in vari tipi di tumore, come quello del polmone (Conrad DH et al., 2008), della prostata (Lin JF et al., 2007; Ummanni R et al., 2011), del seno (Gharbi S et al., 2002; Weitzel LR et al., 2010) e del colon retto (Alfonso P et al., 2005; Habermann JK et al., 2008). La DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis) è una tecnica che fornisce maggior riproducibilità e sensibilità, e una migliore quantificazione rispetto alla precedente, permettendo di ridurre la variabilità inter- e intra-campione (Zhou G et al., 2002). Gli estratti proteici cellulari vengono marcati differenzialmente con coloranti fluorescenti, che vengono successivamente riuniti in un'unica miscela, insieme ad uno standard interno costituito da un pool proteico di tutti i campioni in esame, e corsi sullo stesso gel 2D. Il gel viene scannerizzato per ottenere una mappa relativa ad ogni pool proteico marcato e le immagini vengono in seguito confrontate per differenza di intensità di emissione per ciascuno spot: proprio la presenza dello standard interno permette una comparazione tra i profili proteici di tutti i campioni dell'esperimento.

La maggior parte delle tecniche in campo proteomico si basano sull'identificazione di biomarkers tumorali e sullo studio dei pattern proteici. I biomarcatori tumorali sono definiti come alterazioni molecolari specifiche, sia a livello di DNA che di RNA, proteine o metaboliti, che possono essere misurate: possono pertanto costituire dei validi indicatori dei processi patologici o target per la scoperta di nuovi farmaci. Numerosi studi recenti hanno identificato una serie di nuovi biomarcatori o potenziali target per l'ACC. Sbiera e collaboratori per esempio, hanno osservato che l'overespressione della survivina è associata con una prognosi peggiore in pazienti con ACC: l'utilizzo di questa proteina come bersaglio terapeutico, pertanto, potrebbe essere un interessante nuovo approccio per il trattamento dell'ACC (Sbiera S et al., 2013). Un altro gruppo ha confermato che la presenza di positività nella colorazione nucleare per la β -catenina rappresenta un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza totale e libera da malattia in pazienti che hanno subito l'asportazione chirurgica dell'ACC primario (Gaujoux SGS et al., 2011). E' stato

inoltre osservato che l'identificazione del fattore steroidogenico SF-1 potrebbe rappresentare un possibile nuovo marcatore prognostico nel tumore corticosurrenalico (Duregon E et al., 2013). Solo recentemente però sono stati condotti studi di tipo proteomico su questo tipo di tumore. Il gruppo di Yang ha individuato due proteine, la calreticulina e la prohibitina, come candidati biomarcatori che potrebbero discriminare gli ACC dagli ACA, dal momento che sono risultate overesprese nel gruppo di tumori analizzato (Yang M et al., 2013). Il gruppo di Kjellin ha osservato una riduzione dei livelli di espressione di numerose proteine appartenenti al complesso I della catena respiratoria mitocondriale a livello della frazione microsomiale di tessuti surrenalici maligni, comparati con tessuti surrenalici sani: in particolare, è stata identificata una proteina, GRIM-19, che sembra essere un regolatore negativo di STAT3, e potrebbe rappresentare un potenziale biomcatore (Kjellin H et al., 2014). Tuttavia, i possibili biomarcatori candidati per l'ACC sono ancora relativamente limitati, se comparati con altri tipi di tumore. Di conseguenza, si rende necessaria l'identificazione di nuovi biomarcatori tumorali che permettano di sviluppare strategie diagnostiche e terapeutiche più efficaci per i pazienti con tumore corticosurrenalico.

SCOPO DELLA TESI

I tumori della corteccia surrenalica (ACC) sono tumori rari ma altamente aggressivi che originano nella corteccia della ghiandola surrenalica. Nonostante negli ultimi anni siano stati fatti progressi nella comprensione dei meccanismi fisiopatologici di questa malattia, la biologia di questo tumore è ancora in gran parte sconosciuta, e questo spiega il motivo della mancanza di terapie più mirate ed efficaci. L'unico farmaco specifico attualmente in uso per il trattamento dei pazienti con ACC ad uno stadio avanzato è il mitotane, di cui tuttavia non sono stati studiati i possibili effetti tossici a livello delle cellule tumorali.

Il lavoro di questa tesi si è quindi incentrato in una prima parte sullo studio dei profili di espressione proteica del tumore e della ghiandola surrenalica sana, allo scopo di individuare proteine differenzialmente espresse e di conseguenza in grado di discriminare i due gruppi sperimentali. Una volta identificate queste proteine, ci siamo focalizzati su un'analisi di tipo bioinformatico per selezionare eventuali biomarcatori dell'ACC da utilizzare come potenziali target terapeutici per migliorare la prognosi e la diagnosi di questa patologia. Lo studio è stato condotto mediante l'utilizzo della tecnica di 2D-DIGE (Differential in-gel electrophoresis), utilizzata per la prima volta in questo tipo di tumore, che ci ha permesso di confrontare e quantificare i profili proteici di più campioni, corsi su gel differenti, grazie alla presenza di uno standard interno.

Nella seconda parte di questo studio siamo andati ad indagare gli effetti del farmaco mitotane, attualmente in uso per il trattamento dei pazienti con stadi avanzati di ACC, a livello della linea cellulare di carcinoma corticosurrenalico, H295R, allo scopo di approfondire le scarse conoscenze sull'azione di questo farmaco. Ci siamo focalizzati sullo studio dei meccanismi intracellulari alla base dell'effetto tossico del mitotane, in particolare sulle alterazioni nella morfologia e nella funzionalità dei mitocondri nelle H295R.

MATERIALI E METODI

1. Casistica

Tutti i pazienti, o i genitori in caso di pazienti pediatrici, hanno dato il loro consenso informato per partecipare allo studio. Lo studio ha incluso 10 pazienti affetti da ACC, le cui caratteristiche cliniche sono riassunte in tabella (Tab1). Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad intervento chirurgico per asportare il tumore all'Ospedale di Careggi di Firenze. I campioni tissutali di surrene sana (n=8) sono stati invece prelevati nel corso di nefrectomie eseguite a causa di carcinomi renali o in seguito a espianti da cadavere. I campioni di tessuto surrenalico tumorale (ACC) e normale (NOR), una volta prelevati, sono stati immediatamente congelati in azoto liquido per essere, in seguito, sottoposti a processamento per l'estrazione di proteine o per essere fissati in formalina e inclusi in paraffina per l'analisi immunoistochimica, dopo conferma della diagnosi di tumore corticosurrenalico da referto istologico. Dalla biopsia tumorale del paziente 2 è stato prelevato un campione doppio che ci ha permesso di analizzare i tessuti come due campioni indipendenti (ACC2 e ACC2a).

PATIENTS	AGE (years)	SEX	HORMONAL ACTIVITY	DIAMETER (cm)	Ki67 (%)	WEISS	STAGE
ACC1	71	F	NS	9	10	7	4
ACC2 ACC2a	58	F	NS	13	90	8	3
ACC3	36	F	CORT	6.7	15	5	3
ACC4	45	F	DHEAS, T, DELTA4	7.5	5	6	2
ACC11	4	F	-	4	<5	3	-
ACC13	46	F	NS	6	<1	4	2
ACC20	58	F	CORT	7	40	8	3
ACC21	23	F	T, DELTA4	5	1	3	1
ACC22	62	F	NS	2.5	10	6	2
ACC26	1	F	-	9	20	6	-

Tabella 1: **Caratteristiche cliniche dei pazienti.** Caratteristiche cliniche dei 10 pazienti affetti da ACC e inclusi nell'analisi proteo mica. Sono indicate età al momento dell'intervento, sesso, attività ormonale del tumore, diametro, Ki67, score di Weiss e stadio del tumore, in accordo con la nuova classificazione ENS@T (Fassnacht M et al., 2009). Per un paziente, sono stati prelevati 2 porzioni tissutali in due diverse regioni della biopsia tumorale e sono state analizzate come campioni indipendenti (ACC2 e ACC2a). -: non definito; NS: non secernente; CORT: cortisolo; T: testosterone; DHEAS: deidroepiandrosterone sulfate; DELTA4: androstenedione.

2. Estrazione, purificazione e determinazione del contenuto proteico

Ciascun campione di tessuto surrenalico è stato inizialmente sottoposto a disgregazione meccanica mediante Ultraturrax T10 basic IKA (Werkw GmbH & Co, Staufen, Germania) in uno specifico buffer di lisi (30 mM Tris pH 8.5, 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS) addizionato di un inibitore di proteasi, e, successivamente, mediante sonicazione. A questo punto, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione in ultracentrifuga (12000 g, 4°C, 10') (Centrifuge J2-21M/E, UK) ed è stato recuperato il sovrnatante contenente la frazione proteica.

Gli estratti proteici sono stati purificati mediante l'uso del 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, USA): ogni campione è stato addizionato di un precipitante e di un co-precipitante e centrifugato (8000 g, 4°C, 10'); il pellet così ottenuto è stato risospeso in acqua deionizzata ed addizionato, in sequenza, di uno wash buffer e di uno wash additive, precedentemente raffreddati. Dopo incubazione a -20°C, è stata effettuata una nuova centrifugazione (8000 g, 4°C, 10') ed il pellet, una volta seccato, è stato risospeso in una soluzione reidratante (8 M Urea, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 0.5% Pharmalyte o buffer IPG, 0.002% blu di bromofenolo) e incubato a temperatura ambiente. Dopo un'ulteriore centrifugazione è stato recuperato il sovrnatante contenente la frazione proteica.

La concentrazione proteica dei campioni, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, è stata valutata mediante l'applicazione del metodo Bradford, che utilizza il Coomassie blue brilliant (Biorad, Hercules, CA), come colorante specifico delle proteine, che presenta un picco massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda (λ) di 595 nm: esso si lega preferenzialmente ai residui basici ed aromatici delle proteine, determinando una colorazione del campione tanto più intensa quanto maggiore è la concentrazione proteica. L'allestimento della curva standard è stato effettuato utilizzando concentrazioni note crescenti di albumina sierica bovina (BSA) comprese nell'intervallo 0-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, incubate per 30' con il Coomassie (diluizione 1:5 in acqua deionizzata). L'assorbanza dei singoli punti è stata valutata allo spettrofotometro (Spectrophotometer 6405 UV/Vis, Jenway, UK) ad una λ di 595 nm e a ciascun valore è stata sottratta l'assorbanza del bianco (0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA). Interpolando sulla curva standard ottenuta (assorbanza in funzione della concentrazione) i valori di assorbanza registrati per ciascun campione in

analisi, è stato possibile ottenere i relativi quantitativi proteici. La correlazione fra assorbanza e concentrazione è espressa dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon dc$$

dove **A** rappresenta l'assorbanza, ϵ il coefficiente di estinzione molare, **d** il cammino ottico della soluzione, **c** la concentrazione del campione.

3. DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis)

La DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) è una tecnica elettroforetica che permette di valutare le possibili differenze nei profili di espressione proteica tra più campioni grazie all'uso di specifiche sonde fluorescenti, il cui segnale di emissione viene comparato all'interno dello stesso gel e tra gel diversi; in questo modo, è possibile determinare la presenza di proteine espresse in maniera differenziale o comparabile tra i diversi campioni.

50 μ g di ciascun campione proteico in analisi sono stati prelevati e incubati con 400 pmol di una sonda fluorescente, CyDye (GE Healthcare, Milano, Italia) in ghiaccio, al buio, per 30 minuti; in particolare, sono state utilizzate le sonde Cy3 (emissione nel verde ad una λ di 532 nm) e Cy5 (emissione in rosso ad una λ di 633 nm) in proporzione uguale tra i campioni di ACC e quelli di surrene sana ma in maniera arbitraria. E' stato quindi costituito uno standard interno prelevando aliquote della stessa concentrazione da tutti i campioni e marcato con una terza sonda, Cy2 (emissione nel blu ad una λ di 488 nm). A questo punto, tutti i campioni sono stati focalizzati mediante apparecchio IPGphor (GE healthcare, Milano, Italia) a 67 kVh a 20°C utilizzando specifiche strips contenenti un gradiente di pH da 3 a 10 (IPG strips), che consente di separare le proteine in base al loro punto isoelettrico (GE Healthcare, Milano, Italia); successivamente, ciascuna strip è stata equilibrata due volte, caricata e separata su gel al 12% di poliacrilammide, in base al peso molecolare delle proteine, mediante SDS-PAGE (*vedi paragrafo 5*), eseguita con l'apparecchio DALT 12 (GE Healthcare, Milano, Italia). Per ogni gel sono stati caricati lo standard interno, un campione di ACC ed un campione di surrene sana, insieme a uno standard di peso molecolare (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Milano, Italia). Una volta terminata la corsa elettroforetica, le immagini dei gel sono state acquisite con uno scanner Typhoon TRIO (GE Healthcare, Milano, Italia) dotato di specifici filtri di emissione. Le immagini dei gel sono state analizzate mediante il DeCyder Differential Analysis Software v7.2, che permette

di sovrapporre e compararle sulla base del segnale di fluorescenza. La rivelazione e la quantizzazione degli spot tra campioni all'interno dei singoli gel è stata eseguita mediante l'applicazione del modulo DIA (Differential In-gel Analysis), mentre il modulo BVA (Biological Variation Analysis), che tiene in considerazione la variabilità inter-gel, è stato utilizzato per confrontare i diversi gel e quantizzare gli spot proteici di tutti i campioni dell'esperimento. Il modulo DIA, in particolare, permette di individuare gli spot all'interno di un'immagine multipla ottenuta dalla sovrapposizione delle tre immagini derivanti dalle sonde fluorescenti all'interno di uno stesso gel e normalizza i dati di ogni fluorocromo tenendo conto delle differenze di intensità di fluorescenza e della sensibilità dello scanner. Sono state analizzate le differenze nei quantitativi degli spot relativi a campioni (ACC e NOR) corsi sullo stesso gel per ogni set di esperimenti (10 immagini). Successivamente è stata utilizzata la BVA per comparare tutti i gel dell'esperimento e poter effettuare un'analisi statistica inter-gel. Questo modulo inizialmente calcola le intensità normalizzate per tutti gli spot, comparandoli con lo standard interno, e da questo, un rapporto medio tra l'intensità di uno spot relativo agli ACC e del corrispondente spot relativo alle surreni sane, determinando il relativo valore P mediante il T-Student appaiato. Solamente gli spot con variazioni di 2 volte del rapporto volumetrico in seguito a normalizzazione, in almeno tre esperimenti separati (valore $p < 0.05$), sono stati considerati alterati e selezionati per la successiva caratterizzazione. L'ultima analisi condotta mediante un'estensione del Decyder Software (EDA) è stata la Pattern Analysis (PA), che ha permesso di creare la heat-map dell'espressione delle proteine differenziali tra campioni tumorali e normali

4. Identificazione delle proteine mediante NanoLC-nanoESI-MS/MS

Dopo aver identificato mediante il Software Decyder le proteine differenzialmente espresse, abbiamo corso un gel preparativo sul quale è stato caricato 1mg di proteine derivante da una miscela costituita da uguali quantitativi ottenuti da ciascun campione incluso nell'esperimento. Il gel è stato quindi colorato con SYPRO Ruby per visualizzare le proteine e poter prelevare gli spot di interesse mediante robot Ettan-Picker (GE Healthcare, Milano, Italia); gli spot prelevati automaticamente, sono stati in seguito sottoposti a digestione enzimatica. Ciascuno spot è stato sottoposto ad analisi in nanoLC-nanoESI-MS/MS mediante HPLC Ultimate 3000 (Dionex, San Donato Milanese, Milano, Italia) accoppiata a spettrometria di massa LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Brema,

Germania) per poter essere caratterizzato. I peptidi sono stati concentrati in una colonna di purificazione PepMap100 C18 (300 μ m i.d. x 5mm, 5 μ m, 100Å, LC Packings Dionex) e successivamente eluiti in una nano-colonna Acclaim PepMax100 (75 μ m i.d. x 15cm, C18, 3 μ m, 100Å, LC Packings Dionex) a 300 nl/min. La fase mobile di caricamento è la seguente: 0.1% TFA in H₂O (fase A) e 0.1% TFA in CH₃CN (fase B). La composizione delle fasi mobili di eluizione è: H₂O 0.1% acido formico/CH₃CN 97/3 (fase A) e CH₃CN 0.1% acido formico/H₂O 97/3 (fase B). Il programma di eluizione è stato il seguente: 0 min, 4% B; 10 min, 40% B; 30 min, 65% B; 35 min, 65% B; 36 min, 90% B; 40 min, 90% B; 41 min, 4%B; 60 min, 4% B. Gli spettri ottenuti dall'analisi in massa sono stati acquisiti in modalità ionica positiva, regolando il voltaggio spray a 2 kV, il voltaggio del capillare e la temperatura rispettivamente a 45 V e 200 °C, e le lenti a 130 V. I dati sono stati acquisiti in modalità dipendente con esclusione dinamica attivata (2 ripetizioni della conta, durata della ripetizione 15 s, durata di esclusione 30 s); le scansioni delle misurazioni in MS sono state registrate attraverso l'Orbitrap analyzer nel range di massa 300-2000 m/z a 15,000 risoluzione nominale a m/z=400; successivamente, fino ai tre più intensi ioni in ciascuna scansione MS sono stati frammentati (ampiezza di isolamento 3 m/z, energia di collisione normalizzata 30) e analizzati all'analyzer IT. Gli ioni monocaricati non sono stati presi in considerazione per gli esperimenti MS/MS. I dati acquisiti sono stati analizzati col programma Proteom Discoverer 1.2 (Thermo Scientific) avvalendosi di Sequest come algoritmo di ricerca all'interno del database Human Protein. Le ricerche sono state condotte tenendo in considerazione i seguenti criteri: (i) fino a due siti di clivaggio mancanti (ii) 10 ppm di tolleranza per i precursori ionici monoisotopici e 0.8 unità di massa per i frammenti ionici monoisotopici, (iii) metilazione carbamidica della cisteina e ossidazione della metionina come modificazioni variabili. Abbiamo accettato solamente quei peptidi che mostravano un elevato intervallo di confidenza e proteine con: (i) almeno due spettri rappresentanti due distinti peptidi e (ii) score proteico maggiore di 30. Le masse peptidiche ottenute sono state confrontate con le masse peptidiche teoriche di tutte le proteine presenti nel database umano dell' NCBIInr mediante l'utilizzo del programma MASCOT con MASCOT Daemon automatico (Matrix Sciences v2.1, UK) in modo da ottenere una lista delle possibili proteine rappresentate dai singoli spot di interesse. Tra queste sono state scelte, in base alla letteratura e in base al loro ruolo nei normali processi cellulari ed in quelli patologici, alcune proteine da validare mediante analisi Western Blot e immunostochimica, per avere una conferma della loro differente espressione nei campioni normali e tumorali osservata mediante 2D-DIGE.

5. SDS-PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) è una metodica che consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare, per individuare e analizzare quelle di interesse. A questo scopo, sono stati preparati i gel di poliacrilammide (apparato Amersham Biosciences, USA), ciascuno costituito da un gel di impaccamento delle proteine, dotato di pozzetti singoli per il caricamento dei campioni (Stacking Gel: bdH_2O , 30% Bis-acrilammide, 1 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 10% Ammonio Persolfato - APS -, N-N'-N'-tetrametiletildiammina - TEMED), ed un gel per la corsa e la separazione delle proteine (Resolving Gel: bdH_2O , 30% Bis-acrilammide, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED). Quest'ultimo può contenere una percentuale variabile di acrilammide, che viene stabilita in base al peso molecolare delle proteine da analizzare, quindi in base alla loro capacità di passare attraverso le maglie più o meno larghe del gel: maggiore è la percentuale di acrilammide, più strette saranno le maglie del gel e più lenta sarà la migrazione delle proteine di peso maggiore. Durante la polimerizzazione dei gel, sono stati preparati i campioni per il caricamento: sono state prelevate aliquote contenenti la stessa quantità di proteine per formare due pool corrispondenti a tutti i campioni di ACC e tutti i campioni sani usati nella 2D-DIGE, ciascuno da 50 μg totali, sono stati risospesi in un egual volume di tampone di corsa riducente (Sample Buffer 4X: 62.5 mM Tris pH 6.8, 20% glicerolo, 4% SDS, pironina, 200 mM ditiotreitolo - DTT) e sono stati bolliti per 5' a 95°C. La **composizione del tampone** di corsa, associata al processo di bollitura, permette di denaturare completamente le proteine che, in questo modo, acquisiscono una conformazione non strutturata; in particolare, il DTT agisce a livello dei ponti disolfuro riducendoli, mentre l'SDS si lega lungo la catena polipeptidica, denaturando le proteine e conferendo loro una carica netta negativa. Nel Sample Buffer, inoltre, sono presenti un tracciante ionizzabile, la pironina, che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica, ed il glicerolo, che rende più densa la soluzione dei campioni in modo tale che si stratifichino sul fondo del relativo pozzetto. Dopo che i gel sono polimerizzati, i campioni così preparati sono stati caricati all'interno dei pozzetti; un pozzetto per ciascun gel è stato riservato al caricamento di uno standard di peso molecolare (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Milano, Italia), in modo da poter avere un riferimento durante e dopo la corsa e poter successivamente confrontare le proteine di interesse. Ai gel è stata applicata, per almeno 2 ore, una corrente di 300 V e 25 mA (apparato Amersham Biosciences, USA), in presenza di uno specifico buffer

di corsa (Running Buffer 1X pH 8.3: bdH_2O , 25 mM Tris, 250 mM Glicina, 0.1% SDS) in modo da creare un campo elettrico necessario alla migrazione e alla separazione delle proteine: la migrazione avviene dal polo negativo verso il polo positivo e la separazione in base al peso molecolare.

6. Western Blot

Una volta terminata la corsa elettroforetica, le proteine separate sono state trasferite, mediante l'applicazione di un campo elettrico (appareato Amersham Biosciences, USA), dal gel ad una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF; Millipore, USA), precedentemente attivata mediante incubazione in metanolo per circa 15" ed idratata per 5'. Il processo di trasferimento, della durata di 2 ore, è stato effettuato in presenza di un tampone specifico (Transfer Buffer: bdH_2O , 150 mM Glicina, 20 mM Tris, 10% Metanolo) mediante applicazione di una corrente di 100 V e 350 mA.

Una volta terminato il trasferimento, i gel di poliacrilammide sono stati incubati nel Coomassie Reagent per valutarne l'esito, mentre le membrane di PVDF sono state incubate over-night a 4°C ed in agitazione con gli anticorpi primari specifici (sc-271582 per anti-ALDH6A1, sc-52256 anti-Transferrina, sc-46675 anti-Fascina-1, sc-6215 anti Lamina A/C, sc-376512 anti-CAP-1, sc-374436 anti-ADX-Red, sc-1615 anti-Actina, Santa Cruz Biotechnology), opportunamente diluiti in T-TBS 1X (0.1% Tween-20, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4). Le membrane sono state, quindi, sottoposte a 3 lavaggi da 10' in T-TBS per eliminare l'anticorpo primario e, successivamente, sono state incubate per 1 ora e mezza a temperatura ambiente ed in agitazione con gli anticorpi secondari, coniugati all'enzima HRP (Horseradish Peroxidase) e diluiti in T-TBS (diluizione 1:2000). Dopo i lavaggi in T-TBS, le membrane sono state incubate con lo specifico liquido di sviluppo contenente il substrato della perossidasi, il luminolo, ed acqua ossigenata (ECL detection kit, Immobilon, Merck-Millipore), e le immagini sono state sviluppate grazie ad una reazione di chemiluminescenza e acquisite dallo strumento Chemidoc (Chemidoc™XRS, Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milano, Italia) mediante Software Quantity One.

7. Classificazione funzionale delle proteine e analisi delle vie di segnalazione

E' stato condotto uno studio funzionale mediante analisi di Gene Ontology (GO) (Jelier R et al., 2011) con la componente aggiuntiva BiNGO (Biological Network Gene Ontology) per il Software di visualizzazione Cytoscape (Maere S et al., 2005), correggendo il valore di p per il test multiplo e utilizzando il False Discovery Rate di Benjamini e Hochberg corretto per il valore soglia di p di 0.01, per conferire significatività ai risultati (Reiner A et al., 2003).

8. Diagnosi istologica e immunoistochimica

La diagnosi istologica degli ACC è stata condotta dall'anatomo-patologo di riferimento sul tessuto tumorale rimosso durante l'intervento chirurgico. Il campione tissutale relativo alla neoplasia, adeguatamente fissato in contenitore apposito con formalina tamponata, subisce un processo di riduzione macroscopica al quale seguono le fasi standardizzate di processazione del campione stesso, fino all'inclusione in paraffina; una volta incluso, il campione viene tagliato al microtomo con conseguente allestimento di sezioni paraffinate dell'ordine di 2-5 μm . Le sezioni così allestite, dopo adeguata sparaffinatura e reidratazione, possono essere colorate con colorazione di routine in Ematossilina-Eosina (EE) che consente la valutazione non solo del pattern architetturale della neoplasia, ma anche del dettaglio cito-nucleare dei singoli elementi cellulari costituenti la neoplasia. I campioni tumorali sono stati valutati in accordo con il sistema di Weiss che combina nove parametri morfologici: tre legati alla struttura del tumore (descrizione del citoplasma, architettura diffusa e necrosi), tre correlati alla citologia (atipia, figure mitotiche atipiche e conta mitotica), e tre correlate all'invasione (vene, sinusoidi e capsula tumorale). La presenza di tre o più di questi criteri correla fortemente con un andamento maligno (Lau SK et al., 2009). L'indice Ki67 è stato valutato come marker di proliferazione per effettuare la prognosi di ACC. L'analisi immunoistochimica eseguita con l'anticorpo monoclonale rivolto contro la proteina umana Ki67, clone MIB1 (Dako, Glostrup, Danimarca) è stata condotta con il sistema di colorazione automatico Ventana Benchmark XT (Ventana Medical System, Tucson, AZ) su sezioni tumorali di 3 μm incluse in paraffina. Ki67 è una proteina nucleare presente in due isoforme di 345 e 395 kDa rispettivamente, che risulta preferibilmente espressa durante tutte le fasi attive del ciclo cellulare

(G1, S, G2 e fase-M), ma è assente in cellule *resting* (G0). Per l'identificazione dell'antigene il vetrino è stato scaldato con il Cell Conditioner 1 (Ventana) e l'anticorpo primario è stato incubato per 32 minuti con una diluizione di 1:20 in Antibody Diluent (Ventana). La visualizzazione si è ottenuta usando il kit di rilevamento Ventana iVIEW DAB, un complesso streptavidina-biotina (ABC) in grado di rilevare un segnale marrone. I nuclei sono stati evidenziati per contrasto con ematossilina. Il parametro Ki67 è stato espresso come percentuale delle cellule proliferanti su 1000 cellule tumorali selezionate casualmente. Lo stadio tumorale è stato valutato in accordo alla classificazione dell'ACC TNM rivisitata, proposta dal gruppo europeo per lo studio dei tumori surrenalici (ENS@T) (Fassnacht M et al, 2009). Per la valutazione delle proteine identificate mediante analisi 2D-DIGE, sono state selezionate sezioni rappresentative dei tessuti dello spessore di 3 μm , che sono state de-paraffinate in Bio-Clear (Bio-Optica, Milano, Italia) e idratate con etanolo a concentrazioni graduali in acqua distillata. Sezioni seriali dello stesso campione sono state incubate per l'analisi immunohistochimica con gli anticorpi monoclonali anti-ALDH6A1, anti-Fascina 1, anti-CAP-1, anti-Lamina A/C, anti-Ferredossina riduttasi, anti-Transferrina alla diluizione 1:50, già utilizzati per l'analisi Western Blot. L'identificazione degli antigeni è stata eseguita scaldando i vetrini in bagno termostato a 97°C con EDTA (pH 9) per l'anti-ALDH6A1, l'anti-CAP-1, l'anti-Lamina A/C, l'anti-ADX-Red e con il buffer citrato (10 mM, pH 6) per l'anti-Fascina 1 e per l'anti-Transferrina. Le sezioni sono state fatte successivamente raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. Per bloccare l'attività perossidasi endogena, le fettine sono state trattate con perossido d'idrogeno al 3% in PBS (Dako Wash Buffer 10X) per 10 minuti. L'analisi immunohistochimica è stata effettuata utilizzando il DAKO EnVision™ FLEX (DAKO, Carpinteria, CA, USA), e il 3,3' diaminobenzidina come cromogeno. I controlli negativi sono stati eseguiti sostituendo l'anticorpo primario con un siero non immune (non contenente anticorpi) alla stessa concentrazione. Le sezioni sono state colorate con ematossilina di Mayer.

9. Analisi statistica

I relativi livelli di spot proteici identificati confrontati con gli spot dello standard interno sono stati analizzati dal modulo DIA (Difference in-Gel Analysis) e dal modulo BVA (Biological Variation Analysis) del Software Decyder (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala, Svezia). Per calcolare le differenze statisticamente significative della quantità relativa degli spot proteici tra i due

gruppi nella 2D-DIGE e dell'intensità delle bande nell'analisi Western Blot abbiamo utilizzato il test T-Student. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

10. Materiali

Gli stereoisomeri purificati del MTT, o,p'-DDD (DDD), e del suo metabolita diclorodifenildicloroetilene (DDE), o,p'-DDE (DDE), e del DDT, o,p'-DDT (DDT), sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il 2-propanolo, *n*-esano, acetonitrile, e l'acqua per l'HPLC sono state ottenute dalla Panreac Quimica (Barcellona, Spagna). Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

11. Colture cellulari

Le linee cellulari H295R e SW13 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) sono state messe in coltura in terreno DMEM/F12 con il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Euroclone, Pero, Milano, Italia) supplementato con 2 mM di L-Glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e arricchito con una miscela di insulina/transferrina/selenio (ITS) per le H295R. I fibroblasti primari umani sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a chirurgia addominale, dopo aver ottenuto il consenso informato. Le cellule derivanti dalla disgregazione del pezzetto di tessuto sono state messe in coltura in terreno DMEM (Euroclone) con 10% di FBS supplementato con 2 mM di L-Glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (Sigma-Aldrich) e utilizzate per l'esperimento una volta raggiunto il terzo passaggio. Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state tenute in coltura per i tempi indicati con i trattamenti a diverse dosi di MTT in terreno con 1% di FBS a 37°C in atmosfera umidificata col 5% di CO₂.

12. Misurazione in hplc (high performance liquid chromatography) dei livelli intracellulari di DDD e DDE

La cromatografia è una tecnica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto

alla fase mobile impiegherà un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta affinità per la fase mobile. La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), è un tipo di cromatografia liquida che rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica. Per misurare i livelli delle nostre molecole di interesse nei campioni cellulari trattati con MTT, il DDD e DDE sono stati risospesi in metanolo, aliquotati in soluzioni da 1mg/ml e conservati a 4°C. Le soluzioni di lavoro (100 µg/ml) sono state ottenute attraverso una diluizione 1:10 delle soluzioni inizialmente aliquotate in metanolo. Le soluzioni degli standard di calibrazione (5, 10, 20 µg/ml) sono state preparate aggiungendo rispettivamente 5, 10 e 20 µl delle soluzioni di lavoro a 100 µl di soluzione senza siero. Sono stati aggiunti 100 µl di soluzione dello standard interno (o,p'-DDT, 20 µg/ml) sia alle soluzioni degli standard che ai campioni cellulari estratti in metanolo. Tutti i campioni e gli standard sono stati estratti aggiungendo 2 ml di *n*-esano e 2 ml di 2-propanolo. Dopo una centrifugazione a 2500 *g* per 5 min, i supernatanti ottenuti (4 ml) sono stati essiccati mediante flusso di azoto; i residui sono stati risospesi con 60 µl della fase mobile, composta da una miscela di acetonitrile/acqua/acido fosforico (85:15:0.05%) che viene fatta fluire a 0.6 ml/min, e 30 µl di questa risospensione sono stati iniettati nel sistema HPLC (Chromsystems, Monaco, Germania), dotato di una pompa isocratica CLC300, un campionatore automatico CLC200 e un rivelatore SPD-20A/20AV u.v.-Vis (Shimadzu, Kyoto, Giappone). I campioni sono stati così "spinti" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile grazie all'applicazione di pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Il rivelatore applicato alla fine della colonna e il calcolatore hanno permesso di analizzare in continuo l'uscita della colonna e quindi di quantificare le sostanze di interesse presenti nei campioni iniettati tramite specifico cromatogramma. L'acquisizione e l'integrazione dei dati è stata effettuata utilizzando il Software Geminix (Chromsystems).

13. Valutazione della proliferazione cellulare delle H295R

13.1. Saggio MTS

Le cellule H295R sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti, alla densità di 1×10^4 cellule per pozzetto. Una volta che le cellule hanno raggiunto il 60% di confluenza, sono state private del siero per 24h e trattate con concentrazioni

crescenti di MTT ai tempi indicati; alle cellule di controllo è stato aggiunto solamente terreno di coltura. Ai tempi stabiliti, le cellule sono state incubate per 1h a 37°C con una soluzione costituita da DMEM/F12 + 10% FBS e reagente MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-Sali di tetrazolio) (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) in rapporto 6:1 v/v, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice, per valutare la vitalità cellulare. I campioni sono stati quindi analizzati alla lunghezza d'onda di 490 nm utilizzando un lettore di piastre Victor³ 1420 Multilabel Color (Perkin Elmer, Monza, Italia) per misurare la densità ottica. Ciascun punto sperimentale è stato condotto in quintuplicato in almeno tre esperimenti indipendenti.

13.2. Conta Cellulare

Le cellule sono state piastrate in piastre da 12 pozzetti ciascuna, alla densità di 1×10^5 cellule/pozzetto e sono state trattate con o senza concentrazioni crescenti di MTT ai tempi indicati dopo 24h di deprivazione di siero. Ad ogni intervallo di tempo dell'esperimento, le cellule sono state tripsinizzate e contate mediante camera di Burkner. Il numero di cellule è stato ottenuto contando i triplicati di ciascun punto sperimentale in tre esperimenti diversi; le cellule morte sono state escluse dalla conta dopo colorazione con Trypan Blue.

13.3. Incorporazione di [³H] timidina

La sintesi del DNA è stata valutata in base al quantitativo di [³H]TdR incorporata dalle cellule in seguito a precipitazione in buffer TCA (acido tricloroacetico). Le cellule sono state fatte crescere in terreno completo con 10% di FBS fino al 40-50% di confluenza, sono state deprivate del siero per 24h e successivamente sono state trattate con concentrazioni crescenti di MTT per 48h. 4h prima di bloccare la proliferazione, sono stati aggiunti 1.0 mCi/ml di [³H]TdR (6.7 Ci/mmol) in 10% di TCA preraffreddato. Dopo aver effettuato due lavaggi, prima con TCA, poi con metanolo, le cellule sono state solubilizzate in 0.2 M NaOH, ed è stata misurata la radioattività mediante contatore di scintillazione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e ripetuti almeno tre volte.

14. Microscopia elettronica a trasmissione e morfometria mitocondriale

Le cellule H295R e SW13 tenute in coltura sotto diverse condizioni sperimentali, sono state centrifugate, i pellet risospesi in 4% di glutaraldeide, fissati in 1% di tetrossido di osmio, e imbevuti in Epon 812. Sezioni ultrasottili sono state colorate con acetato uranile e subnitrito di bismuto alcalino e analizzate mediante microscopio elettronico JEM1010 (Jeol, Tokyo, Giappone). Le immagini sono state prese a ingrandimenti di 10000X e 50000X utilizzando una fotocamera digitale MegaView III (SIS-Soft Imaging System, Munster, Germania), e quelle ottenute a ingrandimento maggiore sono state utilizzate per l'analisi morfometrica dei mitocondri. Sono stati scelti cinque campi citoplasmatici in maniera randomica per ogni condizione sperimentale, per un totale di circa 20 profili mitocondriali. L'area di superficie mitocondriale e i perimetri delle creste sono stati misurati utilizzando il Software di analisi delle immagini ITEM (SIS). L'alterazione/rigonfiamento mitocondriale è stato valutato calcolando il rapporto tra l'area di superficie e il perimetro totale delle creste. I mitocondri normali e rigonfiati sono stati contati in almeno 5 immagini ingrandite a 10000X per ciascun campione.

15. Valutazione dell'apoptosi mediante analisi citofluorimetrica con strumento muse

Dopo 48h di trattamento con MTT alle dosi di 30 e 50 μ M, le H295R e le SW13 sono state analizzate per valutare l'apoptosi precoce e tardiva e la morte cellulare utilizzando i saggi Annessina V/Morte cellulare (cat#MCH100105, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) e Caspasi 3/7 (cat#MCH100108, Merck Millipore) rispettivamente, seguendo il protocollo della ditta. Basandosi sulla positività dell'attività caspasi 3/7 o sull'esposizione della fosfatidilserina (positività per l'annessina V) nelle cellule apoptotiche e contemporaneamente individuando le cellule morte, positive per il colorante nucleare 7-aminoattinomicina D (7-AAD), entrambi i saggi sono in grado di differenziare quattro popolazioni in ciascun campione mediante separazione citofluorimetrica su un analizzatore di cellule automatico Muse (Merck Millipore): cellule vive non apoptotiche (pannello in basso a sinistra: 7-AAD negative, apoptosi negative), cellule non apoptotiche (pannello in alto a sinistra: 7-AAD positive, apoptosi negative), cellule apoptotiche vive (pannello in basso a destra: 7-AAD negative,

apoptosi positive) e cellule apoptotiche morte (pannello in alto a destra: 7-AAD positive, apoptotiche positive).

16. Preparazione della frazione mitocondriale

Le cellule (1×10^6) sono state lavate una volta in PBS freddo, raccolte mediante scraping con PBS freddo, e centrifugate per 5 min a 800 *g* a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 0.5 ml di buffer raffreddato composto da 250 mM sucrosio, 2 mM HEPES e 0.1 mM EGTA a pH=7.4, e le cellule sono state disgregate mediante 40 colpi di pestello. L'omogenato ottenuto è stato quindi centrifugato per 10 min a 800 *g* a 4°C ed è stato prelevato il supernatante arricchito in mitocondri. Il pellet cellulare è stato risospeso in altri 0.5 ml dello stesso buffer, omogeneizzato, e centrifugato come descritto in precedenza. I due supernatanti sono stati riuniti e centrifugati per 20 min a 13000 *g* a 4°C. Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato risospeso in 100 μ l di buffer contenente 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA e 5 mg/ml BSA a pH=7.4 (Kirby DM et al., 2007) e analizzato per il consumo di ossigeno. I supernatanti sono stati quantizzati in base al contenuto proteico (Coomassie Blue reagent, Bio-Rad). Tutte le procedure descritte sono state realizzate in ghiaccio a 4°C.

17. Analisi del consumo di ossigeno

La misurazione del consumo di ossigeno dei mitocondri isolati da cellule esposte o meno a differenti concentrazioni di MTT per 24h e 48h è stata condotta mediante l'utilizzo dell'ossigrafo (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). 300 μ g di mitocondri sono stati caricati nella camera ossigrafica con 300 μ l di buffer di respirazione, composto da 125 mM KCl, 10 mM Tris/MOPS, 10 mM EGTA/Tris e 1 mM fosfato di potassio monobasico a pH=7.4) (Frezza C et al., 2007).

18. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato valutato in cellule vive in adesione mediante l'uso del colorante cationico, lipofilico JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolo carbocianina ioduro). Per la rivelazione spettro fluorimetrica, le cellule sono state messe in coltura in piastre da 96 pozzetti, mentre per la microscopia a fluorescenza sono state piastrate su vetrini alloggiati in piastre da 6 pozzetti. Dopo 48h di trattamento con dosi differenti di MTT o 2h di trattamento con valinomicina alla concentrazione di 1 μ M, le cellule

sono state lavate e incubate con un terreno di coltura contenente 2.5 µg/ml di colorante fluorescente JC-1 per 30 min a 37°C al buio. Trascorso questo tempo, le cellule sono state lavate in PBS e l'intensità di fluorescenza è stata misurata alle lunghezze d'onda di emissione di 527 nm (verde) e 590 nm (rosso) su un lettore di piastre ELISA Victor³ 1420, Perkin Elmer). Per la microscopia in fluorescenza, i vetrini sono stati lavati e montati con un mezzo specifico (Prolong Gold, Life Technologies Italia) su vetrini più grandi. L'emissione in fluorescenza su due canali è stata acquisita con microscopio in epifluorescenza Leica DM4000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania).

19. Western Blot

Le cellule sono state lisate in buffer RIPA per l'estrazione proteica e le proteine sono state quantizzate con metodica descritta in precedenza; per ciascun campione sono stati prelevati 30 µg di proteine, separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di PVDF (Immobilon, Merck Millipore). A questo punto le membrane sono state incubate ON a 4°C con i seguenti anticorpi: anti-subunità beta della succinato deidrogenasi (SDHB) (Atlas Antibodies, Stoccolma, Svezia), anti-voltage- dependent anion channel (VDAC1) (sc-8828), anti-actina (sc-1615) e anti-caspasi 3 (sc-7272) e successivamente con gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi (Santa Cruz Biotechnology) per essere rivelati in chemiluminescenza con il reagente ECL mediante apparecchio ChemiDoc.

20. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Software SPSS, versione 18.0 (SPSS, Inc.). Per i confronti multipli è stata applicata l'ANOVA seguita dal Test di Dunnett *post hoc*. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. I risultati sono stati espressi come medie \pm S.E.M. se non diversamente specificato. Sulla base delle conte cellulari e delle curve in MTS utilizzando il Software Origin, versione 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), è stato calcolato l'IC50 del MTT, concentrazione che determina il 50% di inibizione della proliferazione cellulare.

RISULTATI

1. Analisi proteomica mediante 2D-DIGE per l'identificazione di nuovi potenziali target terapeutici per il carcinoma corticosurrenalico

1.1. Profilo proteomico differenziale tra ACC e surrene sana

Dal momento che l'analisi differenziale di tessuti tumorali confrontati con tessuti sani o benigni delle corrispondenti controparti è in grado di delineare specifici profili proteomici caratteristici della patologia, nella prima parte di questo studio abbiamo condotto un'analisi del profilo di espressione proteica su 12 campioni di tessuto tumorale derivante da ACC e 8 campioni di surrene sana mediante tecnica di elettroforesi 2D-DIGE. Per l'estrazione del contenuto proteico, ciascun campione è stato sottoposto a disgregazione meccanica mediante Ultraturrax e successiva sonicazione, dopo essere stato risospeso in buffer di lisi proteico; per ottenere una resa migliore, ma anche per eliminare possibili interferenti con la focalizzazione e la successiva corsa elettroforetica, l'estratto proteico è stato quindi purificato mediante l'utilizzo di un kit specifico, il 2-D Clean-Up Kit. A questo punto ogni campione è stato marcato con una delle sonde fluorescenti, CY3 (emissione nel verde ad una lunghezza d'onda di 532 nm) e CY5 (emissione nel rosso ad una λ di 633nm) in maniera arbitraria ma tale da avere una marcatura omogenea con le due sonde nei due gruppi sperimentali. Il terzo fluorocromo, CY2 (emissione nel blu ad una λ di 488 nm) è stato utilizzato per marcare lo standard interno, un pool costituito da uguali quantitativi proteici prelevati da tutti i campioni utilizzati nell'esperimento. Una volta marcati, i campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica bidimensionale, caricando in ciascun gel un campione di surrene sana, uno di ACC e lo standard interno. Dopo la corsa, i gel sono stati sottoposti a scannerizzazione e le immagini relative a ciascuno di essi sono state acquisite mediante apposito strumento, il Typhoon: da ogni gel sono derivate tre immagini (Fig.1), relative ai tre diversi fluorocromi, che sono state successivamente importate nel programma Decyder-2D Software per poter essere confrontate ed analizzate.

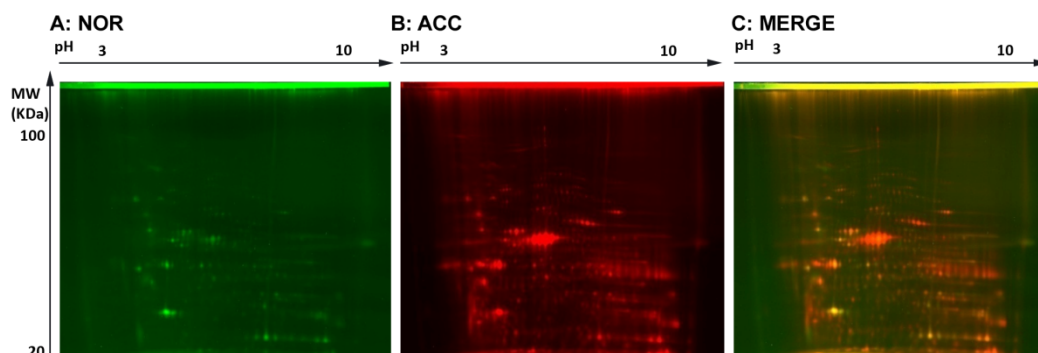


Figura 1: Profili di espressione proteica. Analisi proteomica dei tessuti della corteccia surrenalica. Immagini di gel rappresentative di proteine differenzialmente espresse nel tessuto surrenalico normale (A) e nell'ACC (B). (C) Immagine del gel che rappresenta la sovrapposizione dei 2 fluorocromi. Le proteine estratte dai tessuti sono state marcate con coloranti fluorescenti, Cy3 e Cy5 e separate mediante tecnica 2D-DIGE. Per la separazione in base al punto isoelettrico sono state utilizzate strip IPG (3-10 pI), prima di sottoporre le proteine alla classica corsa elettroforetica mediante SDS-PAGE su gel al 12,5% di poliaccrilammide per la separazione in seconda dimensione.

1.2. Analisi DIA

La prima analisi a cui sono state sottoposte le immagini derivanti dai gel è stata la DIA (Differential In-gel Analysis), che ci ha permesso di rivelare gli spot presenti in tutti i campioni sperimentali, di quantizzarli, normalizzandoli grazie alla presenza dello standard interno, e di confrontarli all'interno di uno stesso gel. Per ciascun gel è stata ottenuta un'immagine relativa al profilo proteico di un ACC, un'altra relativa al profilo proteico di una surrene sana e una terza immagine relativa allo standard interno, in cui sono rappresentate tutte le proteine dei campioni dell'esperimento: proprio grazie alla presenza del pool proteico di tutti i campioni utilizzati nell'esperimento è stato possibile ottenere un link intrinseco tra di essi. In particolare, sono stati identificati 250 spot comuni a tutti i campioni in esame, e per ciascuno di essi è stato calcolato il rapporto tra il valore di emissione in fluorescenza relativo ad un campione di ACC e quello relativo ad un campione di surrene sana presenti sullo stesso gel rispetto al valore di emissione dello standard interno: attraverso questo modulo del Software è stato quindi possibile individuare cambiamenti nei livelli di espressione degli spot all'interno dei singoli gel. Per calcolare il livello di espressione di ogni singolo spot sono stati presi in considerazione parametri come l'area della base dello spot, il volume, l'altezza e la pendenza del picco. Il

programma ha fornito anche un'immagine in 3D relativa agli spot in esame (Fig.2) che è stata di aiuto per discriminare gli artefatti dagli spot proteici reali: normalmente infatti gli artefatti hanno una forma molto sottile e sono appuntiti se comparati alla forma più morbida dello spot proteico; hanno inoltre alti valori di pendenza e valori di area bassi.

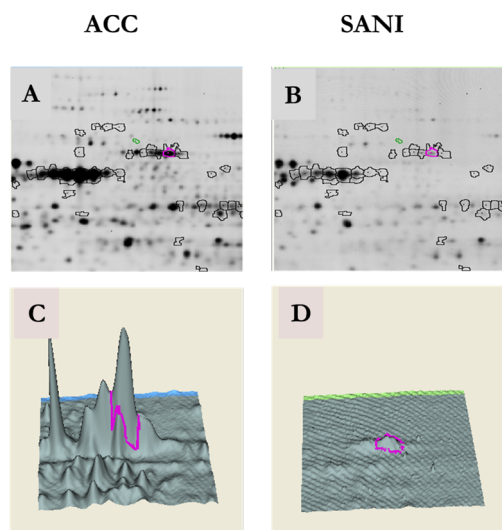


Figura 2: Identificazione e confronto degli spot proteici relativi ad un campione di ACC (A) e ad un campione di surrene sana (B) corsi su uno stesso gel e rappresentazione tridimensionale (C,D) degli spot evidenziati nei pannelli superiori.

1.3. Analisi BVA

La successiva analisi ci ha permesso di effettuare un matching degli spot tra tutti i gel corsi, e quindi una valutazione delle differenze di espressione proteica tra tutti i campioni dell'esperimento. In particolare, è stata applicata un'analisi statistica agli spot identificati utilizzando il T-test e l'ANOVA per individuare quegli spot che mostravano variazioni significative dell'emissione in fluorescenza tra i due gruppi sperimentali. Questo tipo di analisi ha evidenziato una variazione dell'espressione tra il gruppo degli ACC e quello delle surreni sane in 60 spot, con una differenza statistica all'interno del 95esimo percentile (T-Test di Student; $p < 0,05$) (Tabella 2). Abbiamo ottenuto una consistente riduzione del numero degli spot differenzialmente espressi rispetto al numero iniziale perché abbiamo scelto di applicare maggiori criteri di stringenza per minimizzare la variabilità intrinseca associata alle caratteristiche dei pazienti e all'eterogeneità dei tessuti utilizzati; sono quindi stati presi in considerazione per la successiva analisi solamente quegli spot che sono risultati presenti in almeno l'80% dei 20 campioni di tessuto analizzati nell'esperimento (12 ACC e 8 surreni sane) e che hanno mostrato una variazione dell'espressione proteica di almeno 2 volte.

Pos.	T-test	Av. Ratio	Pos.	T-test	Av. Ratio
1	0.015	2.27	31	9.4e-006	6.30
2	0.0090	2.14	32	0.011	-2.32
3	0.014	2.15	33	0.020	3.64
4	0.00015	3.26	34	0.033	2.21
5	0.00048	2.75	35	0.0016	2.27
6	1.3e-005	5.48	36	0.0012	2.39
7	7.1e-006	6.26	37	0.0054	2.04
8	2.6e-006	7.45	38	0.00013	3.16
9	1.2e-006	6.94	39	0.073	2.26
10	2.1e-005	6.43	40	0.0027	2.86
11	0.00044	3.81	41	0.00012	2.77
12	0.0013	-2.27	42	0.00061	4.35
13	2.0e-005	7.52	43	0.00014	5.99
14	0.00012	5.98	44	7.7e-005	5.33
15	0.00036	5.01	45	0.015	2.25
16	9.8e-006	5.08	46	0.015	2.04
17	9.9e-005	5.44	47	4.8e-005	4.93
18	0.0091	5.26	48	0.00016	9.61
19	0.0020	2.36	49	0.00022	9.70
20	0.00036	7.92	50	0.00029	6.32
21	0.0016	4.95	51	0.18	3.53
22	0.00051	2.49	52	0.0080	5.07
23	4.7e-005	4.62	53	0.0014	5.21
24	1.3e-005	5.91	54	0.0023	3.15
25	6.3e-005	5.40	55	0.0069	-2.36
26	0.00096	2.99	56	0.00071	5.69
27	3.5e-005	7.13	57	0.00073	5.80
28	0.013	2.56	58	0.037	2.07
29	6.8e-006	7.27	59	0.00093	4.83
30	0.00031	5.70	60	0.0029	5.18

Tabella 2: Elenco dei 60 spot proteici differenzialmente espresso nell'analisi in 2D-DIGE. La tabella mostra l'analisi statistica dell'espressione differenziale degli spot proteici tra ACC e NOR identificata mediante il Software Decyder. Per ogni spot è riportato il valore P e il rapporto medio (average ratio) dell'espressione tra i campioni di ACC e surreni sane.

Abbiamo a questo punto corso un gel bidimensionale preparativo (Fig.3), sul quale è stato separato un pool proteico formato da aliquote della stessa concentrazione prelevate da tutti i campioni in analisi (quantità proteica totale: 1 mg). I 60 spot di interesse sono stati, quindi, prelevati dal gel, sottoposti a digestione enzimatica ed analizzati in spettrometria di massa: le proteine analizzate sono state infine identificate attraverso il confronto delle masse dei loro peptidi con quelle del database di riferimento Swiss-Prot mediante l'utilizzo del Software MASCOT.

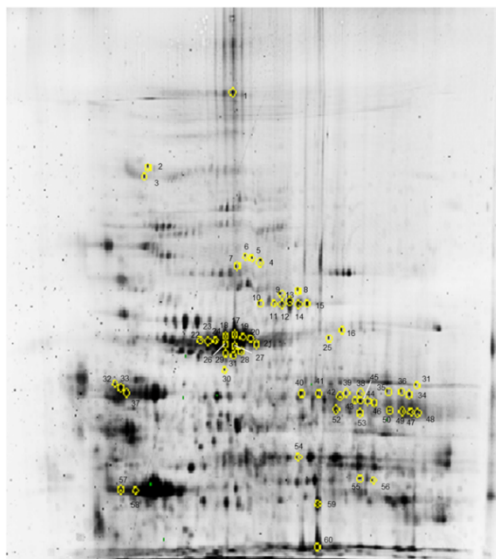


Figura 3: Gel preparativo 2D dal quale sono stati prelevati gli spot per l'identificazione proteica mediante analisi in spettrometria di massa. In giallo sono evidenziati i 60 spot differenzialmente espressi tra i campioni di ACC e surreni sane precedentemente individuati con l'analisi al Software Decyder. Le differenze nell'espressione degli spot sono considerate statisticamente significative con un valore $p < 0.05$, come valutato mediante l'uso del T-test.

In seguito all'identificazione in spettrometria di massa è stata fatta una selezione ulteriore delle proteine da analizzare successivamente; infatti, alcuni degli spot presi in esame sono stati scartati perché non presenti nel 100% dei gel corsi, e, in alcuni di essi, sono state ritrovate differenti isoforme della stessa proteina, caratterizzate da differente punto isoelettrico e peso molecolare. Nei casi in cui sono state identificate più proteine che potevano corrispondere ai frammenti analizzati, sono state scelte solamente quelle che hanno mostrato un numero di peptidi e una copertura della sequenza aminoacidica superiori ai valori di cut-off e con un pH e un peso molecolare coerenti con la posizione su gel (Tabella 3). La maggioranza delle proteine differenzialmente espresse sono risultate upregolate negli ACC rispetto alle surreni sane.

Accession	Coverage	PSM	# Peptides	# AA	MW [kDa]	pI	Score	Description	Spot
gi4557871	41,26	65	29	698	77,0	7,1	259,38	transferrin [Homo sapiens]	8
gi21614499	37,88	43	23	586	69,4	6,3	146,39	ezrin [Homo sapiens]	9
gi63055049	13,40	15	8	612	68,2	6,7	75,80	phosphoglucomutase 2 [Homo sapiens]	11
gi63055049	10,62	9	6	612	68,2	6,7	45,66	phosphoglucomutase 2 [Homo sapiens]	12
gi4506467	21,78	24	13	583	68,5	6,4	77,36	radixin [Homo sapiens]	13
gi4506467	21,78	24	13	583	68,5	6,4	77,36	radixin [Homo sapiens]	14
gi4506467	21,78	24	13	583	68,5	6,4	77,36	radixin [Homo sapiens]	15
gi66346721	6,56	4	4	640	70,7	7,6	32,12	mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	16
gi5031875	14,69	9	7	572	65,1	6,8	33,97	lamin A/C isoform 2 [Homo sapiens]	30
gi153218646	13,24	11	6	521	60,1	8,8	35,70	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 isoform a precursor [Homo sapiens]	34
gi20070125	27,95	29	13	508	57,1	4,9	179,85	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor [Homo sapiens]	33
gi20070125	29,72	108	16	508	57,1	4,9	518,91	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor [Homo sapiens]	32
gi18201905	8,60	6	3	558	63,1	8,3	40,59	glucose phosphate isomerase [Homo sapiens]	36
gi195972866	5,11	4	2	584	58,8	5,2	11,84	keratin 10 [Homo sapiens]	37
gi4885281	19,00	14	9	558	61,4	7,8	79,49	glutamate dehydrogenase 1 [Homo sapiens]	39
gi4507115	9,13	7	4	493	54,5	7,2	32,94	fascin 1 [Homo sapiens]	41
gi91199540	14,54	15	6	509	54,1	7,9	79,58	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Homo sapiens]	42
gi50301238	10,73	8	4	522	56,2	8,5	35,93	glutathione reductase [Homo sapiens]	44
gi50301238	17,05	14	7	522	56,2	8,5	59,59	glutathione reductase [Homo sapiens]	45
gi50301238	17,05	14	7	522	56,2	8,5	59,59	glutathione reductase [Homo sapiens]	46
gi11095441	8,79	8	5	535	57,8	8,5	37,21	aldehyde dehydrogenase 6A1 precursor [Homo sapiens]	47
gi4757810	12,84	10	6	553	59,7	9,1	40,87	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]	48
gi4757810	12,84	10	6	553	59,7	9,1	40,87	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]	49
gi11118981	13,44	12	6	491	53,8	8,4	38,38	ferredoxin reductase isoform 1 precursor [Homo sapiens]	50
gi5453595	18,32	10	7	475	51,6	8,02	37,18	adenylyl cyclase-associated protein [Homo sapiens]	53
gi48255966	16,73	17	8	508	56,9	8,1	74,66	UDP-glucose pyrophosphorylase 2 isoform a [Homo sapiens]	53
gi4758958	10,15	10	3	404	45,5	5,0	48,63	cAMP-dependent protein kinase, regulatory subunit alpha 2 [Homo sapiens]	58
gi17402865	28,28	14	7	297	33,4	7,3	74,87	thiosulfate sulfurtransferase [Homo sapiens]	60

Tabella 3: **Lista delle 22 proteine differenzialmente espresse tra gli ACC e le surreni sane identificate mediante spettrometria di massa.** La tabella mostra la lista di proteine identificate all'interno dei 27 spot selezionati che sono risultati significativamente up- o down-regolati negli ACC rispetto alle surreni sane, prodotta dal Software di analisi. Tutte le differenze sono statisticamente significative, con $p < 0.05$. La presenza della stessa proteina all'interno di spot differenti è dovuta a modificazioni post-traduzionali. In tabella sono indicati il numero di accesso al database, % di copertura, il numero dei peptidi di copertura, il peptide spectrum match (PSM), il numero di aminoacidi (AA), il peso molecolare (MW), il punto isoelettrico calcolato (calc. pI), il numero di score e di spot.

1.4. Analisi dei pattern

Per riuscire ad attribuire anche un significato clinico al profilo di espressione proteica rilevato nei nostri campioni, abbiamo condotto un'analisi di clustering

sui 27 spot selezionati, mediante l'utilizzo della Pattern Analysis (PA). Questo tipo di analisi ha permesso di raggruppare i campioni analizzati in base alle caratteristiche di up- o down-regolazione dell'espressione delle proteine contenute negli spot di interesse: sono stati così ottenuti due distinti clusters, uno corrispondente agli ACC e l'altro alle surreni sane, ad eccezione di 2 campioni di ACC su 12 (17%), che sono stati erroneamente classificati nel gruppo delle surreni sane; tutti i campioni di surrene sana invece sono stati correttamente classificati (Fig.4). All'interno del gruppo degli ACC, la "heat map" ha confermato un profilo di espressione proteica simile in due campioni di uno stesso paziente prelevati dalla zona centrale del tumore, mentre ha evidenziato due differenti profili di espressione in altri due campioni prelevati da zone diverse (interna ed esterna) del tumore di un altro paziente.

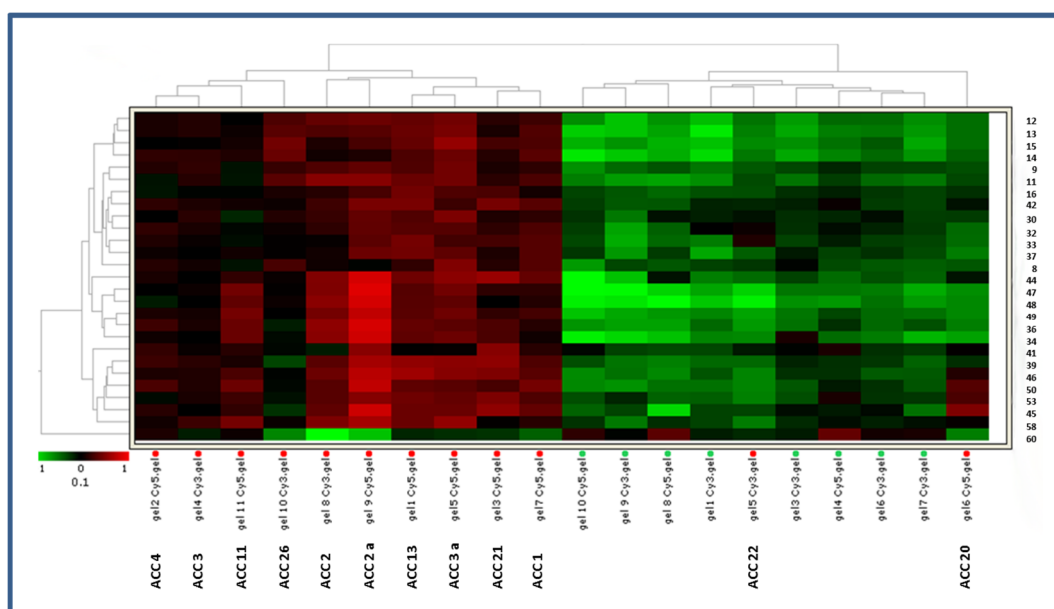


Figura 4: **La heatmap relativa ai 27 spot selezionati ha individuato due clusters indipendenti.** L'analisi gerarchica dei livelli di espressione degli spot in 19 campioni tissutali derivanti da 10 differenti pazienti (11 campioni di ACC) e 8 surreni sane (NOR). L'immagine rappresenta la clusterizzazione gerarchica dei campioni basata sull'analisi in 2D-DIGE dei 27 spot proteici (elencati a destra) differenzialmente espressi tra ACC e NOR. La heat-map mostra i livelli di espressione degli spot proteici in ciascun campione corsi su 10 gel indipendenti. I campioni e i gel sono indicati in basso. Il dendrogramma mostra il grado di similitudine dei pattern di espressione proteica dei due gruppi sperimentali: più i rami sono corti, più risultano simili i campioni. I valori di intensità di ciascuno spot sono rappresentati da una scala cromatica che va dal verde (bassa espressione) al rosso (alta espressione).

1.5. Classificazione funzionale delle proteine identificate e analisi delle correlazioni biologiche

L'ultima analisi condotta sulle proteine identificate in spettrometria di massa è stata la loro classificazione in base alla localizzazione subcellulare e al loro coinvolgimento in diversi processi biologici. La maggioranza delle 27 proteine differenzialmente espresse hanno mostrato una distribuzione predominante a livello del compartimento intracellulare, e in particolare, nel citoplasma e nei mitocondri (Fig.5A). La maggior parte di esse inoltre, è risultata principalmente associata al metabolismo intracellulare (Fig.5B). Eseguendo un'analisi ancora più approfondita dei processi biologici mediante l'utilizzo del Software BiNGO, è emerso che i campioni di ACC sono coinvolti principalmente nel metabolismo delle piccole molecole, degli acidi organici, dei chetoni, del glucosio, dei monosaccaridi, degli alcoli e dei carboidrati, nell'omeostasi redox cellulare e nella produzione di metaboliti ed energia (Fig.6).

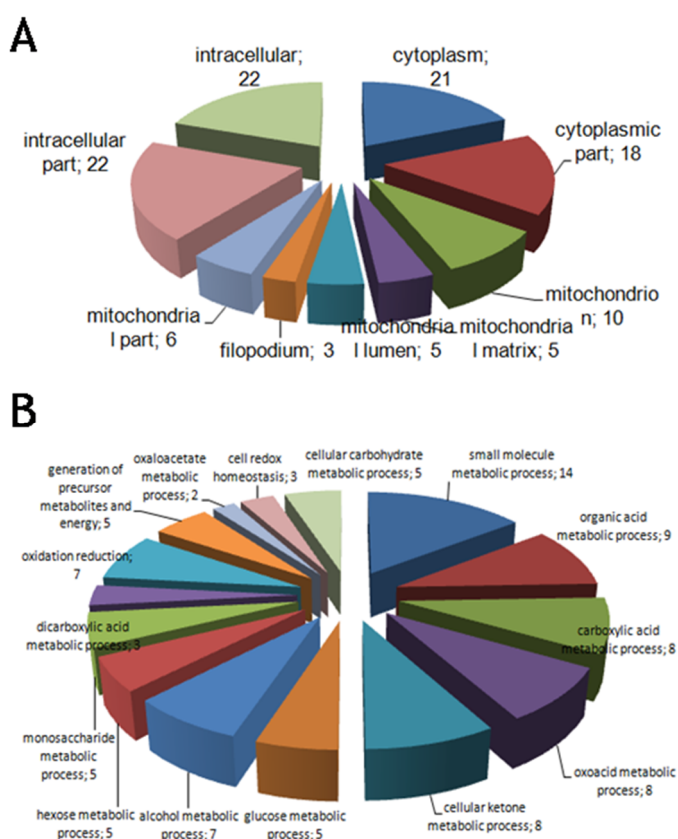


Figura 5: **Classificazione funzionale delle proteine identificate.** Componenti cellulari delle 22 proteine differenzialmente espresse (A) e processi biologici (B) nei quali esse sono coinvolte, valutati con il programma di ricerca BiNGO, in accordo alle loro funzioni e alla localizzazione nella cellula. In figura è indicato il numero di proteine presenti in ciascun processo biologico e per ciascuna componente cellulare.

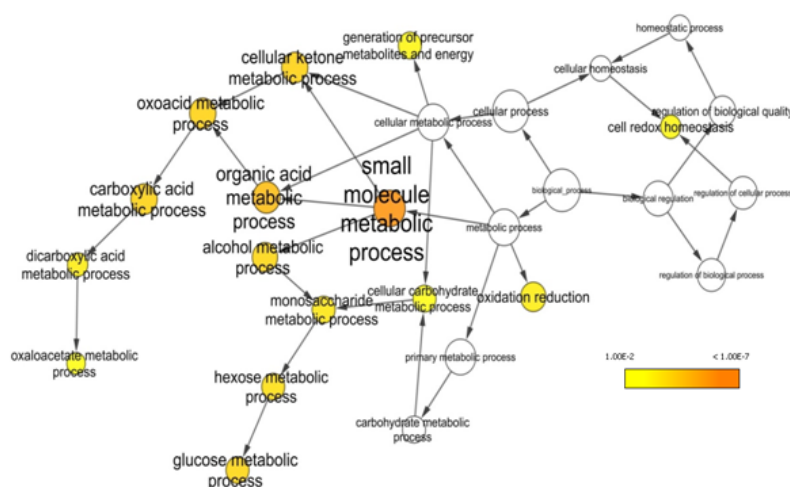


Figura 6: **Analisi arricchita della correlazione tra iprocessi biologici generata dal software BiNGO per le 22 proteine differenzialmente espresse.** La barra colorata in basso a destra indica i livelli di significatività da bassi (giallo) ad alti (arancio). La dimensione di ogni nodo è proporzionale al numero delle proteine coinvolte nel processo biologico corrispondente. In figura sono mostrati solamente i networks statisticamente significativi ($p < 0.01$).

1.6. Validazione delle proteine differenzialmente espresse in Western Blot ed immunistoichimica

Per confermare la modulazione dell'espressione delle proteine identificate mediante spettrometria di massa, abbiamo condotto un'analisi in Western Blotting dei pool dei campioni di ACC e di surreni sane utilizzate in 2D-DIGE. 30 ug di proteine per ciascuno dei due pool sono state caricate su gel di poliaccrilamide e separate mediante elettroforesi monodimensionale; successivamente, le proteine sono state trasferite da gel su membrana di PVDF, e le membrane incubate con gli anticorpi relativi alle proteine selezionate per la validazione e all'actina, utilizzata come proteina di controllo per la normalizzazione. La rivelazione delle bande proteiche è stata fatta in chemiluminescenza, e in seguito all'acquisizione, le immagini relative ai diversi anticorpi (Fig. 7) sono state quantizzate per valutare le differenze di espressione nel gruppo degli ACC rispetto al gruppo delle surreni sane (Fig. 8). La scelta delle proteine da validare si è basata sul ruolo che alcune di esse rivestono in alcune vie di segnalazione coinvolte nella tumorigenesi e nella progressione tumorale, ed in particolare abbiamo confermato l'espressione differenziale di ALDH6A1 (fold increase: 7.4) (Fig. 7A), TRANSFERRIN (fold increase: 3.7) (Fig. 7B), FASCIN1 (fold increase: 2.9) (Fig. 7C), LAMIN A/C (fold increase: 2.2) (Fig. 7D), CAP1 (fold increase: 1.7) (Fig. 7E) e ADX Reduttasi (fold increase: 1.5) (Fig. 7F) negli ACC

rispetto alle surreni sane. Tutte queste proteine sono risultate upregolate negli ACC con una differenza statistica in accordo al rapporto (average ratio) osservato mediante analisi in 2D-DIGE.

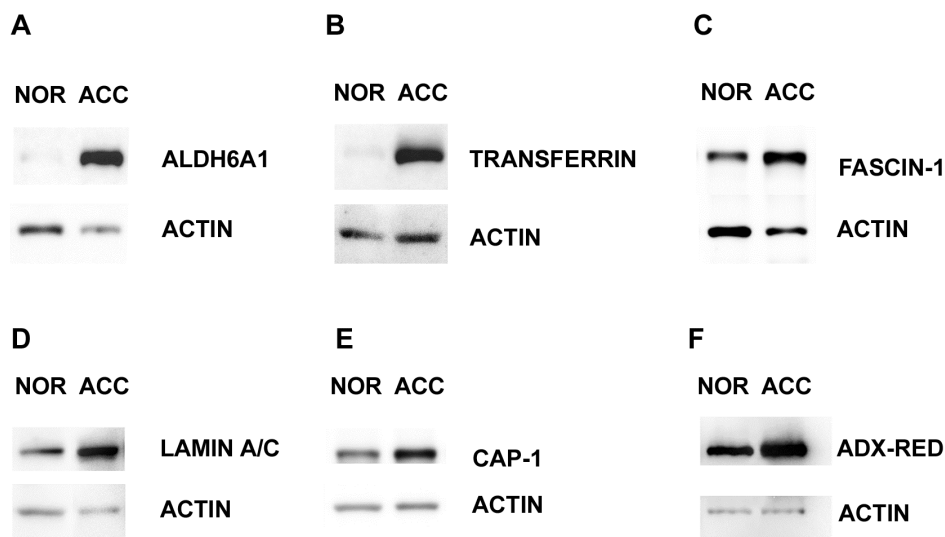


Figura 7: **Analisi in Western Blot delle sei proteine differenzialmente espresse negli ACC e nelle surreni sane.** Western Blot rappresentativo dell'espressione differenziale dell'Aldeide deidrogenasi (ALDH6A1) (A), della Transferrina (B), della Fascina-1 (C), della Lamina A/C (D), della Proteina associata all'Adenililciclasi (CAP-1) (E) e della Ferredossina Reduttasi (FNR) (F) tra gli stessi pool dei campioni di ACC e surreni sane (NOR) utilizzati in 2D-DIGE. Per ciascuna delle sei proteine è rappresentata l'espressione dell'actina come controllo di caricamento.

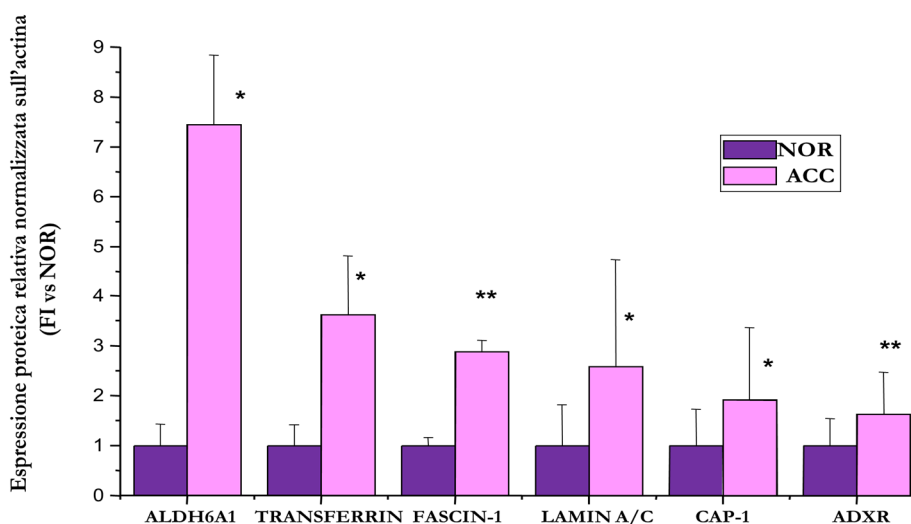


Figura 8: **Quantizzazione delle bande relative all'espressione delle sei proteine differenzialmente espresse negli ACC rispetto alle surreni sane.** Il grafico mostra la media \pm SE dei relativi livelli di espressione per le proteine identificate in rapporto all'actina, utilizzata come controllo interno del caricamento, determinata attraverso un'analisi densitometrica; per ogni proteina sono stati corsi almeno n=3 gel indipendenti. L'analisi statistica è stata condotta mediante T-Test: *p<0.01, **p<0.005.

In ultima analisi, abbiamo confermato i risultati precedenti mediante l'utilizzo dell'immunoistochimica.

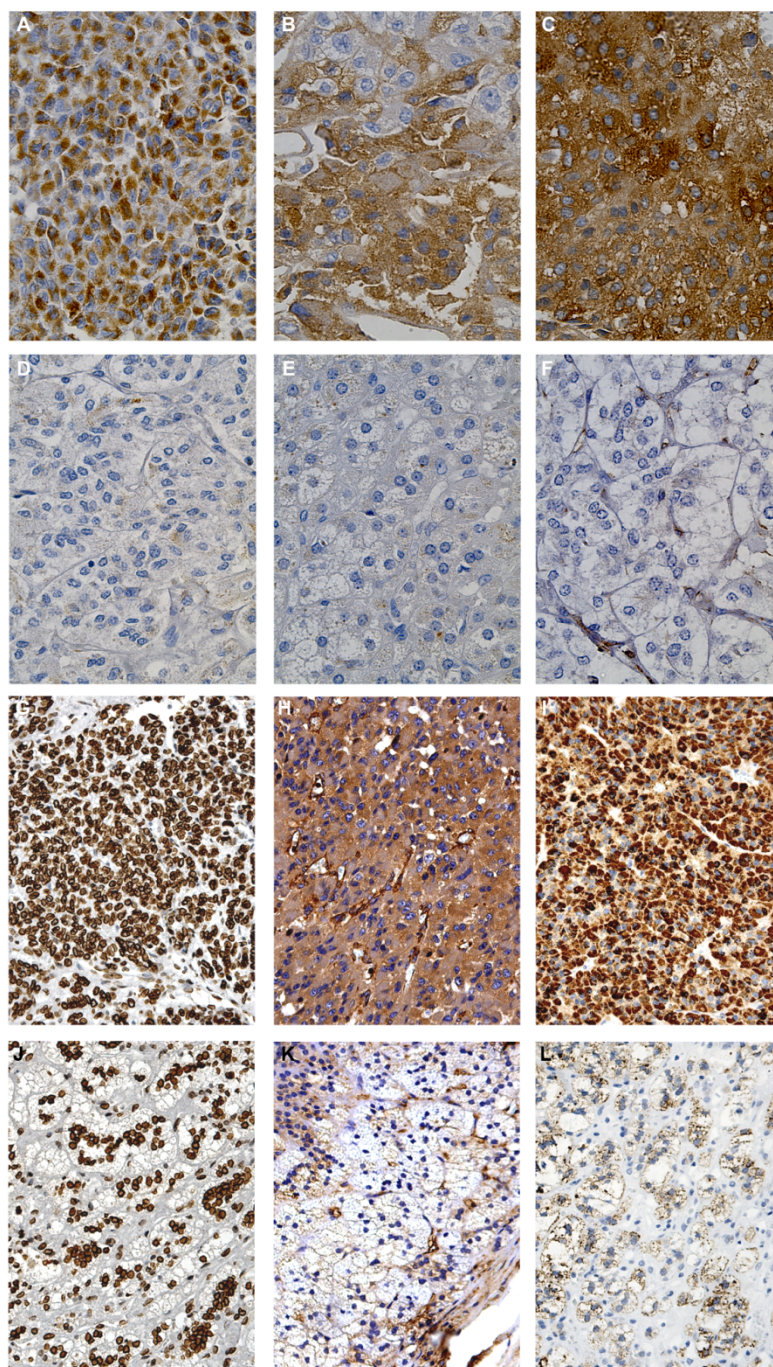


Figura 9: Rivelazione in immunoistochimica delle sei proteine differenzialmente espresse negli ACC e nelle surreni sane. Immagini rappresentative dell'immunoistochimica condotta su campioni tumorali (n=4) e tessuti surrenalici sani (n=3) rivelano una marcata positività per l'ALDH6A1 (A), Transferrina (B), Fascina-1 (C), CAP-1 (H) e Ferredossina Reduttasi (I) nel citoplasma di tutti i tumori, comparati con l'assenza di positività nelle rispettive surreni sane (D-F, K-L). La positività nucleare alla Lamina A/C è diffusa in tutte le cellule tumorali (G) e meno espressa a livello della corteccia surrenalica sana (J).

Questa tecnica ci ha permesso non soltanto di valutare l'espressione delle proteine in esame ma anche di individuarne la localizzazione a livello del tessuto surrenalico. L'analisi è stata condotta su sezioni rappresentative di tessuto sano e tumorale, incubate con gli anticorpi relativi a tutte e sei le proteine già utilizzate per la tecnica di Western Blotting (Fig.9). Abbiamo osservato un segnale marcatamente positivo a livello del citoplasma di tutte le cellule tumorali, probabilmente associato ai mitocondri, per l'ALDH6A1 (Fig. 9A), mentre per la transferrina (Fig. 9B) e la fascina (Fig.9C) è stata rilevata una positività citosolica più diffusa nelle sezioni di ACC. E' stata inoltre evidenziata una marcata positività a livello nucleare per la lamina A/C (Fig.9G) e a livello citosolico per CAP-1 (Fig.9H) e per l'adrenodossina reductasi (Fig.9I) nei campioni di ACC. Al contrario, il segnale relativo a tutti e sei i markers analizzati è risultato completamente negativo nelle surreni sane (Figg.9D, E, F, K, L), ad eccezione della lamina A/C, che ha mostrato una debole positività, seppur minore rispetto alla sezione dell'ACC corrispondente (Fig.9J).

2. Effetti morfofunzionali del Mitotane sui mitocondri delle cellule tumorali umane della corteccia surrenalica

2.1. Il mitotane si accumula nelle H295R in maniera correlata alla dose somministrata

Allo scopo di dimostrare che il mitotane viene metabolizzato non solo a livello epatocitario ma anche localmente nelle cellule tumorali surrenali, e che si accumula nelle cellule insieme ai suoi metaboliti, abbiamo trattato la linea cellulare di tumore corticosurrenalico H295R per 24h con dosi crescenti di MTT e siamo andati a quantificare il DDD e il suo metabolita lipofilico DDE negli estratti cellulari mediante metodica HPLC. Il trattamento con MTT alle dosi di 10-20-30-100 μ M ha determinato un accumulo crescente della molecola DDD e del suo metabolita DDE all'interno di queste cellule all'aumentare della dose somministrata (Fig.10).

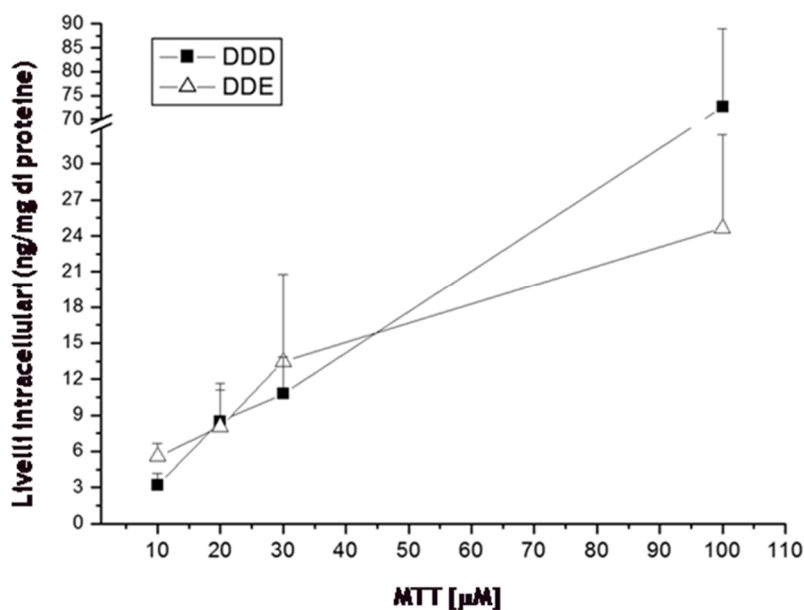


Figura 10: **Le cellule H295R accumulano e metabolizzano il mitotane.** Cellule H295R trattate con concentrazioni crescenti di MTT per 24h. Dopo essere state lavate ripetutamente, le cellule sono state lisate nello specifico buffer per HPLC e le concentrazioni intracellulari di DDD e DDE sono state valutate mediante HPLC. I dati sono espressi come valori di media \pm S.E.M. Gli esperimenti sono stati ripetuti per tre volte in duplicato.

2.2. Il mitotane riduce la vitalità e la proliferazione cellulare delle H295R in maniera dose- e tempo-dipendente

Dopo aver osservato un accumulo del MTT all'interno delle H295R, per valutarne gli effetti abbiamo trattato le cellule con dosi crescenti del farmaco (5-10-20-30 μM) per 7 giorni e siamo andati a valutare la proliferazione cellulare mediante conta cellulare in camera di Burker. Abbiamo osservato una riduzione statisticamente significativa del numero di cellule già a partire dal primo giorno di trattamento alla dose di 20 μM ($p < 0,0001$) (percentuale di inibizione: 60%), con un aumento dell'effetto inibitorio col prolungarsi dei tempi e delle dosi di somministrazione. Dopo sette giorni di trattamento, abbiamo ottenuto un'inibizione della proliferazione cellulare pari al 50% con la dose di 10 μM , al 9% con le dosi di 20 μM e 30 μM rispetto alle cellule di controllo (Fig. 11A).

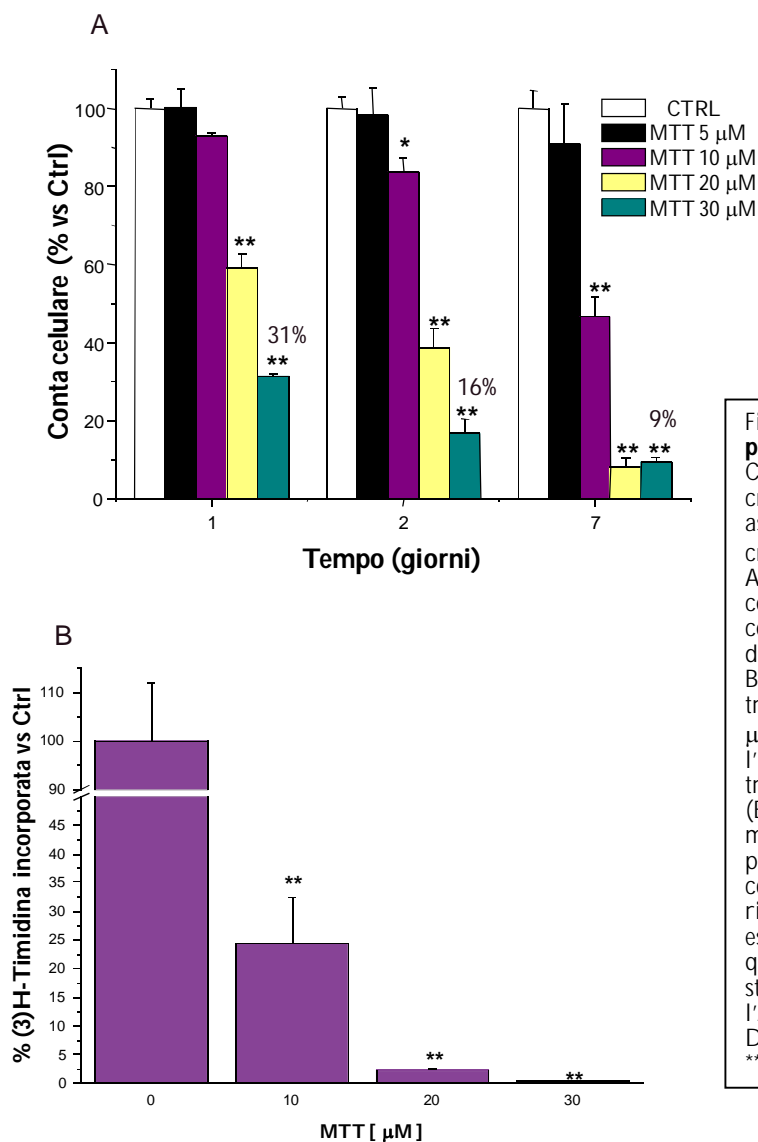


Figura 11: Il MTT inibisce la proliferazione cellulare. Cellule H295R sono state fatte crescere in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di MTT (5-30 μ M). A intervalli differenti, le cellule sono state staccate e le cellule vive sono state contate direttamente in camera di Burkner (A). Dopo 48h di trattamento con MTT (10-30 μ M) è stata valutata anche l'incorporazione di timidina triziata (dopo un pulse di 2h) (B). I dati sono espressi come media dell'incremento percentuale \pm S.E.M. della conta cellulare verso i rispettivi controlli in cinque esperimenti condotti in quintuplicato. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: * $P < 0.01$ e ** $P < 0.0001$.

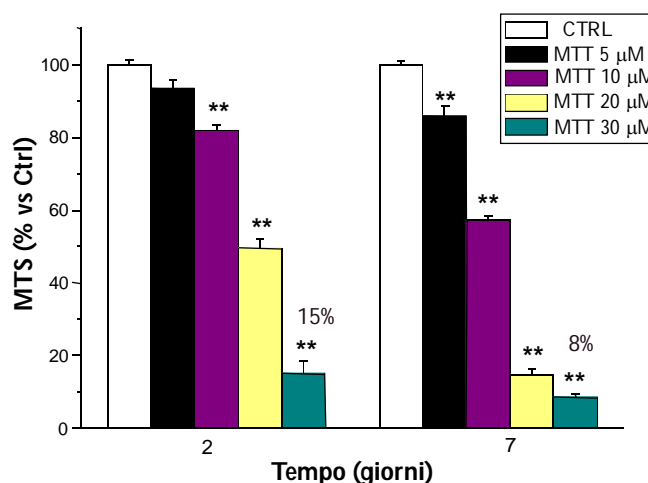


Figura 12: **Il MTT inibisce la vitalità cellulare.** Cellule H295R sono state fatte crescere in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di MTT (5-30 μ M). A intervalli differenti, è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. I dati sono espressi come media dell'incremento percentuale \pm S.E.M. della vitalità cellulare verso i rispettivi controlli in cinque esperimenti condotti in quintuplicato. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: **P<0.0001.

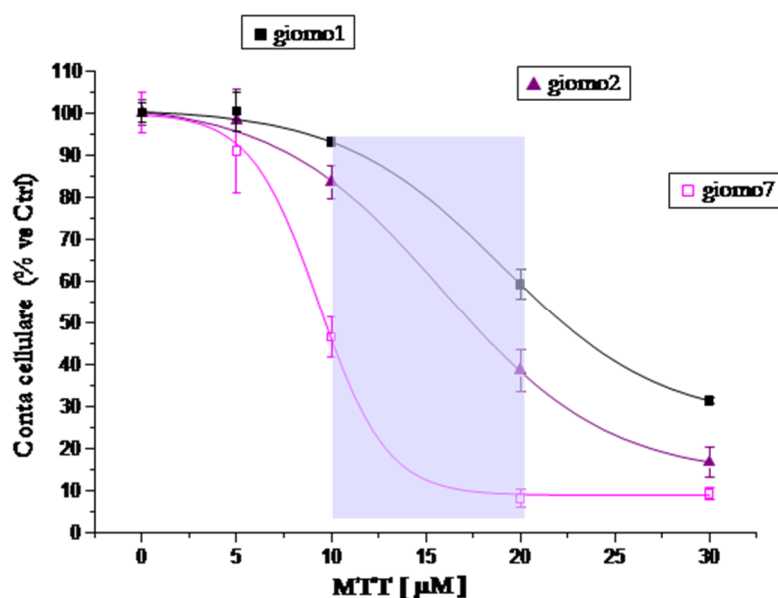
La riduzione del numero di cellule osservata è dovuta ad un effetto inibitorio combinato della vitalità cellulare e della proliferazione, come valutato mediante saggio MTS e di incorporazione di timidina triziata. In seguito a trattamento delle H295R con dosi crescenti del farmaco (5-10-20-30 μ M) per 2 e 7 giorni siamo andati a valutare il potenziale metabolico di queste cellule mediante saggio MTS ed abbiamo osservato un'inibizione della vitalità dose- e tempo-dipendente, con una significatività statistica a partire dalla dose di 10 μ M per i due giorni e già dalla dose più bassa a tempi prolungati (7 giorni)(Fig. 12). Dopo aver osservato un effetto del MTT già a partire dal secondo giorno di trattamento, abbiamo condotto un saggio di incorporazione della timidina triziata somministrando le dosi di 10-20-30 μ M per 48h. La timidina triziata viene incorporata durante il ciclo di replicazione cellulare e la radioattività emessa sarà proporzionale al grado di proliferazione delle cellule: abbiamo determinato la radioattività incorporata nel DNA delle H295R mediante conte al Beta-Counter in seguito a lisi cellulare. L'attività proliferativa è stata espressa come percentuale di incorporazione rispetto alle cellule di controllo non trattate col MTT. I risultati ottenuti hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al controllo per tutte le dosi somministrate, indicando che il farmaco ha un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente (Fig.11B).

Gli esperimenti condotti mediante saggio MTS e conta cellulare ci hanno permesso di definire le curve d'inibizione della crescita cellulare per il mitotane

ai vari tempi di trattamento e di calcolare il valore dell'IC50, che corrisponde alla concentrazione del farmaco a cui si osserva il 50% di inibizione della vitalità o della proliferazione. I valori dell'IC50 calcolati dalle curve di inibizione del mitotane per la vitalità a tempi diversi variano fra 10 e 20 μ M, così come quelli calcolati dalle curve di inibizione per la conta cellulare (Fig.13), confermando una variazione dei valori dell'IC50 all'interno dello stesso range (10-20 μ M): questi risultati dimostrano un valore di MTT coerente derivato da due saggi diversi per la valutazione degli effetti del farmaco su vitalità e proliferazione cellulare.

IC50 \pm SE μ M	
■ Giorno 1	18.0 \pm 1.0 conta cellulare
▲ Giorno 2	15.8 \pm 1.3 conta cellulare 20.9 \pm 3.7 MTS
□ Giorno 7	8.3 \pm 0.1 conta cellulare 8.9 \pm 0.3 MTS

Figura 13: **Curve dell'IC50.** Nel grafico sono rappresentate le curve dose-risposta della vitalità cellulare e della conta ottenute per i tempi indicati in cellule H295R, trattate come precedentemente descritto; le curve sono state utilizzate per calcolare i rispettivi IC₅₀ indicati nell'insero. Le curve della conta cellulare e dell'MTS non differiscono in maniera statisticamente significativa.



2.3. L'effetto del mitotane è specifico per le cellule surrenali

Per confermare l'azione del MTT a livello delle cellule surrenali abbiamo incubato un'altra linea cellulare derivante da un tumore corticosurrenalico, le SW13, con dosi crescenti del farmaco (5-10-20-30 μ M) per 2 e 7 giorni e siamo andati a valutarne la vitalità cellulare mediante saggio MTS: abbiamo osservato anche in questo caso, come per le H295R, un'inibizione della vitalità cellulare in maniera dose- e tempo-dipendente, con un effetto statisticamente significativo già a partire dalla dose più bassa (5 μ M) dopo due giorni di somministrazione del farmaco (Fig.14).

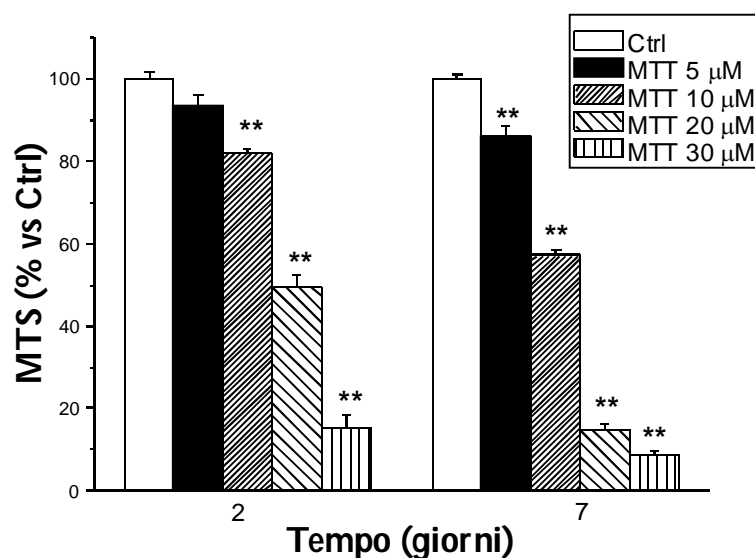


Figura 14: **L'effetto tossico del MTT è specifico per il tumore corticosurrenalico.** La linea cellulare SW13 fatta crescere in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di MTT (5-30 μ M) per 2 e 7 giorni. Dopo intervalli di tempo differenti, è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. I dati sono espressi come media dell'incremento percentuale \pm S.E.M. dell'assorbanza delle cellule trattate con MTT rispetto ai relativi controlli in tre diversi esperimenti condotti in triplicato. L'analisi statistica è stata condotta mediante l'ANOVA seguito dal test di Dunnett: ** $P < 0.0001$.

A questo punto abbiamo voluto verificare se l'effetto tossico esercitato dal MTT fosse o meno specifico per le cellule surrenali, e siamo quindi andati a valutare la vitalità di fibroblasti primari trattati con dosi crescenti del farmaco per tempi comparabili agli esperimenti precedenti: non avendo osservato alcun effetto sulla vitalità di queste cellule, nemmeno alle dosi più alte (Fig.15), abbiamo confermato la specificità del MTT per le cellule tumorali surrenali.

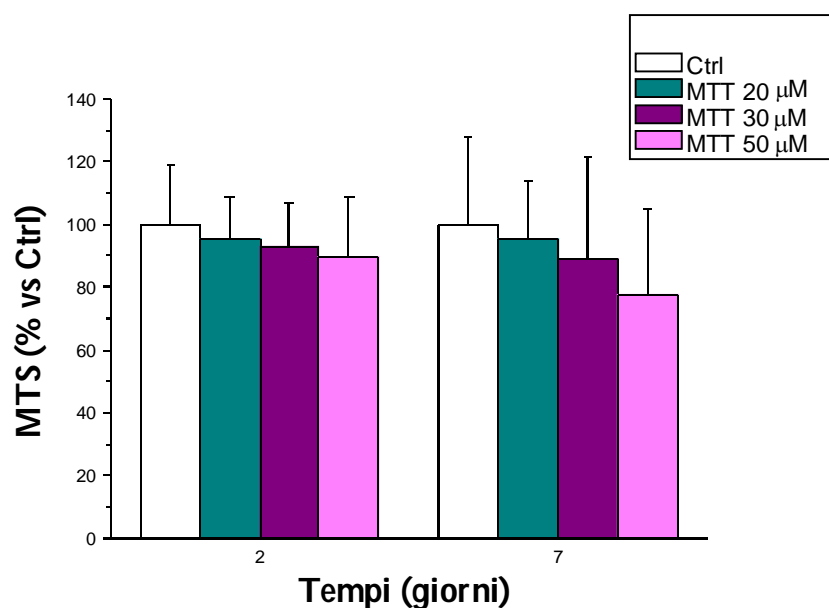


Figura 15: **L'effetto tossico del MTT è specifico per il tumore corticosurrenalico.** Fibroblasti primari fatti crescere in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di MTT (20-50 µM) per 2 e 7 giorni. Dopo intervalli di tempo differenti, è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. I dati sono espressi come media dell'incremento percentuale \pm S.E.M. dell'assorbanza delle cellule trattate con MTT rispetto ai relativi controlli in tre diversi esperimenti condotti in triplicato.

2.4. Il mitotane induce la morte per apoptosi nelle H295R

Per valutare se l'inibizione della vitalità e della proliferazione cellulare esercitata dal MTT fosse causata da morte cellulare per via apoptotica, siamo andati ad analizzare gli eventi apoptotici in citofluorimetria in seguito a trattamento col farmaco. Abbiamo trattato le H295R per 48h con MTT alle dosi di 30 e 50 µM, utilizzando come controllo positivo per l'induzione dell'apoptosi cellule trattate per lo stesso intervallo di tempo con H₂O₂ alla concentrazione di 200µM. Le cellule, trattate e non, sono state analizzate al citofluorimetro Muse, utilizzando due diversi kit che permettono la valutazione del fenomeno apoptotico nelle sue fasi precoci e tardive. Il primo kit ha previsto la marcatura delle cellule con Annessina V, proteina ad elevata affinità per la fosfatidilserina (PS), che viene esposta sulla membrana plasmatica delle cellule durante le prime fasi del processo apoptotico oppure durante la morte per necrosi. Il secondo kit si avvale della marcatura con le caspasi 3/7, che rappresentano i veri e propri effettori dell'apoptosi. Il trattamento con MTT per 48h alle dosi di 30 e 50 µM ha determinato un netto incremento nella percentuale delle cellule apoptotiche, positive per l'annexina V, confrontate con quelle di controllo (Fig.16), in particolare, l'effetto del MTT alla dose di 30 µM è risultato più evidente a livello

della frazione viva delle cellule apoptotiche, con un'induzione del fenomeno apoptotico nel 31,9% delle cellule (Fig.16B), mentre le dosi più alte del farmaco hanno esercitato il loro effetto principalmente sulla frazione morta delle cellule apoptotiche, con una percentuale di cellule in apoptosi pari al 62,2% (Fig.16C).

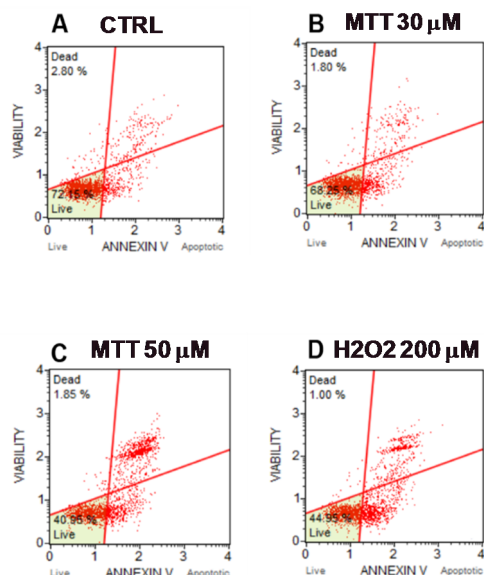


Figura 16: **Il mitotane induce l'apoptosi nelle cellule tumorali corticosurrenaliche.** Dopo 48h di trattamento senza (A) o con MTT alle dosi di 30 (B) e 50 μM (C), o di H₂O₂ alla dose di 200 μM (D), utilizzata come controllo positivo per l'induzione dell'apoptosi, le cellule H295R è stata valutata la percentuale di cellule apoptotiche mediante separazione citofluorimetrica con strumento Muse; nei grafici sono rappresentate, per ciascun trattamento, quattro popolazioni cellulari: vive non-apoptotiche (lower left (LL): 7-AAD negative, negative per l'apoptosi); morte non-apoptotiche (upper left (UL): 7-AAD positive, negative per l'apoptosi); apoptotiche vive (lower right (LR): 7-AAD negative, positive per l'apoptosi); apoptotiche morte (upper right (UR): 7-AAD positive, positive per l'apoptosi). La positività per l'annexina V (A, B, C, D ed E) ha contribuito ad identificare la fase precoce dell'apoptosi (frazione di cellule vive apoptotiche, LR). I plots mostrati sono rappresentativi di quattro esperimenti indipendenti. In figura E è riportata la distribuzione delle medie \pm S.E.M. della percentuale di cellule nelle quattro popolazioni. L'analisi statistica è stata condotta con il T-test applicato ai dati indipendenti per i quattro esperimenti; *P<0.05, **P<0.01 e #P<0.001 verso i rispettivi controlli.

Mediante l'utilizzo di questo primo kit abbiamo quindi osservato un aumento medio \pm S.E.M. nella percentuale apoptotica totale in risposta al trattamento con MTT e con H₂O₂, utilizzata come controllo positivo (Fig.16E). Successivamente, siamo andati a valutare l'attività di un altro marker, la caspasi 3/7, che ci ha permesso di confermare i risultati ottenuti in precedenza (Fig.17). Questi esperimenti hanno quindi evidenziato come l'azione tossica del MTT si espliciti attraverso un meccanismo di induzione della morte cellulare per via apoptotica.

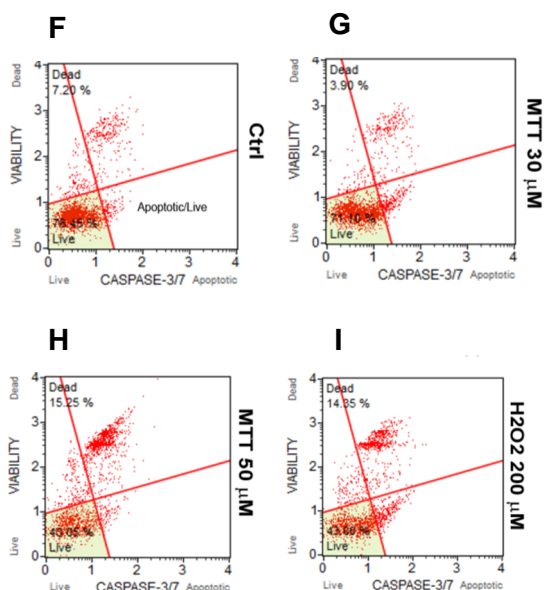


Figura 17: **Il mitotane induce l'apoptosi nelle cellule tumorali corticosurrenaliche.** Dopo 48h di trattamento senza (F) o con MTT alle dosi di 30 (G) e 50 μM (H), o di H₂O₂ alla dose di 200 μM (I), utilizzata come controllo positivo per l'induzione dell'apoptosi, è stata valutata la percentuale di cellule apoptotiche mediante separazione citofluorimetrica con strumento Muse; nei grafici sono rappresentate, per ciascun trattamento, quattro popolazioni cellulari: vive non-apoptotiche (lower left (LL): 7-AAD negative, negative per l'apoptosi); morte non-apoptotiche (upper left (UL): 7-AAD positive, negative per l'apoptosi); apoptotiche vive (lower right (LR): 7-AAD negative, positive per l'apoptosi); apoptotiche morte (upper right (UR): 7-AAD positive, positive per l'apoptosi). La positività per l'attività della caspasi 3/7 (F, G, H, I ed J) ha contribuito ad identificare la fase tardiva dell'apoptosi (frazione di cellule vive apoptotiche, LR). I plots mostrati sono rappresentativi di quattro esperimenti indipendenti. In figura J è riportata la distribuzione delle medie ±S.E.M. della percentuale di cellule nelle quattro popolazioni. L'analisi statistica è stata condotta con il T-test applicato ai dati indipendenti per i quattro esperimenti; *P<0.05, **P<0.01 e #P<0.001 verso i rispettivi controlli.

Risultati simili sono stati ottenuti anche nella linea cellulare SW13 (Fig.18).

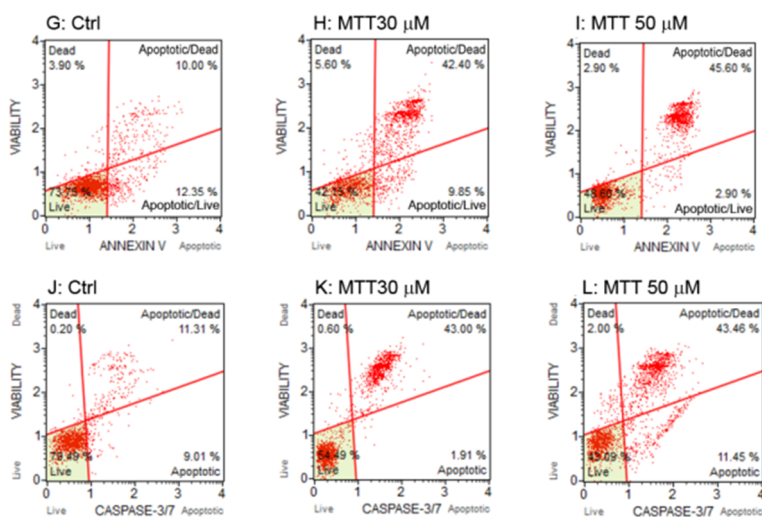


Figura 18: **Il mitotane induce l'apoptosi nelle cellule tumorali corticosurrenaliche** I grafici derivanti da separazione citofluorimetrica delle SW13 sono rappresentativi di quattro esperimenti indipendenti condotti per la rivelazione dell'Annessina V (G, H, I) e per l'attività della caspasi 3/7 (J, K, L), in seguito a trattamento con MTT alle dosi di 30 e 50 μM per 48h.

2.5. Il mitotane induce un' alterazione morfologica a livello dei mitocondri nelle H295R in maniera dose- e tempo-dipendente

Dopo aver osservato gli effetti del mitotane a livello cellulare, siamo andati a studiare il coinvolgimento delle strutture intracellulari in seguito a trattamento con dosi crescenti del farmaco (10-30-50 μM) per 24h, mediante l'utilizzo della microscopia elettronica. Le prime immagini, ottenute con l'utilizzo di un ingrandimento 10000X, mostrano scatti rappresentativi di una cellula per campo nei quali si apprezza una progressiva alterazione a livello morfologico all'aumentare della dose di mitotane somministrata (Figg. 19A, B, C, D, I, J, K, L). Aumentando l'ingrandimento (50000X), si osserva la presenza di alterazioni anche a livello delle strutture intracellulari, in particolare a livello mitocondriale: mentre le cellule di controllo non trattate sono caratterizzate da mitocondri allungati, a forma di bastoncino, con numerose creste e una matrice densa (Figg.19E, M), le cellule trattate mostrano alterazioni dei mitocondri correlate alla dose di MTT; in particolare, possiamo osservare un rigonfiamento consistente dei mitocondri, accompagnato da una riduzione della densità della matrice ed una progressiva disgregazione delle creste (Figg.19F, G). Le più gravi alterazioni mitocondriali si manifestano con la comparsa di vacuoli contenenti residui di membrane elettrondensi simili a mielina (Fig.19H). Successivamente, siamo andati a studiare le alterazioni indotte dal mitotane alla dose di 10 μM nel tempo, prolungando la sua somministrazione fino a 10 giorni, ed abbiamo osservato la comparsa di cambiamenti morfologici più pronunciati rispetto a quelli evidenziati in seguito al trattamento per 24h: a 48h, i cambiamenti più evidenti sono il rigonfiamento mitocondriale e la rottura delle creste (Figg.19J, N); dopo 5 giorni, la maggior parte dei mitocondri delle cellule risultano rigonfiati, con presenza di detriti di membrana simili a mielina, mentre alcune cellule sembrano necrotiche con nuclei slargati e citoplasma gravemente vacuolato (Figg.19K, O); dopo 10 giorni, praticamente tutte le cellule sono disgregate a causa dell'effetto altamente tossico del MTT, e le uniche cellule presenti mostrano caratteristiche intermedie tra apoptosi e necrosi, come condensazione della cromatina tipica dei nuclei apoptotici e rottura della membrana plasmatica tipica delle cellule necrotiche; i mitocondri sono difficilmente riconoscibili (Figg. 19L, P).

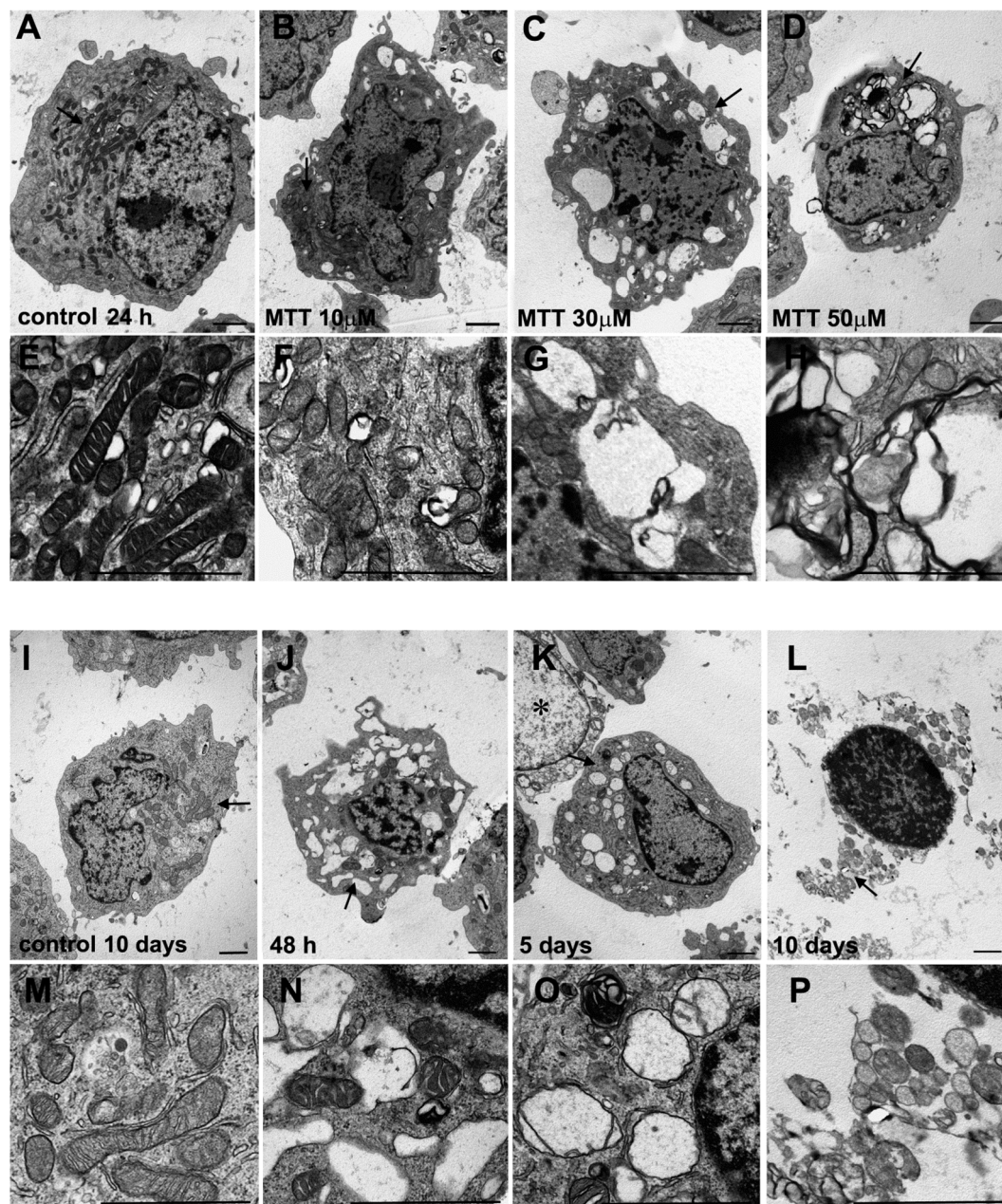


Figura 19: **Il trattamento con MTT determina un'alterazione morfologica mitocondriale nelle H295R in maniera dose- e tempo-dipendente.** Le immagini in microscopia elettronica B, C, D, F, G e H sono rappresentative di cellule cresciute per 24h in presenza di concentrazioni crescenti di MTT (10-50 μM). Le figure A ed E mostrano cellule di controllo non trattate. Le immagini sono state scattate a ingrandimenti differenti: 10000X (A, B, C, D) e 50000X (E, F, G, H). Le immagini in microscopia elettronica J, K, L, N, O e P sono rappresentative di cellule cresciute per tempi differenti in terreno di coltura a cui è stato aggiunto il MTT alla concentrazione di 10 μM , mentre le immagini I ed M rappresentano cellule di controllo non trattate ma tenute in coltura per 10 giorni. Le frecce indicano le aree citoplasmatiche corrispondenti ai pannelli inferiori a maggiore ingrandimento (E, F, G, H, M, N, O e P). Le barre riportate in basso a destra delle figure corrispondono a 1 μm .

Alterazioni simili a livello delle ultrastrutture, in seguito a trattamento con MTT a dosi e tempi crescenti, sono state osservate anche nelle SW13 (Fig.20).

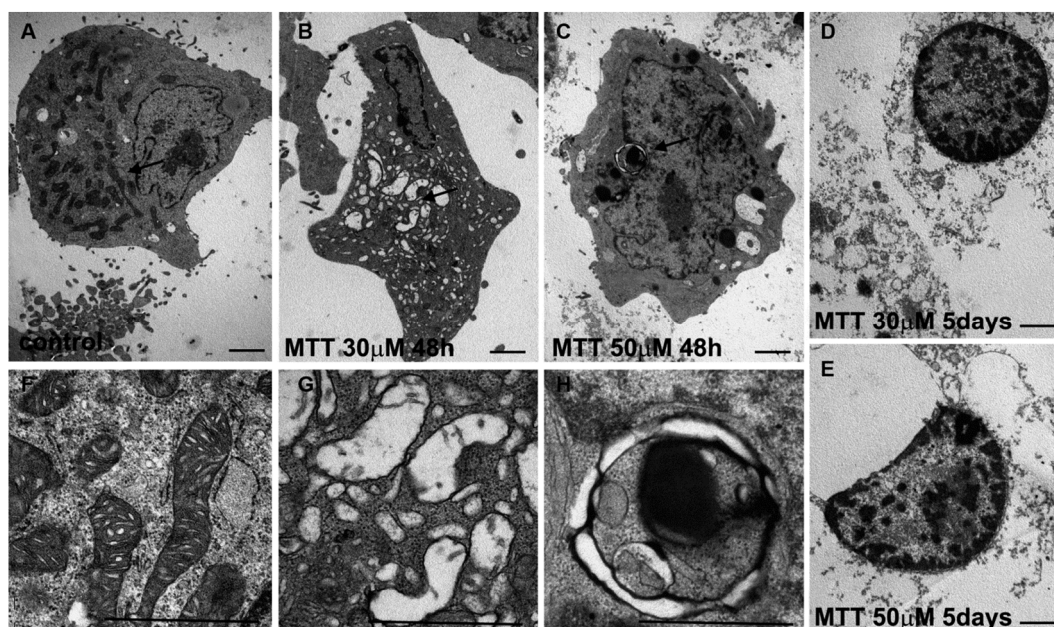


Figura 20: **Il trattamento con MTT determina un'alterazione morfologica mitocondriale nelle cellule SW13 in maniera dose- e tempo-dipendente.** Le figure mostrano immagini rappresentative di cellule cresciute in assenza o in presenza di MTT alle concentrazioni di 30 e 50 μM , per 48h e 5 giorni. In A ed F sono mostrate le cellule di controllo non trattate dopo 5 giorni di coltura. Le frecce indicano le aree citoplasmatiche corrispondenti ai pannelli inferiori a maggiore ingrandimento (F, G ed H). Le barre riportate in basso a destra delle figure corrispondono a 1 μm .

Le immagini ottenute hanno evidenziato una progressiva alterazione della morfologia mitocondriale all'aumentare della dose di mitotane somministrata e della durata del trattamento, sia a livello delle H295R che delle SW13.

2.6. Il mitotane induce alterazioni quantitative morfometriche a livello dei mitocondri delle H295R

Come risulta evidente dalle immagini ottenute in microscopia elettronica (Fig.19), il numero totale dei mitocondri diminuisce all'aumentare delle dosi di MTT somministrate alle cellule, e la diminuzione del numero dei mitocondri normali si accompagna ad un significativo aumento di quelli rigonfiati. In seguito a trattamento con MTT per 48h, abbiamo quindi condotto un'analisi

morfometrica quantitativa dei mitocondri mediante l'utilizzo di una fotocamera digitale MegaView III; abbiamo selezionato in maniera arbitraria cinque campi citoplasmatici per ciascuna condizione sperimentale, per un totale di circa 20 profili mitocondriali, ripetendo gli esperimenti almeno tre volte. Dalle analisi effettuate abbiamo osservato che il trattamento con MTT determina una riduzione del numero totale dei mitocondri all'aumentare della dose somministrata, e in particolare, un significativo decremento nel numero dei mitocondri si accompagna ad un concomitante aumento del numero dei mitocondri rigonfiati (Fig.21).

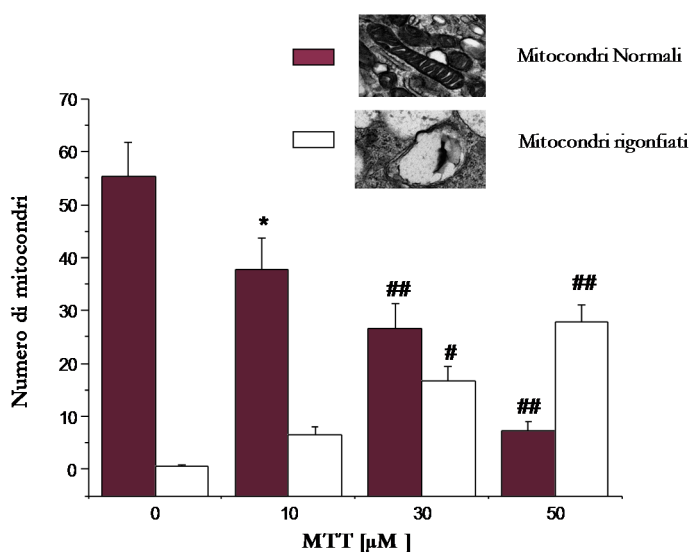


Figura 21: **Il MTT induce alterazioni morfometriche nei mitocondri delle H295R.** Il trattamento con MTT per 48h determina una significativa riduzione del numero dei mitocondri normali in concomitanza con un significativo aumento di quelli rigonfiati. I dati sono espressi come medie \pm S.E.M. dei mitocondri normali e rigonfiati contati in almeno cinque immagini ottenute in microscopia elettronica a ingrandimento 10000X per ogni campione. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: * $P < 0.05$, # $P < 0.005$ e ## $P < 0.001$ verso i rispettivi controlli.

Per chiarire la natura di queste alterazioni mitocondriali indotte dal MTT, abbiamo calcolato il rapporto tra l'area e la lunghezza totale delle creste interne alla membrana mitocondriale nei singoli mitocondri: la scelta di valutare questo parametro arbitrario è derivata dalla considerazione che in questo modo vengono presi in esame entrambi gli aspetti del danno mitocondriale, il rigonfiamento (determinato da un aumento dell'area mitocondriale) e la diminuzione del numero e dell'estensione delle creste della membrana interna (decremento nella lunghezza totale delle creste). Questo rapporto è risultato significativamente aumentato all'aumentare delle dosi di MTT (Fig. 22A) e con il prolungarsi della durata di trattamento (Fig. 22B) nelle cellule H295R.

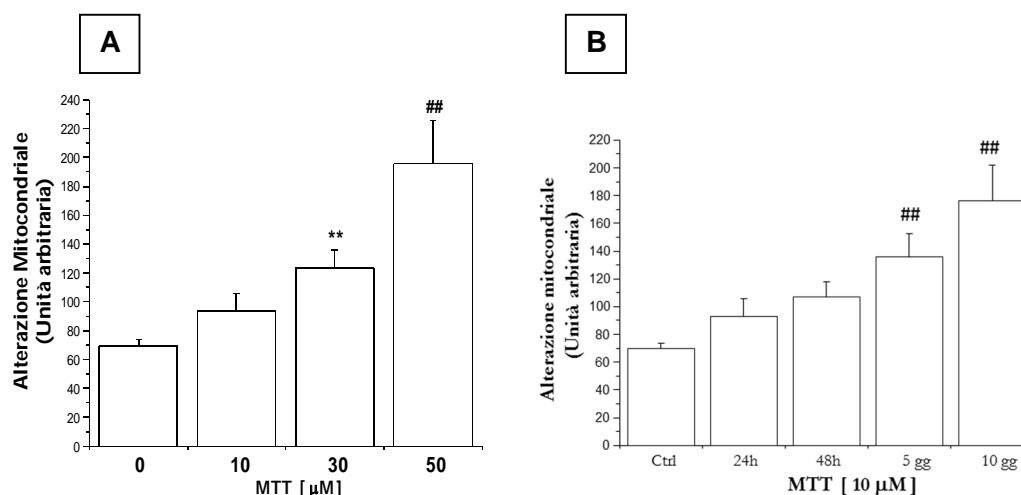


Figura 22: **Il MTT induce alterazioni morfometriche nei mitocondri delle H295R.** Il trattamento con MTT induce un'alterazione morfologica nei mitocondri, che si riflette in un aumento dell'area totale e dell'alterazione delle creste interne, quantificata come rapporto tra l'area mitocondriale e la lunghezza totale delle creste interne (unità arbitraria). Nei grafici sono riportati i rapporti medi \pm S.D., che aumentano in maniera dose-dipendente (trattamento di 48h, A) e tempo-dipendente (B). L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: ** $P < 0.01$, # $P < 0.005$ e ## $P < 0.001$ verso i rispettivi controlli.

Analoghi risultati sono stati ottenuti anche per le cellule SW13 (non mostrati).

2.7. Il trattamento con mitotane determina una perturbazione del potenziale di membrana mitocondriale nelle H295R

Dal momento che la riduzione nell'estensione delle creste interne potrebbe ripercuotersi sulla funzionalità mitocondriale, siamo andati a valutare se le lesioni strutturali dei mitocondri determinassero conseguenti alterazioni a livello della loro funzionalità. Abbiamo valutato il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) in cellule vive in adesione su vetrino mediante l'utilizzo del fluorocromo cationico e lipofilico JC-1, dopo averle trattate con dosi crescenti di MTT o con valinomicina (VAL), utilizzata come controllo positivo, per 48h. Il JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazole carbocyanine iodide) è un colorante che si accumula nei mitocondri delle cellule sotto forma di aggregati che emettono una fluorescenza diversa in base al potenziale di membrana; in particolare, si ottiene un'emissione in rosso in seguito all'accumulo di colorante nei mitocondri attivi dovuto ad un elevato potenziale transmembrana negativo oppure un'emissione diffusa di fluorescenza in verde in presenza di potenziale di membrana ridotto determinato dalla presenza di mitocondri alterati. L'analisi al

microscopio in epifluorescenza ci ha permesso di apprezzare uno shift della molecola di colorante dalla fluorescenza in rosso a quella in verde nelle cellule trattate con MTT alle dosi di 10 e 30 μM per 48h (Fig.23C, D rispettivamente); questo cambiamento è risultato maggiore rispetto a quello osservato nelle cellule non trattate (Fig.23A) e anche più pronunciato rispetto a quello del controllo positivo rappresentato dalle cellule trattate con valinomicina alla dose di 1 μM per 48h (Fig.23B).

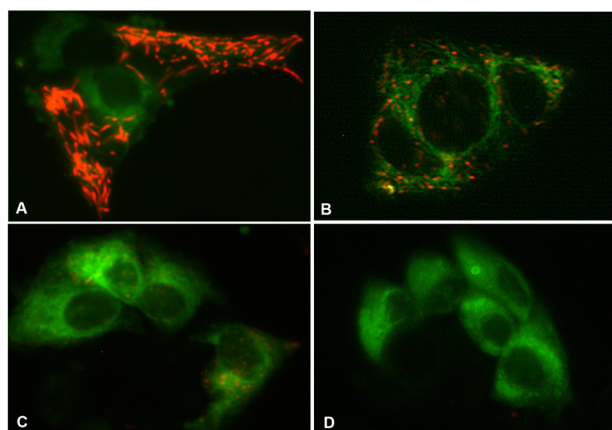
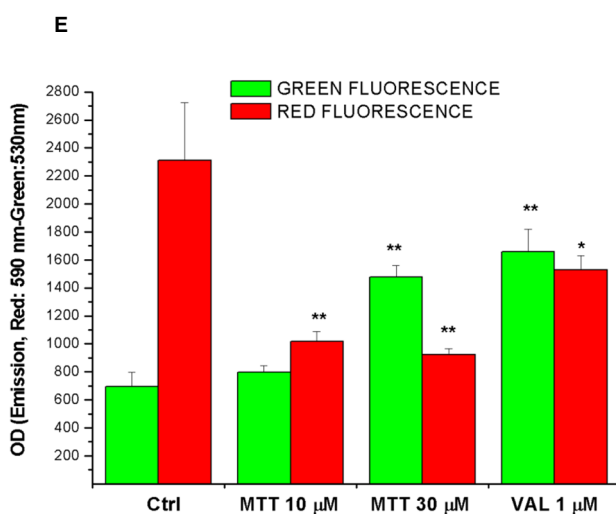


Figura 23: Il trattamento con MTT determina una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi\text{m}$) nelle H295R. Le immagini sono state acquisite al microscopio in epifluorescenza e mostrano cellule non trattate (A) o trattate con MTT 10 μM (C), 30 μM (D), o VAL 1 μM (B) in un esperimento rappresentativo. Le immagini sovrapposte sono state ottenute con eccitazione/emissione di 490/530 nm per la fluorescenza in verde e 525/590 nm per la fluorescenza in rosso. Nel grafico E è riportata la valutazione quantitativa dell'emissione in fluorescenza rossa e verde. I dati sono espressi come media della densità ottica (OD) \pm S.E.M. a due λ di emissione (530 per il verde e 590 per il rosso) valutata spettrofluorimetricamente in almeno sei replicati per ogni campione in tre diversi esperimenti. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguito dal test di Dunnett: * $P < 0.005$ e ** $P < 0.001$ verso i rispettivi controlli in rosso e in verde.



Successivamente abbiamo condotto un'analisi quantitativa dell'emissione in fluorescenza, andando a misurare la densità ottica (OD) alle due diverse lunghezze d'onda (530 e 590 nm per l'emissione in verde e in rosso rispettivamente) mediante valutazione allo spettrofotometro di almeno sei replicati per ciascun campione in tre diversi esperimenti. In seguito a trattamento con MTT si assiste ad una significativa riduzione della fluorescenza

in rosso in concomitanza con un aumento dell'emissione in verde (Fig.23E), che diventa significativo per la dose maggiore di MTT (30 μ M): questi risultati indicano che il MTT determina una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule H295R.

2.8. Il trattamento con mitotane determina una diminuzione del consumo di ossigeno nei mitocondri isolati dalle cellule H295R

Il passo successivo è stato quello di andare a valutare se la perturbazione del potenziale mitocondriale avesse degli effetti anche a livello della respirazione. Abbiamo quindi valutato la respirazione di mitocondri vivi isolati da cellule H295R trattate o meno con concentrazioni crescenti di MTT (10-30-50 μ M) per 48h, andando a misurare il consumo di ossigeno in seguito all'aggiunta di succinato 5 mM quale substrato respiratorio. La respirazione è stata valutata per 5 minuti a temperatura controllata di 37°C mediante l'utilizzo dell'ossigrafo. Nei mitocondri di controllo, il consumo endogeno di ossigeno, pari a 22 ± 8 nmol di ossigeno/ml, è aumentato a 29 ± 8 nmol in seguito a stimolazione con succinato (Fig. 24A). Come rappresentato dal grafico a barre (Fig. 24B), il trattamento con MTT determina una riduzione statisticamente significativa del consumo di ossigeno a livello mitocondriale in maniera dose dipendente; alla dose più alta (50 μ M) l'effetto è massivo, con un'inibizione della respirazione fino all' $82 \pm 10\%$.

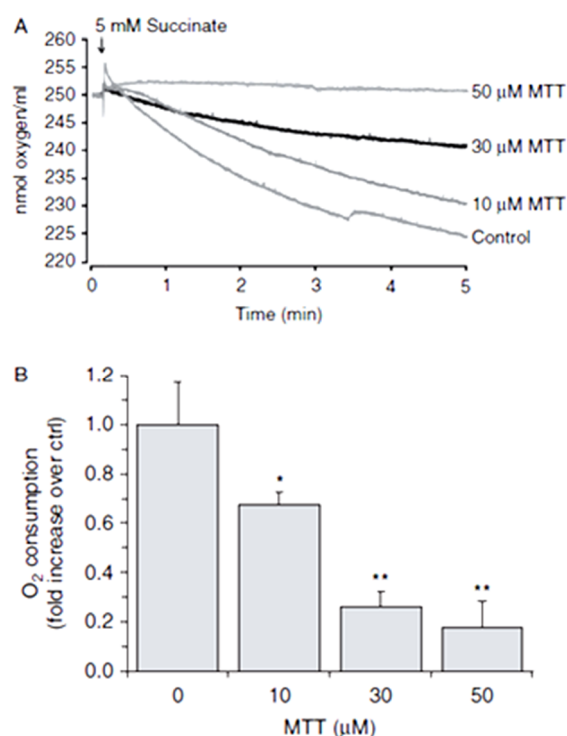


Figura 24: **Il MTT induce una riduzione del consumo di ossigeno in mitocondri isolati da cellule H295R.** Il grafico A mostra un esperimento rappresentativo degli effetti del trattamento con MTT (10-30 e 50 μM) per 48h sul consumo di ossigeno. Le tracce rappresentano il consumo di ossigeno durante 5 minuti di respirazione in mitocondri vivi (1mg proteine/ml) isolati da campioni differenti. La freccia indica il momento temporale in cui i mitocondri sono stati stimolati con succinato 5 mM. La respirazione è stata seguita per 5 min a 37°C. In figura B è riportato il consumo di ossigeno espresso come media del *fold increase* ± S.E.M. verso i rispettivi controlli (cellule non trattate) in quattro esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: *P<0.05 e **P<0.001 verso i controlli.

2.9. Il mitotane svolge la sua azione sugli enzimi della catena respiratoria, su proteine strutturali di membrana dei mitocondri e sull'attività delle caspasi nelle H295R

Dal momento che il ridotto consumo di ossigeno osservato in risposta al trattamento con MTT potrebbe essere causato da un danno diffuso dell'organizzazione delle membrane mitocondriali e/o da un'interferenza specifica con gli enzimi della catena respiratoria, abbiamo valutato gli effetti del farmaco sull'espressione di un canale strutturale della membrana esterna dei mitocondri, il canale anionico voltaggio-dipendente, VDAC, e di uno degli enzimi della catena respiratoria presenti sulla membrana mitocondriale interna, SDH. Abbiamo condotto un'analisi in Western Blotting, caricando su gel i lisati corrispondenti alle cellule, trattate e non, con dosi crescenti di MTT (30-50 μM) per 48h e andando a valutare l'espressione delle proteine SDHB, VDAC e caspasi 3 clivata, dopo aver normalizzato sui rispettivi livelli di espressione della proteina di controllo actina, espressa costitutivamente.

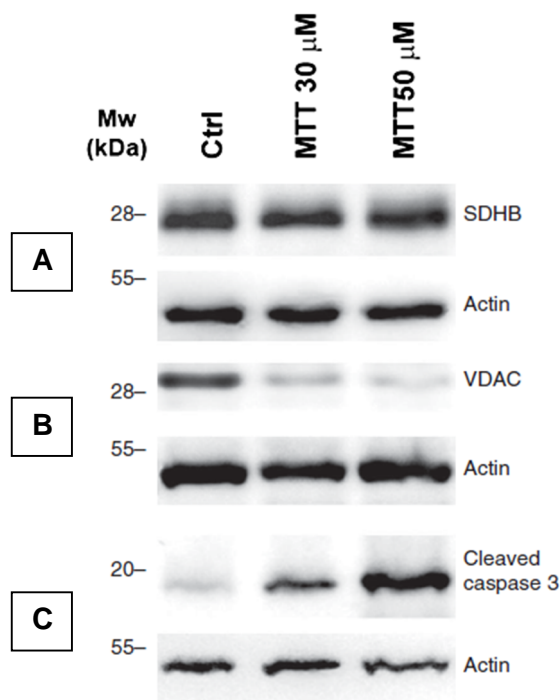


Figura 25: **Effetto del MTT sugli enzimi della catena respiratoria, su proteine strutturali delle membrane mitocondriali e sull'attività della caspasi nelle cellule H295R.** Western Blot rappresentativi dell'espressione delle proteine SDHB (A), VDAC (B) e caspasi 3 clivata (C), con le relative actine, in cellule H295R trattate o meno con MTT alle dosi di 30 e 50 μM per 48h.

Da questa analisi è emerso che in seguito a trattamento con MTT i livelli di espressione di SDHB rimangono stabili, come risulta evidente dallo sviluppo delle membrane e dalla successiva analisi densitometrica quantitativa (Fig.25A), mentre i livelli di espressione di VDAC sono significativamente diminuiti, in maniera dose-dipendente (Fig. 25B). I livelli di espressione della caspasi 3 clivata risultano aumentati (Fig.25C), e l'aumento diventa statisticamente significativo alla dose più alta del farmaco (Fig. 26), in accordo con i risultati ottenuti in citofluorimetria alle stesse dosi di MTT e allo stesso tempo di trattamento.

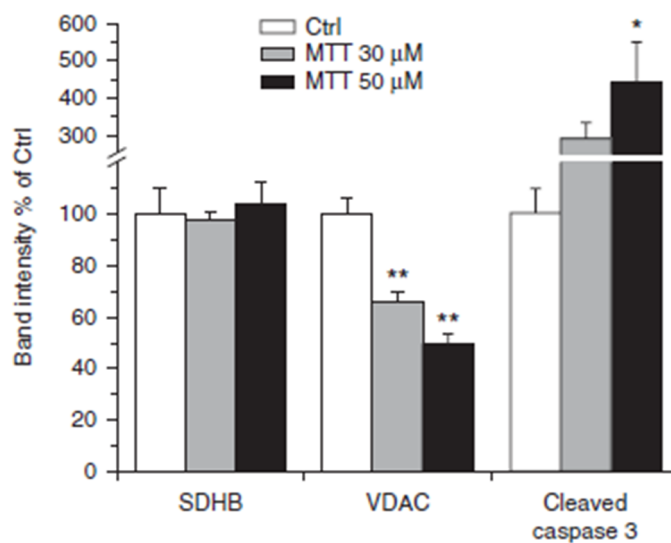


Figura 26: **Effetto del MTT sugli enzimi della catena respiratoria, su proteine strutturali delle membrane mitocondriali e sull'attività della caspasi nelle cellule H295R.** Analisi densitometrica quantitativa dell'espressione dell'SDHB, di VDAC e della caspasi 3 normalizzate ognuno sulla propria actina, come rilevato dall'analisi in Western Blot in almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata condotta con l'ANOVA seguita dal test di Dunnett: * $P < 0.05$ e ** $P < 0.001$ verso i rispettivi controlli.

DISCUSSIONE

Il carcinoma corticosurrenalico (ACC) è una patologia rara caratterizzata da elevata aggressività e da prognosi infausta. Non esistono infatti, ad oggi, opzioni terapeutiche soddisfacenti per il trattamento dei pazienti con tumore allo stadio avanzato a causa della scarsa comprensione delle alterazioni molecolari alla base della tumorigenesi dell'ACC. Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nello studio dei meccanismi di insorgenza e progressione tumorale e nell'individuazione di markers prognostici e predittivi, grazie anche allo sviluppo di nuove tecniche di analisi molecolare e all'organizzazione di consorzi internazionali che hanno permesso di accumulare un più elevato numero di campioni e di dati clinici di alta qualità. Grazie agli studi dei profili di espressione genica (analisi di trascrittomiche) (Giordano TJ et al, 2003 and 2009; Ragazzon B et al, 2010 and 2011; Assiè G et al, 2014), dei miRNA e dei profili di metilazione è stato possibile effettuare un'analisi dettagliata dei trascritti di mRNA e distinguere dei sottogruppi di tumori con differenti markers genetici, differenti pattern di attivazione di vie di segnalazione molecolari e differente andamento clinico. Questi studi hanno evidenziato come la classificazione molecolare dei tumori si stia dimostrando superiore alle comuni tecniche istologiche e ai metodi clinici per la predizione della prognosi, e quindi queste acquisizioni aprono la strada all'utilizzo di nuovi approcci target-specifici. Nonostante questo, in molti sistemi le alterazioni che possono verificarsi a livello di mRNA non necessariamente corrispondono a conseguenti variazioni dei livelli delle proteine codificate (Vogel C and Marcotte EM, 2012); inoltre, i meccanismi regolatori dei processi biologici si basano su specifiche interazioni proteina-proteina, che dipendono dalla loro conformazione e dalle complesse modificazioni co- e post-traduzionali alle quali esse vanno incontro. Analisi di espressione proteica tuttora in uso si basano sulla valutazione in immunohistochimica di proteine già identificate, e, ad eccezione dell'analisi microarray per i tessuti (TMA), che non è stata ancora applicata allo studio degli ACC, lo studio di complessi proteici che potrebbero mediare la progressione tumorale può essere condotto solo con l'utilizzo di un approccio di tipo proteomico. Fino ad ora, sono stati condotti solamente due studi di proteomica nel tumore corticosurrenalico (Kjellin H et al., 2014; Yang MS et al., 2013), nei quali sono state applicate la focalizzazione isoelettrica (IEF) associata con la cromatografia su fase liquida (Kjellin H et al., 2014) e l'elettroforesi bidimensionale (Yang MS et al., 2013). La metodica 2D-DIGE, invece, applicata

ad altri tipi di tumore, come quello al seno, al colon-retto, al polmone e alla prostata, ha permesso di confrontare direttamente campioni tumorali e le rispettive controparti sane per l'identificazione di profili di espressione proteica caratteristici della condizione patologica e di individuare così biomarkers per la diagnosi precoce del tumore; in particolare, questa metodica si è rivelata di grande impatto clinico quando i biomarkers identificati grazie al suo impiego sono risultati differenzialmente espressi anche nel circolo sanguigno (Wulfkuhle JD et al., 2003). Per questi motivi abbiamo deciso di utilizzare l'approccio proteomico per lo studio del profilo di espressione proteica del carcinoma corticosurrenalico, applicando per la prima volta in questo tumore la tecnica 2D-DIGE. Grazie a questo approccio è stato possibile confrontare direttamente campioni tumorali e campioni sani all'interno dello stesso gel, riducendo la variabilità tecnica che avrebbe potuto influenzare le differenze rilevate. Inoltre, l'introduzione di marcatori fluorescenti per identificare i campioni da analizzare ha aumentato in maniera esponenziale la sensibilità di rivelazione; infine, l'uso di uno standard interno costituito da una miscela di uguali quantitativi di tutti i campioni da analizzare ha permesso una quantificazione precisa dell'espressione differenziale delle proteine, indipendentemente dal numero dei gel comparati e dall'appaiamento arbitrario dei campioni sani e tumorali all'interno dello stesso gel. Nel nostro studio abbiamo confrontato il profilo proteico di campioni prelevati da 10 pazienti affetti da ACC con quello di pazienti sani, identificando 22 proteine in 27 spots differenzialmente espressi tra la condizione patologica e quella normale: queste proteine potrebbero rappresentare dei promettenti candidati biomarkers coinvolti nello sviluppo e nella progressione del tumore. Grazie all'utilizzo di un software specifico, è stato possibile classificare i campioni sulla base dei loro profili di espressione, senza assunzioni a priori: questa classificazione si è rivelata in pieno accordo con la diagnosi di ACC basata sull'istopatologia (Fassnacht M and Allolio B, 2009), suggerendo che il profilo proteico potrebbe strettamente riflettere le caratteristiche istologiche del tessuto. In accordo con Kjellin e collaboratori (Kjellin H et al., 2014), che tuttavia hanno limitato la loro analisi alla frazione proteica arricchita in microsomi, l'analisi ontologica delle 22 proteine differenzialmente espresse ha evidenziato variazioni significative a livello di numerose proteine coinvolte nelle vie di segnalazione del metabolismo del glucosio nell'ACC, e questo ha indotto a ipotizzare che anche nei tumori corticosurrenalici si verifichi uno shift dalla respirazione alla glicolisi aerobica. Questo meccanismo di riprogrammazione, conosciuto come "effetto Warburg", è un comune aspetto di cellule appartenenti a diversi tipi tumorali. Queste cellule si affidano ad una glicolisi aerobica meno

efficiente per soddisfare le loro esigenze energetiche, a causa di un difetto nella fosforilazione ossidativa metabolica (Gatemby RA and Gillies RJ, 2007). La generazione di molecole di ATP attraverso il processo di glicolisi potrebbe essere un meccanismo utilizzato per ottenere un miglior rifornimento dell'energia richiesta dalle cellule in rapida proliferazione, rendendole così capaci di generare gli aumentati livelli richiesti di intermedi biosintetici (Tong X et al., 2009). Inoltre, la conseguente produzione di acido lattico in condizioni aerobiche potrebbe contribuire al processo oncogenico attraverso una diminuzione del pH extracellulare, che a sua volta potrebbe portare ad un'aumentata attività di fattori di proinvasività come le metalloproteasi della matrice (Gatemby RA and Vincent TL, 2003). La nostra analisi proteomica ha identificato enzimi che agiscono a livello delle vie metaboliche di produzione dell'energia e che determinano un'elevata e insolita produzione di composti promuoventi il tumore. Queste alterazioni a livello metabolico e mitocondriale nell'ACC offrono un'opportunità per terapie anti-tumorali efficaci e selettive (Pelicano H et al., 2006), che ad oggi sono ancora fortemente limitate per questo tipo di tumore. Per esempio, l'aumentato uso della via dei pentoso fosfati potrebbe essere indotta da una specifica isoforma tumorale della piruvato chinasi (PKM2), che converte il fosfoenolpiruvato a piruvato ed è risultata altamente espressa nell'ACC. Questa isoforma enzimatica, che varia da una forma dimerica meno attiva ad una tetramericata, catalizza lo step finale della glicolisi e permette l'accumulo di fosfometaboliti, fornendo così un'elevato apporto di prodotti alternativi al glucosio (Christofk HR et al., 2008). È stato dimostrato che la regolazione dell'attività della PKM2 è funzione delle differenti necessità metaboliche delle cellule tumorali proliferanti o non proliferanti (Israelsen WJ et al., 2013): la forma inattiva dell'enzima è associata alla popolazione cellulare proliferante all'interno di un tumore, mentre le cellule non-proliferanti richiedono la forma attiva: un'attivazione della PKM2 potrebbe quindi portare ad esaurimento degli intermedi metabolici, determinando una diminuzione del rate proliferativo delle cellule tumorali. L'aldo-keto reduttasi 1, membro B1 (AKR1B1), che indirizza il flusso di glucosio attraverso la via dei polioli, è anch'essa altamente espressa nell'ACC e potrebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione del tumore attraverso la detossificazione carbonilica, la regolazione omeostatica dell'acido retinoico, e il controllo metabolico dei lipidi (El-Kabbani O et al., 2005). Essendo questo un enzima coinvolto nelle complicanze diabetiche, sono già stati sviluppati una serie di inibitori di AKR1B1 per il trattamento dei pazienti diabetici (Zhang L et al., 2013): i dati preclinici e clinici raccolti dai diabetologi potrebbero quindi essere d'aiuto per un impiego di questi inibitori a

livello clinico anche nell'ACC. Una delle proteine più interessanti emerse dall'analisi DIGE è l'ALDH6A1, un membro della famiglia delle aldeidi deidrogenasi. Questi enzimi mostrano un'aumentata attività nelle cellule tumorali incentrata sulla protezione dall'apoptosi indotta dagli alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano nel microambiente tumorale. Nonostante questo, l'isoforma specifica individuata è una semialdeide deidrogenasi metilmalonato mitocondriale che catalizza il catabolismo di valina e pirimidina con produzione di acetil-CoA, fulcro dei networks metabolici. La sua upregolazione è inversamente correlata con la sopravvivenza libera da malattia nel tumore metastatico al colon (Pentheroudakis G et al., 2014). La totale assenza di positività nell'espressione di questo enzima a livello della surrene sana e una sua elevata espressione a livello degli ACC, successivamente confermate dall'analisi in Western Blot e in immunohistochimica, suggeriscono che questa proteina potrebbe rappresentare un valido e specifico biomarker per una futura *target-therapy* dell' ACC. Un'ulteriore correlazione tra l'omeostasi del glucosio, il metabolismo lipidico e l'invasività cellulare nell'ACC è rappresentata dall'espressione della proteina associata all'adenilil-ciclastasi (CAP-1), che è coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro e nell'adesione cellulare grazie al suo ruolo nell'attivazione delle chinasi di adesione focale (FAK) (Zhang H et al., 2013); recentemente, è stato dimostrato anche il ruolo di recettore funzionale per la resistina umana, coinvolto nel processo di infiammazione nell'obesità mediato dalla resistina (Lee S et al., 2014). Infatti, il tessuto adiposo che riveste e infiltra abbondantemente la corteccia surrenalica potrebbe non essere solo uno spettatore passivo nell'ACC, dal momento che è stata dimostrata l'esistenza di una stretta correlazione tra i tumori e il loro microambiente; in particolare, i componenti adipocitari contribuirebbero a sostenere la progressione tumorale principalmente attraverso la modulazione dell'attività metabolica e il rifornimento di energia alle cellule tumorali (Icard P et al., 2014). Inoltre, è stato visto che l'obesità è strettamente implicata con il cancro, e la resistina, che è una specifica citochina infiammatoria prodotta dal tessuto adiposo, potrebbe contribuire a sostenere lo stress ossidativo che regola l'omeostasi metabolica tumorale (Codoner-Franch P and Alonso-Iglesias E, 2014). Nell'ACC, l'espressione di CAP-1 è accompagnata da una concomitante upregolazione della fascina-1, un'altra proteina strutturale che si lega ai filamenti di actina determinando la formazione di stretti fasci paralleli che vanno a costituire i filopodi e gli invadopodi. Nel tumore pancreatico, il microambiente tumorale ipossico sembra promuovere l'invasività e la metastatizzazione inducendo l'overespressione della fascina: questa proteina potrebbe quindi rappresentare

un target terapeutico per bloccare la progressione tumorale (Zhao X et al., 2014). A differenza di uno studio precedente in cui i livelli di espressione degli enzimi della catena respiratoria appaiono diminuiti nel tessuto surrenalico maligno (Kjellin H et al., 2014), la nostra analisi in 2D-DIGE è riuscita ad individuare solamente una proteina downregolata nei campioni tumorali, la tiosolfato sulfurtransferasi (TST); in precedenza, una bassa attività di questo enzima era già stata descritta nel tumore al colon e associata con la progressione tumorale (Ramasamy S et al., 2006). Il nostro studio presenta delle limitazioni, come il ridotto numero di campioni tumorali, che può però essere in parte giustificato dalla rarità del tumore: questo numero esiguo non rende possibile nessun tipo di correlazione con i dati clinici dei pazienti. Inoltre, il ridotto numero di campioni non permette nemmeno una valutazione specifica delle proteine individuate come possibili biomarkers dell'ACC mediante il software dedicato EDA. Con l'utilizzo di questa tecnica, le proteine downregolate negli ACC rispetto alle surreni sane potrebbero essere sottostimate e le differenze a livello delle proteine individuate come differenzialmente espresse rispetto agli studi precedenti (Yang MS et al., 2013; Kjellin H et al., 2014) potrebbero essere dovute alle diverse tecniche utilizzate per la separazione proteica, così come alle differenze tra i campioni tumorali e i corrispondenti controlli (adenomi o surreni sane). Infine, non è stato possibile confrontare i campioni tumorali e quelli sani derivati dallo stesso paziente dal momento che normalmente il tumore invade tutta la corteccia surrenalica, rendendo in tal modo difficoltoso il prelievo di una porzione di tessuto sano; per questo motivo nel nostro studio abbiamo utilizzato surreni sane derivanti da donatori sani come controlli, e questo ha introdotto un ulteriore fattore di variabilità. In conclusione, mediante l'uso di un approccio di 2D-DIGE, applicato per la prima volta per lo screening di espressione proteica nell'ACC, siamo riusciti ad identificare un profilo di overespressione proteica associato agli ACC. Questo profilo specifico è indicativo di una riprogrammazione a livello metabolico dalla respirazione aerobia alla glicolisi aerobia, chiamata anche "effetto Warburg", che si verifica anche nel tumore corticosurrenalico. La scoperta che questi enzimi chiave giocano un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione tumorale apre la strada ad un loro utilizzo come potenziali target per una più efficace terapia dell'ACC (Stratakis CA, 2014). La validazione mediante tecniche di immunistochemica e Western blot di 6 delle proteine differenzialmente espresse contribuisce a rafforzare l'ipotesi di un loro possibile utilizzo come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la prognosi dell'ACC. Per confermare i nostri risultati sono necessari ulteriori studi che includano una casistica più ampia e comprensiva anche degli adenomi benigni: in questo modo

sarà possibile correlare i risultati ottenuti con i dati clinici e attribuire un significato diagnostico e prognostico ai biomarkers individuati.

Se da un lato sono ancora in gran parte sconosciuti i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione del tumore corticosurrenalico, e diventa quindi di fondamentale importanza l'utilizzo di differenti approcci per l'individuazione di nuovi possibili markers biomolecolari che permettano lo sviluppo di nuove terapie più efficaci, dall'altro lato è altrettanto importante uno studio approfondito del meccanismo di azione del mitotane, che ad oggi rimane l'unico farmaco efficace utilizzato per il trattamento dei pazienti con ACC allo stadio avanzato. Nonostante venga utilizzato da lungo tempo, infatti, non se ne conoscono i target intracellulari e molecolari, e uno studio approfondito potrebbe essere di aiuto per la scelta di eventuali molecole da somministrare in combinazione con esso per ridurre le dosi e ottenere degli effetti citotossici maggiori.

Il mitotane è stato usato per lungo tempo come agente chemioterapico di prima linea per il trattamento di pazienti affetti da ACC (Metz SA, 1973). Benché ci siano evidenze sulla capacità di questo farmaco di ridurre l'eccesso di steroidi nelle forme secernenti di ACC e nella sindrome di Cushing, il suo meccanismo di azione e il potenziale effetto tossico nelle cellule tumorali umane rimane ancora da studiare. Nella seconda parte del nostro lavoro abbiamo indagato l'effetto del mitotane sulla linea cellulare H295R, utilizzata come modello di ACC umano, dimostrando che questo farmaco non solo viene attivamente metabolizzato dalle cellule tumorali, ma si accumula anche al loro interno insieme al suo metabolita, DDE. A livello surrenalico, a differenza del fegato dove il MTT viene biotrasformato principalmente ad opera degli enzimi p450 microsomiali (Martz F and Straw JA, 1980), i mitocondri sono gli organelli maggiormente coinvolti nella metabolizzazione del farmaco (Martz F and Straw JA, 1977,1980). Esperimenti in vitro nelle linee cellulari e ex vivo su fettine surrenali (Cai W et al., 1995b; Lund BO and Lund J, 1995; Lindhe O et al., 2002) hanno dimostrato che l'enzima CYP11B1, oltre al ruolo nella produzione di cortisolo, attiva il MTT e i suoi metaboliti attraverso uno step iniziale di idrossilazione: l'espressione selettiva di questo enzima a livello delle zone fascicolata e reticolare della corteccia fornisce una specificità tissutale per l'attivazione del MTT. Un'inibizione selettiva dell'enzima riduce il legame irreversibile del MTT e dei suoi metaboliti alla componente proteica delle cellule e del tessuto surrenalici (Cai W et al., 1995b; Lund BO and Lund J, 1995; Lindhe O et al., 2002). Tuttavia, deve ancora essere stabilita la relazione tra questo legame e l'effetto del MTT. E' però interessante

notare che esiste una stretta correlazione tra la variabilità nell'attività del MTT in specie differenti e il corrispondente grado di trasformazione metabolica; in particolare, le cortecce surrenaliche bovine e canine sembrano essere le più sensibili al metabolismo e agli effetti del MTT se confrontate al tessuto umano normale e tumorale (Cai W et al., 1995a, b). Questa relazione potrebbe spiegare la variabilità nella risposta al MTT osservata in pazienti con tumore surrenale e dipendente dalla capacità della cellula tumorale di metabolizzare e conseguentemente di attivare il farmaco (Schteingart DE, 2007). La maggior parte dei dati presenti in letteratura sugli effetti del MTT sulla corteccia surrenalica riportano un effetto inibitorio di questo composto sulla steroidogenesi; in particolare, il MTT svolge un effetto inibitorio a livello degli enzimi mitocondriali delle vie di segnalazione steroidogenetiche (StAR, CYP11A1 e CYP11B1), ma non di quelli microsomiali, nelle cellule H295 e H295R (Stigliano A et al., 2008; Asp V et al., 2010; Lin CW et al., 2012). Varianti differenti di cellule H295 hanno mostrato differenti gradi di inibizione della secrezione steroidea, correlata ai loro profili steroidogenici (Samandari E et al., 2007). In contrasto con l'effetto inibitorio sulla secrezione steroidea, gli effetti citotossici del MTT responsabili della necrosi surrenale non sono ancora stati chiariti. I nostri dati hanno dimostrato che, all'aumentare della concentrazione del MTT, all'interno del range della finestra terapeutica (14-20 mg/L, corrispondenti a 43,7-62,5 μ M), aumenta la tossicità cellulare nelle H295R, che si esplica con un danneggiamento dell'integrità e delle funzioni mitocondriali. Studi condotti in passato avevano analizzato le alterazioni mitocondriali a livello qualitativo nelle surreni di animali trattati con MTT (Kaminsky N et al., 1962; Moore RN et al., 1980; Kruger R et al., 1984) e in una linea cellulare di ACC umano estrogeno-secerne; tuttavia questi effetti erano stati osservati solamente a dosi elevate (168 μ M), mentre alla dose di 80 μ M il MTT non sembrava avere effetti sulle strutture mitocondriali o sulla secrezione steroidea (Fang VS, 1979). E' stato ipotizzato che bassi livelli intracellulari di MTT o la durata limitata dei trattamenti interferissero principalmente con l'attività enzimatica steroidogenica mitocondriale, con lievi effetti sulla vitalità cellulare (Stigliano A et al., 2008; Lin CW et al., 2012). Al contrario, come abbiamo dimostrato in questo lavoro, alte dosi di MTT o trattamenti di lunga durata hanno un effetto tossico a livello mitocondriale che determina la morte cellulare, oltre a causare una riduzione della secrezione degli ormoni steroidei (Fang VS, 1979). I nostri dati hanno mostrato che i livelli di MTT all'interno della finestra terapeutica (30-50 μ M) hanno un effetto citotossico associato ad un'inibizione della proliferazione cellulare. Dosi crescenti del farmaco alterano la normale

morfologia dei mitocondri nelle H295R, a partire da 24h di incubazione; con il prolungarsi dell'esposizione al farmaco fino a dieci giorni, gli effetti diventano evidenti anche alle dosi più basse (10 μ M). L'IC50 del MTT, calcolato per la vitalità cellulare, ha mostrato una sostanziale sovrapposizione tra gli esperimenti di MTS e conta cellulare (con un range tra 10 e 20 μ M), e questo indica che il MTT esercita il suo effetto citotossico sull'ACC all'interno della finestra terapeutica di 14-20 mg/L. La microscopia elettronica ha mostrato come dosi crescenti del farmaco inducano una progressiva riduzione nel numero dei normali mitocondri ellissoidali, con un conseguente rigonfiamento e arrotondamento dell'organello, accompagnato da una diminuzione della densità della matrice interna, dalla perdita delle creste respiratorie e dal distacco delle membrane mitocondriali interne ed esterne. Ad alte dosi e a tempi prolungati di esposizione, la maggior parte delle cellule muoiono, probabilmente a causa di un danno metabolico irreversibile: si manifestano infatti le caratteristiche tipiche del fenomeno apoptotico, come la formazione di corpi nucleari ipercromatici, in concomitanza con un danno a livello citoplasmatico, tipico della necrosi. Questo fenomeno, già conosciuto come "aponecrosi", si verifica perchè il processo apoptotico che avviene inizialmente nelle cellule non è in grado di arrivare a termine a causa della deprivazione di energia, e la morte cellulare viene perciò portata a termine con il processo di necrosi (Formigli L et al., 2002). Per quantificare il danno subito dal mitocondrio, abbiamo preso in considerazione sia il rigonfiamento che la perdita delle creste interne e abbiamo calcolato il rapporto tra l'area mitocondriale e la lunghezza totale delle creste nei singoli mitocondri delle cellule analizzate: dal momento che questo parametro è strettamente correlato agli aspetti morfologici più rappresentativi della funzionalità del mitocondrio, come il numero delle creste e la densità della matrice interna, ci ha permesso di ottenere informazioni più dettagliate rispetto ad altri criteri utilizzati in altri studi, come la percentuale della sezione mitocondriale visibile che mostra cisterne intatte (Cadwell K et al., 2008). Gli effetti del MTT sono evidenti in entrambe le linee cellulari, mentre nelle cellule non tumorali abbiamo notato una leggera ma non significativa inibizione della vitalità solamente in seguito a esposizione prolungata e ad alte dosi. Questi risultati suggeriscono che il MTT è un farmaco specifico per il tumore surrenalico, e questo potrebbe giustificare il fatto che gli effetti collaterali, seppur in maniera variabile, sono limitati all'assorbimento gastrico e alla neurotossicità. Il fenomeno apoptotico osservato in microscopia elettronica è stato confermato anche in citofluorimetria, e in particolare abbiamo osservato come il MTT induca eventi apoptotici sia precoci (esposizione dell'annessina V

sulla membrana plasmatica) che tardivi (attivazione delle caspasi 3/7). I nostri dati sulla capacità del mitotane di indurre apoptosi nelle H295R sono stati confermati da uno studio parallelo (Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells (Hescot S et al., 2013). Alle alterazioni indotte dal MTT nella morfologia mitocondriale, corrisponde un danno funzionale, come dimostrato dalla progressiva depolarizzazione del potenziale di membrana, che porta ad un'alterazione dei meccanismi di respirazione e quindi di produzione di energia. Allo scopo di valutare gli effetti del MTT sulla respirazione evitando l'effetto tossico sull'organello, abbiamo misurato il consumo di ossigeno in mitocondri vivi isolati dalle cellule, e successivamente lo abbiamo normalizzato sul numero dei mitocondri. Nelle cellule trattate abbiamo osservato una netta riduzione del consumo di ossigeno nella frazione arricchita di mitocondri (circa l'80% di inibizione alla dose di 50 μ M), che sembra principalmente dovuta alla presenza di un danno a livello della membrana mitocondriale esterna (come dimostrato dalla riduzione significativa nell'espressione della proteina VDAC) piuttosto che ad uno specifico squilibrio dei complessi della catena respiratoria (i livelli di SDH osservati sono risultati stabili). In studi precedenti è stato dimostrato che il MTT downregola l'espressione di proteine coinvolte nel potenziale redox della cellula, nel *trafficking* del colesterolo, nella risposta allo stress e nel mantenimento dell'integrità mitocondriale (Stigliano A et al., 2008). La diminuzione nell'espressione di VDAC-1 che si verifica in seguito al trattamento con MTT non può rappresentare solo una conseguenza passiva dell'alterazione delle ultrastrutture del mitocondrio e dell'aumentata permeabilità della membrana esterna; piuttosto, VDAC-1, un canale anionico voltaggio-dipendente della membrana esterna, coinvolto nella regolazione delle funzioni metaboliche ed energetiche del mitocondrio, sembra svolgere un ruolo chiave nella morte cellulare programmata mediata dai mitocondri e nell'apoptosi, come recentemente descritto da Zaid e collaboratori (Zaid H et al., 2005). I tumori overesprimono largamente VDAC, promuovendo l'interazione esochinasica e la stimolazione della glicolisi nelle cellule tumorali (Mathupala SP and Pedersen PL, 2010). La downregolazione dell'espressione di VDAC-1 inibisce la crescita cellulare tumorale sia *in vitro* che in modelli animali (Koren I et al., 2010): questa proteina potrebbe quindi rappresentare un nuovo potenziale target anti-tumorale (Mathupala SP and Pedersen PL, 2010). VDAC-1 inoltre stabilizza la proteina StAR sulla membrana mitocondriale esterna, rendendo possibile il trasporto di colesterolo verso la membrana interna, in modo che possa essere convertito a pregnenolone (Bose M et al., 2008). In tal modo, la riduzione dell'espressione di

VDAC-1 potrebbe contribuire al blocco nella steroidogenesi osservato nelle cellule tumorali surrenali e nei pazienti con ACC trattati con MTT. In conclusione, i nostri risultati contribuiscono a comprendere meglio i meccanismi intracellulari dell'azione del MTT. Abbiamo infatti dimostrato che il farmaco agisce a livello dei mitocondri nelle cellule di ACC e quantificato il danno mitocondriale causato dal MTT alle dosi terapeutiche. Abbiamo inoltre dimostrato che l'effetto citotossico del MTT induce l'attivazione del fenomeno apoptotico. Rimane da chiarire se il MTT svolga un simile effetto anche a livello della corrispondente corteccia surrenalica sana nei pazienti trattati.

In conclusione, mediante la tecnica 2D-DIGE abbiamo individuato la presenza di un pattern proteico overespresso, specifico dell'ACC, e, all'interno di esso, abbiamo osservato il coinvolgimento di numerosi enzimi mitocondriali, che potrebbero rappresentare dei validi biomarcatori per la diagnosi dell'ACC. Con i dati di questo lavoro di tesi abbiamo quindi evidenziato che il mitocondrio rappresenta uno dei candidati più promettenti per lo sviluppo di nuove terapie target-specifiche, dal momento che anche il mitotane ha dimostrato di svolgere il suo effetto citotossico a livello di questo organello.

BIBLIOGRAFIA

- Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X and Bertherat J. *Bioclinical features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors from a series of 202 consecutive patients*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006;91:2650–2655.
- Abraham J, Bakke S, Rutt A, Meadows B, Merino M, Alexander R, Schrupp D, Bartlett D, Choyke P, Robey R, Hung E, Steinberg SM, Bates S, Fojo T. *A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma: continuous infusion doxorubicin, vincristine, and etoposide with daily mitotane as a P-glycoprotein antagonist*. *Cancer*, 2002;94(9):2333–43.
- Adam P, Hahner S, Hartmann M, Heinrich B, Quinkler M, Willenberg HS, Saeger W, Sbiha S, Schmulis S, Voelker HU, Ströbel P, Allolio B and Fassnacht M. *Epidermal growth factor receptor in adrenocortical tumors: analysis of gene sequence, protein expression and correlation with clinical outcome*. *Modern Pathology*, 2010;23:1596–1604.
- Addison T. *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule*, in *A Collection of the Published Writings of the Late Thomas Addison MD*, New Sydenham Society, London, UK, 1868.
- Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardía L, Sánchez L, Casal I. *Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis*. *Proteomics*, 2005;5(10):2602–11.
- Allolio B, Fassnacht M. *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006;91:2027–2037.
- Allolio B, Hahner S, Weismann D and Fassnacht M. *Management of adrenocortical carcinoma*. *Clinical Endocrinology*, 2004;60:273–287.
- Almeida MQ and Stratakis CA. *How does cAMP/Protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues?* *Mol Cell Endocrinol*, 2011;336(1–2):162–8.
- Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonça BB, Latronico AC. *Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2008; 93 (9):3524–3531.
- Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, Ressio RA, Nishi MY, Jorge AA, Lerario AM, Alves VA, Mendonça BB, Latronico AC. *Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2010;95: 1458–1462.
- Arab K, Smith LT, Gast A, Weichenhan D, Huang J, Claus R, Hielscher T, Espinosa AV, Ringel MD, Morrison CD, Schadendorf D, Kumar R, Plass C. *Epigenetic deregulation of TCF21 inhibits metastasis suppressor KISS1 in metastatic melanoma*. *Carcinogenesis*, 2011;32(10):1467–73.
- Arnaldi G, Freddi S, Mancini T, Kola B & Mantero F. *Transforming growth factor beta1: implications in adrenocortical tumorigenesis*. *Endocrine Research*, 2000; 26: 905–910.
- Arola J, Liu J, Heikkilä P, Ilvesmäki V, Salmenkivi K, Voutilainen R, Kahri AI. *Expression of inhibin alpha in adrenocortical tumours reflects the hormonal status of the neoplasm*. *J Endocrinol*, 2000;165:223–229.

- Arola J, Liu J, Heikkilä P, Voutilainen R, Kahri A. *Expression of inhibin alpha in the human adrenal gland and adrenocortical tumors*. *Endocr Res*, 1998;24:865–867.
- Arola J, Salmenkivi K, Liu J, Kahri AI, Heikkilä P. *p53 and Ki67 in adrenocortical tumors*. *Endocr Res*, 2000;26:861–865.
- Asp V, Ullerås E, Lindström V, Bergström U, Oskarsson A, Brandt I. *Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010;242(3):281–9.
- Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papatomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libé R, de Reyniès A, Bertherat J. *Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma*. *Nat. Genet*, 2014;46:607–12.
- Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leteurtre E. *Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors*. *Am J Surg Pathol*, 2002;26:1612–1619.
- Ayala-Ramirez M, Jasim S, Feng L, Ejaz S, Deniz F, Busaidy N, Waguespack SG, Naing A, Sircar K, Wood CG, Pagliaro L, Jimenez C, Vassilopoulou-Sellin R, Habra MA. *Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center*. *Eur J Endocrinol*, 2013;169(6):891–9.
- Balasubramaniam S and Fojo T. *Practical considerations in the evaluation and management of adrenocortical cancer*. *Semin. Oncol*, 2010;37, 619–626.
- Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ. *Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms*. *BMC Endocr Disord*, 2004;4(1):3.
- Barlaskar FM and Hammer GD. *The molecular genetics of adrenocortical carcinoma*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007;8(4):343–8.
- Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, Giordano TJ, Ben-Josef E, Hammer GD. *Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94(1):204–12.
- Barreau O, Assié G, Wilmot-Roussel H, Ragazzon B, Baudry C, Perlemoine K, René-Corail F, Bertagna X, Dousset B, Hamzaoui N, Tissier F, de Reyniès A, Bertherat J. *Identification of a CpG Island Methylator Phenotype in Adrenocortical Carcinomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013;98:E174–E184.
- Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palù G, Boscaro M. *Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors*. *Eur J Endocrinol*, 2001;145:207–212.
- Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, Schlumberger M. *Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'-DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma*. *Cancer*, 2001; 92(6):1385–92.
- Bekaert S, Derradji H, Baatout S. *Telomere biology in mammalian germ cells and during development*. *Dev. Biol*, 2004;274(1):15–30.
- Bergenstal DM, Hertz R, Lipsett MB, Moy RH. *Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-DDD*. *Ann Intern Med*, 1960;53(4):672–682.

- Bergers G and Hanahan D. *Modes of resistance to antiangiogenic therapy*. Nat Rev Cancer, 2008;8(8):592-603.
- Berland LL, Silverman SG, Gore RM, Mayo-Smith WW, Megibow AJ, Yee J, Brink JA, Baker ME, Federle MP, Foley WD, Francis IR, Herts BR, Israel GM, Krinsky G, Platt JF, Shuman WP, Taylor AJ. *Managing incidental findings on abdominal CT: white paper of the ACR incidental findings committee*. J Am Coll Radiol, 2010;7:754-773.
- Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iacconi P, Miccoli P and Salvetti A. *Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002;87:4961-4965.
- 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;166(3):451-8.
- Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L. *Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma*. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. Cancer, 1998;83(10):2194-200.
- Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L. *Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial*. Endocr Relat Cancer, 2005;12(3):657-66.
- Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. *Molecular and functional analysis of PRKAR1a and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase a expression and activity*. Cancer Research, 2003;63:5308-5319.
- Bertherat J. *Protein kinase A in carney complex: a new example of cAMP pathway alteration in endocrine tumors*. European Journal of Endocrinology, 2001;144: 209-211.
- Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau 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*. Human Molecular Genetics 2010;19:1561-1576.
- Betz MJ, Shapiro I, Fassnacht M, Hahner S, Reincke M, Beuschlein F. German and Austrian Adrenal Network. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation*. J Clin Endocrinol Metab, 2005;90(7):3886-96.
- Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP, Allolio B. *Clonal composition of human adrenocortical neoplasms*. Cancer Res, 1994; 54: 4927-32.
- Beuschlein F, Looyenga BD, Reincke M, Hammer GD. *Role of the inhibin/activin system and luteinizing hormone in adrenocortical tumorigenesis*. Horm. Metab. Res, 2004;36, 392-396.
- Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, Bentrem DJ, Winchester DJ, Kebebew E, Sturgeon C. *Adrenocortical carcinoma in the United States: Treatment utilization and prognostic factors*. Cancer, 2008;113:3130-3136.
- Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintonio M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser DF, Tosi P. *Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue*. Electrophoresis, 1997; 18:2832-2841.

- Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D, et al. *Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families*. *Cancer Res*, 1994;54(5):1298-304.
- Blaker H, Sutter C, Kadmon M, Otto HF, Von Knebel-Doerberitz M, Gebert J and Helmke BM. *Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumors of patients with familial adenomatous polyposis coli*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2004;41: 93-98.
- Blanquicett C, Roman J, Hart CM. *Thiazolidinediones as anti-cancer agents*. *Cancer Ther*, 2008;6(A):25-34.
- Boccuzzi A, Terzolo M, Cappia S, De Giuli P, De Risi C, Leonardo E, Bovio S, Borriero M, Paccotti P and Angeli A. *Different immunohistochemical patterns of TGFbeta1 expression in benign and malignant adrenocortical tumors*. *Clinical Endocrinology*, 1999;50:801-808.
- Bose M, Whittall RM, Miller WL, Bose HS. *Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008;283:8837-8845.
- Bossis I and Stratakis CA. *Minireview: Prkar1a: normal and abnormal functions*. *Endocrinology*, 2004;145:5452-5458.
- Boulle N, Gicquel C, Logie A, Christol R, Feige JJ and Le Bouc Y. *Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (pro-IGFII) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R*. *Endocrinology*, 2000; 141:3127-3136.
- Boulle N, Logie 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*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998;83: 1713-1720.
- Bourcigaux N, Gaston V, Logie A, Bertagna X, Le Bouc Y, Gicquel C. *High expression of cyclin e and g1 cdk and loss of function of p57kip2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2000; 85: 322-30.
- Brennan MF. *Adrenocortical carcinoma*. *CA Cancer J Clin*, 1987;37:348-365.
- Brix D, Allolio B, Fenske W, Agha A, Dralle H, Jurowich C, Langer P, Mussack T, Nies C, Riedmiller H, Spahn M, Weismann D, Hahner S, Fassnacht M. *German Adrenocortical Carcinoma Registry Group. Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients*. *Curr Opin Oncol*, 2010;58(4):609-15.
- Brosh R and Rotter V. *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. *Nature Reviews Cancer*, 2009;9: 701-713.
- Brown FM, Gaffey TA, Wold LE, Lloyd RV. *Myxoid neoplasms of the adrenal cortex: a rare histologic variant*. *Am J Surg Pathol*, 2000;24:396-401.
- Burgess JR, Harle RA, Tucker P, Parameswaran V, Davies P, Greenaway TM, Shepherd JJ. *Adrenal lesions in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1*. *Arch Surg*, 1996;131(7):699-702.
- Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Lévy L, Lamers WH, Kitajewski J, Kahn A, Perret C. *New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism*. *Oncogene*, 2002;21, 8293-8301.

- Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S et al. *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells.* Nature, 2008; 456:259–263.
- Cai W, Benitez R, Counsell RE, Djanegara T, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Wotring LL. *Bovine adrenal cortex transformations of mitotane [1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane; o,p'-DDD] and its p,p'- and m,p'-isomers.* Biochemical Pharmacology, 1995a; 49:1483-1489.
- Cai W, Counsell RE, Djanegara T, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Wotring LL. *Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates.* J Pharm Sci, 1995b; 84:134-138.
- Cai W, Counsell RE, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Vaz ADN, Wotring LL. *Adrenal proteins bound by a reactive intermediate of mitotane.* Cancer Chemother Pharmacol, 1997;39(6):537-40.
- Cantini G, Lombardi A, Piscitelli E, Poli G, Ceni E, Marchiani S, Ercolino T, Galli A, Serio M, Mannelli M, Luconi M. *Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-1R intracellular signaling.* PPAR Res, 2008:904041.
- Carden CP, Frentzas S, Langham M, Casamayor I, Stephens AW, Poondru S, Wheaton J, Lippman SM, Kaye SB, Kim ES, Anderson MD. *Preliminary activity in adrenocortical tumor (ACC) in phase I dose escalation study of intermittent oral dosing of OSI-906, a small-molecule insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors*[abstract]. J Clin Oncol, 2009.
- Celis J, Celis P, Ostergaard M, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Rasmussen HH, Orntoft TF, Hein B, Wolf H, Celis A. *Proteomics and immunohistochemistry define some of the steps involved in the squamous differentiation of the bladder transitional epithelium: a novel strategy for identifying metaplastic lesions.* Cancer Res, 1999; 59:3003-3009.
- Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Masuelli L, Marchese R, Misiti S, De Venanzi A, Poggi M, Toscano V, Stigliano A. *Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells.* Exp Cell Res, 2011;317(10):1397-410.
- Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, De Paula U, Marchese R, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. *Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation.* Int. J. Oncol. 2010;37:493–501.
- Cha JY, Jung JE, Lee KH, Briaud I, Tenzin F, Jung HK, Pyon Y, Lee D, Chung JU, Lee JH, Oh SW, Jung KY, Pai JK, Emami K. *Anti-Tumor Activity of Novel Small Molecule Wnt Signaling Inhibitor, CWP232291, In Multiple Myeloma.* In 52nd American Society for Hematology Annual Meeting, 2010 [Abstract].
- Chabre O, Libe R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. *Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients.* Endocrine-Related Cancer, 2013;20:579–594.
- Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D. *Mitochondrial subversion in cancer.* Cancer Prevention Research, 2011; 4(5):638-654.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM, Kardias SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. *Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors.* Clin Cancer Res, 2002;8:2298-2305.
- Chen Y, Cairns R, Papandreou I, Koong A, Denko NC. *Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect.* PLoS One, 2009; 4(9), Article ID e7033.

- Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. *Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2007;104(46):18205-10.
- Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichey F, Abel A, Hua D, Ligot L, Dondon MG, Bressac-de Paillerets B, Frébourg T, Lemerle J, Bonaiti-Pellié C, Feunteun J. *P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals*. Br J Cancer, 2000;82:1932-1937.
- Chortis V, Taylor AE, Schneider P, Tomlinson JW, Hughes BA, O'Neil DM, Libé R, Allolio B, Bertagna X, Bertherat J, Beuschlein F, Fassnacht M, Karavitaki N, Mannelli M, Mantero F, Opocher G, Porfiri E, Quinkler M, Sherlock M, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CH, Stewart PM, Hahner S, Arlt W. *Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5 α -reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement*. J Clin Endocrinol Metab, 2013;98:161-171.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008;452:230-3.
- Cibas ES, Medeiros LJ, Weinberg DS, Gelb AB, Weiss LM. *Cellular DNA profiles of benign and malignant adrenocortical tumors*. Am J Surg Pathol, 1990;14:948-955.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. *MIR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005;102 (39):13944-13949.
- Cobb WS, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. *Laparoscopic adrenalectomy for malignancy*. Am J Surg, 2005;189(4):405-11.
- Codoñer-Franch P and Alonso-Iglesias E. *Resistin: Insulin resistance to malignancy*. Clin. Chim. Acta, 2014; 438C:46- 54.
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. Science, 2007;315(5820):1850-3.
- Cohn K, Gottesman L, Brennan M. *Adrenocortical carcinoma*. Surgery, 1986;100:1170-1177.
- Coli A, Di Giorgio A, Castri F, Destito C, Marin AW, Bigotti G. *Sarcomatoid carcinoma of the adrenal gland: a case report and review of literature*. Pathol Res Pract, 2010;206:59-65.
- Conrad DH, Goyette J, Thomas PS. *Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening*. J Gen Intern Med, 2008;23 Suppl 1:78-84.
- Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. *Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1*. Mol. Cell Biol, 1998;18:2949-2956.
- Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. *Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice*. Development, 2004;131, 4095-4105.
- Czech B, Hannon GJ. *Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes*. Nat. Rev. Genet., 2011;12 (1):19-31.
- Dackiw AP, Lee JE, Gagel RF, Evans DB. *Adrenal cortical carcinoma*. World J Surg, 2001; 25:914-26.

- Das PM and Singal R. *DNA methylation and cancer*. J. Clin. Oncol., 2004; 22 (22):4632–4642.
- de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ. *Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005; 90:1819-1829.
- de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM and Feige JJ. *Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet- sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypical alterations*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2000; 85:4734–4741.
- de Reyniès A, Assié G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-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;27(7):1108-1115.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization. *Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. IARC, Lyon, 2004.
- Demeure MJ, Bussey KJ, Kirschner LS. *Targeted therapies for adrenocortical carcinoma: IGF and beyond*. Horm Cancer, 2011;2(6):385-92.
- Doghman M, Cazareth J, Douguet D, Madoux F, Hodder P, Lalli E. *Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor-1 inverse agonists*. J Clin Endocrinol Metab, 2009;94(6):2178-83.
- 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;93(8):3222-5.
- Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-DelValle MH, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E. *Regulation of insulin like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors*. Canc. Res., 2010; 70 (11), 4666–4675.
- Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, Virolle V, Barbry P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Heckert LL, Lalli E. *Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer*. Molecular Endocrinology, 2007;21:2968–2987.
- Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. *Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications*. Genes Chromosomes Cancer, 2000;28:145–152.
- Duregon E, Volante M, Giorcelli J, Terzolo M, Lalli E, Papotti M. *Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates*. Hum Pathol, 2013;44:822–828.
- El Wakil A and Lalli E. *The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011;332, 32–37.
- El-Kabbani O, Carbone V, Darmanin C, Oka M, Mitschler A, Podjarny A, Schulze-Briese C, Chung RP. *Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor fidarestat: implications for inhibitor binding and selectivity*. J. Med. Chem., 2005;48:5536-42.
- Erlanson RA, Reuter VE. *Oncocytic adrenal cortical adenoma*. Ultrastruct Pathol, 1991;15:539–547.
- Esteller M. *Epigenetics in cancer*. New England Journal of Medicine, 2008;358:1148–1159.

- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. *Extracellular microRNA: a new source of biomarkers*. Mutation Research, 2011;717:85–90.
- Fang VS. *Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture*. Cancer Research, 1979; 39:139–145.
- Fassnacht M and Allolio B. *Adrenocortical carcinoma: clinical update*. J Clin Endocrinol Metab, 2006;91(6):2027-37.
- Fassnacht M and Allolio B. *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009;23:273-289.
- Fassnacht M, Libé R, Kroiss M, Allolio B. *Adrenocortical carcinoma: a clinician's update*. Nat. Rev. Endocrinol, 2011;7, 323–335.
- Fassnacht M, Allolio B. *Epidemiology of adrenocortical carcinoma*. In: Hammer G, Else T, eds. Adrenocortical Carcinoma. 1st ed. New York, NY:Springer;2010:23-29.
- Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B. German Adrenocortical Carcinoma Registry Group; European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a revised TNM Classification*. Cancer, 2009;115:243-250.
- Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Scheingart DE, Arlt W, Kroiss M, Lebouilleux S, Sperone P, Sundin A, Hermsen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller HH, Skogseid B; FIRM-ACT Study Group. *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med, 2012;366(23):2189-97.
- Feige JJ, Cochet C, Savona C, Shi DL, Keramidas M, Defaye G and Chambaz EM. *Transforming growth factor beta 1: an autocrine regulator of adrenocortical steroidogenesis*. Endocrine Research 1991; 17:267–279.
- Feige JJ, Vilgrain I, Brand C, Bailly S and Souchelnitskiy S. *Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors*. Journal of Endocrinology 1998;158:7–19.
- Ferracin M, Veronese A, Negrini M. *Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis*. Expert Rev. Mol. Diagn. 2010; 10(3): 297–308.
- Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, Grappone C, Milani S, Galli A, Fiorelli G, Serio M, Mannelli M. *Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R*. J Clin Endocrinol Metab, 2005; 90(3):1332-9.
- Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR. *Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005;90:615–619.
- 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 tumors associated with the germline TP53 R337H mutation*. J Med Genet 2006; 43:91-96.
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007; 109(9):3812-3819.

- Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B. *Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation.* Differentiation 2000;66, 49-59.
- Folkman J. *The role of angiogenesis in tumor growth.* Semin Cancer Biol, 1992;3(2):65-71.
- Fonseca AL, Kugelberg J, Starker LF, Scholl U, Choi M, Hellman P, Akerström G, Westin G, Lifton RP, Björklund P, Carling T. *Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors.* Genes Chromosomes Can, 2012;51 (10):949-960.
- Formigli L, Zecchi Orlandini S, Capaccioli S, Poupon MF, Bani D. *Energy-dependent types of cell death in MCF-7 breast cancer cell tumors implanted into nude mice.* Cells, Tissues, Organs, 2002; 170:99-110.
- Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzuco TL, Mariani BM, Brito LP, Goncalves TC, Alencar GA, Lima Lde O, Faria AM, Bourdeau I, Lucon AM, Freire DS, Latronico AC, Mendonca BB, Lacroix A, Lerario AM. *Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients.* Eur. J. Endocrinol. 2012;166(1):61-67.
- Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni J Jr, Li FP, Friend SH. *Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome.* Am J Hum Genet, 1995;56:608-615.
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. *Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts.* Nature Protocols, 2007; 2:287-295.
- Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkilä P, Janne J, Voutilainen R. *Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 2002;87 (3):1170-1176.
- Garber K. *Drugging the Wnt pathway: problems and progress.* J Natl Cancer Inst, 2009;101(8):548-50.
- Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S, Hofmann F. *In vivo antitumor activity of NVP-AEW541- A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase.* Cancer Cell, 2004;5(3):231-9.
- Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S, Tavtigian SV, Hainaut P, Achatz MI. *Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect.* Hum Mutat, 2010;31:143-150.
- Gatenby RA, Gillies RJ. *Glycolysis in cancer: a potential target for therapy.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007;39:1358-66.
- Gatenby RA, Vincent TL. *An evolutionary model of carcinogenesis.* Cancer Res, 2003;63:6212-20.
- Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libé R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. *Wnt/betacatenin 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.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008;93:4135-4140.
- Gaujoux SGS, 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; 17:9-9.

- Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV. *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. *Cancer Res*, 1990;50(17):5488-96.
- Germano A, Rapa I, Volante M, Lo Buono N, Carturan S, Berruti A, Terzolo M, Papotti M. *Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014;382:1-7.
- Gharbi S, Gaffney P, Yang A, Zvelebil MJ, Cramer R, Waterfield MD, Timms JF. *Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system*. *Mol Cell Proteomics*, 2002;1(2):91-8.
- Ghorab Z, Jorda M, Ganjei P, Nadji M. *Melan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003;11:330-333.
- Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y. *Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors*. *Cancer Research*, 2001;61:6762-6767.
- 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;78:1444-1453.
- Gicquel C, Bertherat J, Le Bouc Y, Bertagna X. *Pathogenesis of adrenocortical incidentalomas and genetic syndromes associated with adrenocortical neoplasms*. In *Endocrine Incidentalomas*. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 2000; 29:1-13.
- Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y. *Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas*. *Clin. Endocrinol.*, 1994; 40: 465-77.
- Gicquel C, Raffin-Sanson M, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP, Le Bouc Y. *Structural and functional abnormalities at 11 p 15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors. Study on a series of 82 tumors*. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997; 82:2559-65.
- Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G. *Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling*. *Clin Cancer Res*, 2009; 15(2):668-676.
- Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM. *Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis*. *American Journal of Pathology*, 2003;162(2):521-531.
- Gonzalez RJ, Shapiro S, Sarlis N, Vassilopoulou-Sellin R, Perrier ND, Evans DB, Lee JE. *Laparoscopic resection of adrenal cortical carcinoma: a cautionary note*. *Surgery*, 2005;138(6):1078-85.
- Görq A, Weiss W, Dunn MJ. *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. *Proteomics*, 2004;4(12):3665-85.
- Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. *Mitochondrial DNA and disease*. *The Journal of Pathology*, 2012;226(2):274-286.
- Groussin L, Bertherat J, Gicquel C, Le Bouc Y, Bertagna X. *Insights into the molecular biology of adrenocortical tumors*. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 2007; 115: 175-178.

- 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;138:424-429.
- Gummow BM, Scheys JO, Cancelli VR, Hammer GD. *Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex*. Mol. Endocrinol., 2006;20:2711-2723.
- Gummow BM, Winnay JN, Hammer GD. *Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin alpha gene*. J Biol. Chem, 2003;278(29):26572-9.
- Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, Krans HM. *Br. J. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients*. Cancer 69 (5) (1994) 947.
- Habermann JK, Bader FG, Franke C, Zimmermann K, Gemoll T, Fritzsche B, Ried T, Auer G, Bruch HP, Roblick UJ. *From the genome to the proteome-biomarkers in colorectal cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2008;393(1):93-104.
- Half E, Bercovich D, Rozen P. *Familial adenomatous polyposis*. Orphanet J Rare Dis, 2009;4,22.
- Haluska P, Worden F, Olmos D, Yin D, Schteingart D, Batzel GN, Paccagnella ML, de Bono JS, Gualberto A, Hammer GD. *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010;65(4):765-73.
- Hanash SM. *Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status*. Electrophoresis, 2000; 21:1202-1209.
- Hamrahian AH, Ioachimescu AG, Remer EM, Motta-Ramirez G, Bogabathina H, Levin HS, Reddy S, Gill IS, Siperstein A, Bravo EL. *Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (Hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas: Cleveland Clinic experience*. J Clin Endocrinol Metab, 2005;90:871-877.
- Harari A, Inabnet III WB. *Malignant pheochromocytoma: a review*. Am. J. Surg., 2011;201:700-708.
- Hepner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, Spiegel AM and Marx SJ. *MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999;84 :216-219.
- Herbet M, Feige JJ, Thomas M. *Insights into the role of genetic alterations in adrenocortical tumorigenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2009;300(1-2):169-74.
- Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Leboulleux S, Daffara F, Berruri A, Chadarevian R, Schlumberger M, Allolio B, Haak HR, Baudin E. *Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011;96:1844-1851.
- Hescot S, Slama A, Lombès A, Paci A, Remy H, Leboulleux S, Chadarevian R, Trabado S, Amazit L, Young J, Baudin E, Lombès M. *Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells*. Endocr Relat Cancer, 2013;20(3):371-381.
- Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. *Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome*. Journal of the National Cancer Institute, 1998;90: 606-611.

- Hoang MP, Ayala AG, Albores-Saavedra J. *Oncocytic adrenocortical carcinoma: a morphologic, immunohistochemical and ultrastructural study of four cases*. *Mod Pathol.*, 2002;15:973–978.
- Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. *Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter?* *Cancer Research*, 2001;61:8601–8610.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. *Science* 1991;253:49–53.
- Hotta M and Baird A. *Differential effects of transforming growth factor type beta on the growth and function of adrenocortical cells in vitro*. *PNAS* 1986; 83: 7795–7799.
- Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. *Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data*. *Am J Clin Pathol.*, 1979;72:390–399.
- Hsieh MS, Chen JH, Lin LW. *Myxoid adrenal cortical carcinoma presenting as primary hyperaldosteronism: case report and review of the literature*. *Int J Surg Pathol.* 2011;19:803–807.
- Huang F, Greer A, Hurlburt W, Han X, Hafezi R, Wittenberg GM, Reeves K, Chen J, Robinson D, Li A, Lee FY, Gottardis MM, Clark E, Helman L, Attar RM, Dongre A, Carboni JM. *The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors*. *Cancer Research*, 2009;69:161–170.
- Huang Y, Dai Z, Barbacioru C, Sadée W. *Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance*. *Cancer Research*, 2005; 65(16):7446–7454.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004;350(23):2335–42.
- Hutter Jr AM, Kayhoe DE. *Adrenal cortical carcinoma. Clinical features of 138 patients*. *Am J Med*, 1966;41(4):572–80.
- Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C. *Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group*. *World J Surg*, 2001;25(7):891–7.
- Icard P, Kafara P, Steyaert JM, Schwartz L, Lincet H. *The metabolic cooperation between cells in solid cancer tumors*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014;1846:216–25.
- Ilvesmaki V, Jaattela M, Saksela E and Voutilainen R. *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin-like growth factor II gene expression in human fetal adrenal cell cultures*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1993b; 91: 59–65.
- Iorio MV and Croce CM. *MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact*. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(34):5848–5856.
- Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM, Fiske BP, Hosios AM, Bellinger G, Li J, Yu Y, Sasaki M, Horner JW, Burga LN, Xie J, Jurczak MJ, DePinho RA, Clish CB, Jacks T, Kibbey RG, Wulf GM, Di Vizio D, Mills GB, Cantley LC, Vander Heiden MG. *PMK2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells*. *Cell*, 2013; 155(2):397–409.
- Ito M, Yu R, Jameson JL. *DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita*. *Mol. Cell Biol.* 1997;17:1476–1483.
- Jain KK. *Recent advances in oncoproteomics*. *Curr Opin Mol Ther*, 2002;4:203–209

- Jelier R, Goeman JJ, Hettne KM, Schuemie MJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. *Literature-aided interpretation of gene expression data with the weighted global test*. *Brief Bioinform*, 2011;12:518-29.
- Jimenez P, Saner K, Mayhew B, Rainey WE. *GATA-6 is expressed in the human adrenal and regulates transcription of genes required for adrenal androgen biosynthesis*. *Endocrinology*, 2003;144:4285-4288.
- Jorda M, De MB, Nadji M. *Calretinin and inhibin are useful in separating adrenocortical neoplasms from pheochromocytomas*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, 2002;10:67-70.
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. *Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans*. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68:1102-1109.
- Jude-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B. *DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements*. *J Biol Chem*, 1997;272(40):25252-9.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. *Science* 1992; 258:818-21.
- Kaminsky N, Luse S and Hartroft P. *Ultrastructure of adrenal cortex of the dog during treatment with DDD*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1962;29:127-159.
- Kamio T, Shigematsu, K., Sou, H, Kawai K, Tsuchiyama H. *Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma*. *Human Pathology*, 1990; 21:277-282.
- Karamurzin Y, Zeng Z, Stadler ZK, Zhang L, Ouansafi I, Al-Ahmadie HA, Sempoux C, Saltz LB, Soslow RA, O'Reilly EM, Paty PB, Coit DG, Shia J, Klimstra DS. *Unusual DNA mismatch repair-deficient tumors in Lynch syndrome: a report of new cases and review of the literature*. *Hum Pathol*, 2012;43(10):1677-1687.
- Karim RZ, Wills EJ, McCarthy SW, Scolyer RA. *Myxoid variant of adrenocortical carcinoma: report of a unique case*. *Pathol Int.* 2006;56:89-94.
- Kartheuser A, Walon C, West S, Breukel C, Detry R, Gribomont AC, Hamzehloei T, Hoang P, Maiter D, Pringot J, Rahier J, Khan PM, Curtis A, Burn J, Fodde R, Verellen-Dumoulin C. *Familial adenomatous polyposis associated with multiple adrenal adenomas in a patient with a rare 3' APC mutation*. *J Med Genet*, 1999;36(1):65-67.
- Kasperlik-Zaluska AA and Cichocki AJ. *Clinical role of determination of plasma mitotane and its metabolites levels in patients with adrenal cancer: results of a long-term follow-up*. *Exp. Ther. Oncol.*, 2005;5 (2)125-32
- Kebebew E, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. *Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress?* *World J Surg*, 2006; 30:872-8.
- Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B. *Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use*. *Ann Oncol*, 2000;11(10):1281-7.
- Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkilä P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, Voutilainen R, Heikinheimo M. *Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors*. *Mol. Cell. Endocrinol*, 2005;233(1-2):47-56.

- Kiiveri S, Liu J, Heikkilä P, Arola J, Lehtonen E, Voutilainen R, Heikinheimo M. *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in human adrenocortical tumors*. *Endocr. Res*, 2004;30(4):919-23.
- Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, Heikinheimo M. *Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue*. *Endocrinology*, 2002;143, 3136–3143.
- Kikuchi A. *Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway*. *Cancer Science*, 2003;94: 225–229.
- Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, Krill KT, Scheys JO, Simon DP, Trovato A, Yang WH, Hammer GD. *In search of adrenocortical stem and progenitor cells*. *Endocrinol. Rev.* 2009;30:241–263.
- Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, Hammer GD. *Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex*. *Development*, 2008;135:2593–2602.
- Kim JY, Kanai Y, Chairoungdua A, Cha SH, Matsuo H, Kim DK, Inatomi J, Sawa H, Ida Y, Endou H. *Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001; 1512(2):335-344.
- Kim KB, Chesney J, Robinson D, Gardner H, Shi MM, Kirkwood JM. *Phase I/II and pharmacodynamic study of dovitinib (TKI258), an inhibitor of fibroblast growth factor receptors and VEGF receptors, in patients with advanced melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2011;17(23):7451-61.
- Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW. *Biochemical assay of the respiratory chain complex activity*. *Methods in Cell Biology*, 2007; 80:93–119.
- Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS and Stratakis CA. *Mutations of the gene encoding the protein kinase a type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex*. *Nature Genetics*, 2000a; 26:89–92.
- Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA & Stratakis CA. *Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1a gene in patients with the Carney complex*. *Human Molecular Genetics*, 2000b ;9:3037–3046.
- Kirschner LS. *Signaling pathways in adrenocortical cancer*. *Ann NY Acad Sci*, 2002;968:222-39.
- Kjellin H, Johansson H, Höög A, Lehtiö J, Jakobsson PJ, Kjellman M. *Differentially expressed proteins in malignant and benign adrenocortical tumors*. *PLoS One*, 2014;9:e87951.
- Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M. *Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy*. *Cancer Res* 1996;56:4219–4223.
- Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Höög A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Bäckdahl M, Larsson C. *Genotyping of adrenocortical tumors: Very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16*. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:730 –735.
- Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Bäckdahl M and Larsson C. *Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999;84:730–735.
- Knudson AG Jr. *Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971;68: 820–3.

- Koch CA, Pacak K, Chrousos GP. *The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 2002;87(12):5367-84.
- Kolomecki K, Stepien H and 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;101:55-64.
- Kolomecki K, Stepien H, Bartos M & Kuzdak K. *Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours.* Endocrine Regulations, 2001;35:9-16.
- Koren I, Raviv Z, Shoshan-Barmatz V. *Downregulation of voltage-dependent anion channel-1 expression by RNA interference prevents cancer cell growth in vivo.* Cancer Biology and Therapy, 2010; 9:1046-1052.
- Koschker AC, Fassnacht M, Hahner S, Weismann D, Allolio B. *Adrenocortical carcinoma-improving patient care by establishing new structures.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006;114:45-51.
- 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;16:565-572.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. *Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma.* Cancer Research, 2006; 66(2):632-637.
- Kroemer G and Pouyssegur J. *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel.* Cancer Cell, 2008;13(6):472-482.
- Krueger R, Uhl UJ, Voigt KH. *Fine structural effects of a DDT derivative on a rat adrenocortical carcinoma.* Histochemical Journal, 1984;16:406-408.
- Kuruba R and Gallagher SF. *Current management of adrenal tumors.* Curr Opin Oncol, 2008;20(1):34-46.
- Lacroix A. *Approach to the patient with adrenocortical carcinoma.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 2010;95, 4812-4822.
- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. *MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations.* Hepatology, 2008;47: 1955-1963.
- Lafemina J and Brennan MF. *Adrenocortical carcinoma: past, present and future.* Journal of Surgical Oncology, 2012; 106:586-594.
- Lalli E. *Adrenocortical development and cancer: focus on SF-1.* Journal of Molecular Endocrinology, 2010;44:301-307.
- Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjold M. *Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma.* Nature, 1988;332: 85-7.
- Latronico AC, Chrousos GP. *Extensive personal experience: adrenocortical tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 1997;82(5):1317-24.
- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendoca BB. *An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 2001;86(10):4970-3.

- Latronico AC, Reincke M, Mendonca BB, Arai K, Mora P, Allolio B, Wajchenberg BL, Chrousos GP, Tsigos C. *No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1995; 80: 875–7.
- Lau SK, Weiss LM. *The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later*. Hum. Pathol., 2009; 40:757–68.
- Leboulleux S, Deandreis D, Al Ghuzlan A, Auperin A, Goere D, Dromain C, Elias D, Caillou B, Travagli JP, De Baere T, Lumbroso J, Young J, Schlumberger M, Baudin E. *Adrenocortical carcinoma: is the surgical approach a risk factor of peritoneal carcinomatosis?* Eur J Endocrinol, 2010;162(6):1147–53.
- Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim JY, Lee J, Yang HM, Mook-Jung I, Nam KY, Chung J, Lazar MA, Kim HS. *Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes*. Cell Metab, 2014;19:484–97.
- Lehmann TP, Wrzesiski T, Jagodzinski PP. *The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCI-H295R adrenocortical cells*. Mol Med Rep., 2013;7:893–900.
- Leibovitz A, McCombs WM 3rd, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. *New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex*. J Natl Cancer Inst, 1973;51(2):691–7.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998;396:643–9.
- Levine AJ. *P53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997; 88: 323–31.
- Libe R, Bertherat J. *Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases*. Eur J Endocrinol, 2005;153(4):477–87.
- Libe R, Fratticci A and Bertherat J. *Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management*. Endocrine Related Cancer, 2007;14:13–28.
- Libe R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J. *Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity*. Clinical Cancer Research, 2007; 13: 844–850.
- Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoeflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F. *Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis*. Endocrinology, 2007;148: 693–704.
- Light K, Jenkins PJ, Weber A, Perrett C, Grossman A, Pistorello M, Asa SL, Clayton RN, Clark AJ. *Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia?* Life Sci., 1995; 56: 1523–7.
- Lin CW, Chang YH, Pu HF. *Mitotane exhibits dual effects on steroidogenic enzymes gene transcription under basal and cAMP-stimulating microenvironments in NCI-H295 cells*. Toxicology, 2012; 298:14–23.
- Lin JF, Xu J, Tian HY, Gao X, Chen QX, Gu Q, Xu GJ, Song JD, Zhao FK. *Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis*. Int J Cancer, 2007;121(12):2596–605.
- Lin SR, Tsai JH, Yang YC and Lee SC. *Mutations of k-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan*. Br. J. Cancer, 1998;77:1060–1065.

- Lindhe O and Skogseid B. *Mitotane effects in a H295R xenograft model of adjuvant treatment of adrenocortical cancer.* Horm. Metab. Res., 2010; 42:725–730.
- Lindhe O, Skogseid B, Brandt I. *Cytochrome P450-catalyzed binding of 3-methylsulfonyl-DDE and o,p'-DDD in human adrenal zona fasciculata/reticularis.* J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87:1319-1326.
- Lipsett MB, Hertz R, Ross GT. *Clinical and pathophysiologic aspects of adrenocortical carcinoma.* Am J Med, 1963;35:374-83.
- Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Voutilainen R. *Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, P57kip2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 1997;82:1766–71.
- Logie A, Boulle N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, Gicquel C. *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line.* J. Mol. Endocrinol., 1999;23 (1), 23–32.
- Loilome W, Joshi AD, ap Rhys CM, Piccirillo S, Vescevi AL, Gallia GL, Riggins GJ. *Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of fibroblast growth factor pathway signaling.* J Neurooncol, 2009;94(3):359-66.
- Lomax ME, Barnes DM, Hupp TR, Pickett SM, Campjohn RS. *Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members.* Oncogene, 1998;17:643– 649.
- Looyenga BD and Hammer GD. *Origin and identity of adrenocortical tumors in inhibin knockout mice: implications for cellular plasticity in the adrenal cortex.* Mol. Endocrinol., 2006;20:2848–2863.
- Luconi M, Mangoni M, Gelmini S, Poli G, Nesi G, Francalanci M, Pratesi N, Cantini G, Lombardi A, Pepi M, Ercolino T, Serio M, Orlando C, Mannelli M. *Rosiglitazone impairs proliferation of human adrenocortical cancer: preclinical study in a xenograft mouse model.* Endocr Relat Cancer, 2010;17(1):169-77.
- Lujambio A and Lowe SW. *The microcosmos of cancer.* Nature, 2012;482 (7385):347–355.
- Lumbroso S, Paris F, Sultan C. *McCune-Albright syndrome: Molecular genetics.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2002;15(suppl 3):875– 882.
- Lund BO and Lund J. *Novel involvement of a mitochondrial steroid hydroxylase (P450c11) in xenobiotic metabolism.* Journal of Biological Chemistry, 1995;270:20895–20897.
- Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P et al. *Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy.* N Engl J Med 1990;322:1195-1201.
- Lyon MF. *The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes.* Am J Hum Genet, 1988;42:8 –16.
- Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünwald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR et al. *Two G protein oncogenes in human endocrine tumors.* Science, 1990;249:655– 659.
- Macchi C, Rebuffat P, Blandamura S, Piazza M, Macchi V, Fiore D, Nussdorfer GG. *Adrenocortical oncocytoma: case report and review of the literature.* Tumori, 1998;84:403–407.
- MacFarlane DA. *Cancer of the adrenal cortex: the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases.* Ann R Coll Surg Engl, 1958;23(3):155-86.

- Maere S, Heymans K, Kuiper M. *BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks*. *Bioinformatics*, 2005;21:3448-3449.
- Mannelli M, Gelmini S, Arnaldi G, Becherini L, Bemporad D, Crescioli C, Pazzagli M, Mantero F, Serio M, Orlando C. *Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000;85(1):468-70.
- Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. *Endocr Rev*, 2004; 25(2):309-40.
- Marshall WH, Martin FI, Mackay IR. *Gardner's syndrome with adrenal carcinoma*. *Aust Ann Med*, 1967;16(3):242-244.
- Martz F and Straw JA. *Metabolism and covalent binding of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'-DDD): correlation between adrenocorticolytic activity and metabolic activation by adrenocortical mitochondria*. *Drug Metabolism and Disposition*, 1980; 8:127-130.
- Martz F and Straw JA. *The in vitro metabolism of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'-DDD) by dog adrenal mitochondria and metabolite covalent binding to mitochondrial macromolecules: a possible mechanism for the adrenocorticolytic effect*. *Drug Metab Dispos*, 1977;5:482-486.
- Mathupala SP and Pedersen PL. *Voltage dependent anion channel-1(VDAC-1) as an anti-cancer target*. *Cancer Biology and Therapy*, 2010;9:1053-1056.
- McCauley LR, Nguyen MM. *Laparoscopic radical adrenalectomy for cancer: long-term outcomes*. *Curr Opin Urol*, 2008;18(2):134-8.
- McNicol AM, Struthers AJ, Nolan CE, Hermans J, Haak HR. *Proliferation in adrenocortical tumors: correlation with clinical outcome and p53 status*. *Endocr Pathol*, 1997;8(1):29-36.
- Meehan KL, Holland JW, Dawkins HJ. *Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer*. *Prostate*, 2002; 50:54-63.
- Mesiano S, Mellon SH and Jaffe RB. *Mitogenic action, regulation, and localization of insulin-like growth factors in the human fetal adrenal gland*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1993;76:968-976.
- Mesiano S, Mellon SH, Gospodarowicz D, Di Blasio AM and Jaffe RB. *Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation*. *PNAS*, 1991;88:5428-5432.
- Metz SA. *Drug treatment of inoperable adrenocortical carcinoma*. *JAMA*, 1973; 224:530.
- Michl P, Beikler T, Engelhardt D and Weber MM. *Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways*. *J. Neuroendocrinol.*, 2000;12: 23-28.
- Miller BS, Ammori JB, Gauger PG, Broome JT, Hammer GD, Doherty GM. *Laparoscopic resection is inappropriate in patients with known or suspected adrenocortical carcinoma*. *World J Surg*, 2010;34(6):1380-5.
- Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, DeFronzo RA. *Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type 2 diabetic patients*. *Diabetologia*, 2001a;44(12):2210-9.

- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA. *Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone*. Diabetes Care, 2001b;24(4):710-9.
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA. *Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2002;87(6):2784-91.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K. *Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad*. Mol. Endocrinol., 2003;17, 507-519.
- Moore RN, Penney DP, Averill KT. *Fine structural and biochemical effects of aminoglutethimide and o,p'-DDD on rat adrenocortical carcinoma 494 and adrenals*. Anatomical Record, 1980;198:113-124.
- Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Suzuki T, Abe T, Tanemoto M, Abe M, Urano A, Ishidoya S, Arai Y, Takahashi K, Sasano H, Ito S. *Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas*. Endocr J, 2008;55:49-55.
- Nakamura M, Miki Y, Akahira J, Morimoto R, Satoh F, Ishidoya S, Arai Y, Suzuki T, Hayashi Y, Sasano H. *An analysis of potential surrogate markers of target-specific therapy in archival materials of adrenocortical carcinoma*. Endocrine Pathology, 2009; 20:17-23.
- Nelson AA, Woodard G. *Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis-(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE)*. Arch Pathol, 1949;48(5):387-94.
- Nesterova M, Bossis I, Wen F, Horvath A, Matyakhina L, Stratakis CA. *An immortalized human cell line bearing a PRKAR1A-inactivating mutation: effects of overexpression of the wild-type Allele and other protein kinase A subunits*. J Clin Endocrinol Metab, 2008;93(2):565-71.
- Nishisho L, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. Science, 1991;253(5020):665-669.
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. Nature, 1993;362 (6422), 749-751.
- Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. *p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors*. Int J Cancer 1993;54:408-410.
- Ohtake H, Kawamura H, Matsuzaki M, Yokoyama E, Kitajima M, Onizuka S, Yamakawa M. *Oncocytic adrenocortical carcinoma*. Ann Diagn Pathol., 2010;14:204-208.
- Okamoto M, Takemori H, Halder SK, Hatano O. *Zona glomerulosa-specific factor: cloning and function*. Steroids, 1997;62:73-76.
- Oliver G and Schaefer EA. *On the physiological action of extract of the suprarenal capsules*. The Journal of Physiology, 1895;18 (3):230-276.
- Ozata DM, Caramuta S, Velazquez-Fernandez D, Akcakaya P, Xie H, Hoog A, Zedenius J, Backdahl M, Larsson C, Lui WO. *The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma*. Endocrin. Relat. Cancer., 2011;18 (6):643-655.

- Papotti M, Libè R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. *The Weiss score and beyond-histopathology for adrenocortical carcinoma*. *Horm Cancer*, 2011;2:333-340.
- Papotti M, Volante M, Duregon E, Delsedime L, Terzolo M, Berruti A, Rosai J. *Adrenocortical tumors with myxoid features: a distinct morphologic and phenotypical variant exhibiting malignant behavior*. *Am J Surg Pathol*, 2010;34:973-983.
- Patalano A, Brancato V, Mantero F. *Adrenocortical cancer treatment*. *Horm Res*, 2009; 71(Suppl 1): 99-104.
- Paton BL, Novitsky YW, Zerey M, Harrell AG, Norton HJ, Asbun H, Kercher KW, Heniford BT. *Outcomes of adrenal cortical carcinoma in the United States*. *Surgery*, 2006;140:914-920; discussion 919-920.
- Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. *MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy*. *Cancer*, 2011;117 (8): 1630-1639.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. *Oncogene*, 2006;25:4633-46.
- Pentheroudakis G, Kotoula V, Fountzilas E, Kouvatseas G, Basdanis G, Xanthakis I, Makatsoris T, Charalambous E, Papamichael D, Samantas E, Papakostas P, Bafaloukos D, Razis E, Christodoulou C, Varthalitis I, Pavlidis N, Fountzilas G. *A study of gene expression markers for predictive significance for bevacizumab benefit in patients with metastatic colon cancer: a translational research study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG)*. *BMC Cancer*, 2014; 20;14:111.
- Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, Oliveira AG, Michalkiewicz E, Rodrigues GA, Zambetti G, Haddad BR, Lalli E. *SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours*. *European Journal of Cancer*, 2006;42: 1040-1043.
- Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, Zancanella P, Figueiredo BC. *Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil*. *Pediatr Blood Cancer*, 2006;47:56-60.
- Pilon C, Pistorello M, Moscon A, Altavilla G, Pagotto U, Boscaro M, Fallo F. *Inactivation of the P16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 1999;84:2776-9.
- Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendoca BB, Latronico AC. *Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2004; 48:647-650.
- Pluquet O, Hainaut P. *Genotoxic and Non-Genotoxic Pathways of P53 Induction*. *Cancer Lett*, 2001;174: 1-15.
- Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, Kenn W, Hahner S, Allolio B, Flentje M. *Radiotherapy in adrenocortical carcinoma*. *Cancer*, 2009;115(13):2816-23.
- Poli G, Guasti D, Rapizzi E, Fucci R, Canu L, Bandini A, Cini N, Bani D, Mannelli M, Luconi M. *Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2013;20:537-550.
- Pollak M. *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2008 8(12):915-28.
- Pópulo H, Lopes JM, Soares P. *The mTOR signalling pathway in human cancer*. *Int J Mol Sci*, 2012;13(2):1886-918.

- Porpiglia F, Fiori C, Daffara F, Zaggia B, Bollito E, Volante M, Berruti A, Terzolo M. *Retrospective evaluation of the outcome of open versus laparoscopic adrenalectomy for stage I and II adrenocortical cancer*. Eur Urol, 2010;57(5):873-8.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006; 441:437-443.
- Pratt AJ, MacRae IJ. *The RNA-induced silencing complex: a versatile gene silencing machine*. J. Biol. Chem, 2009;284 (27): 17897-17901.
- Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. *Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney*. Mech. Dev., 1998;71, 37-48.
- Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. *Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2008; 93 (6), 2057-2062.
- Quinkler M, Kroiss M, Hahner S, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. *Sunitinib in Refractory Adrenocortical Carcinoma: Results of a Phase II Trial*. Endocr Rev, 2011.
- Ragazzon B, Assié G, Bertherat J. *Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments*. Endocrine-Related Cancer, 2011;18:R15-R27.
- Ragazzon B, Libe R, Gaujoux S, Assié G, Fratticci A, Launay P, Clauser E, Bertagna X, Tissier F, de Reynies A, Bertherat J. *Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers*. Cancer Research, 2010;70:8276-8281.
- Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. *Adrenocortical cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2004;228(1-2):23-38.
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. *Relaxation of imprinted genes in human cancer*. Nature 1993;362 (6422), 747-749.
- Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJ, Eggo MC. *Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2006;291:G288-G296.
- Raparia K, Ayala AG, Sienko A, Zhai QJ, Ro JY. *Myxoid adrenal cortical neoplasms*. Ann Diagn Pathol., 2008;12:344-348.
- Raymond VM, Everett JN, Furtado LV, Gustafson SL, Jungbluth CR, Gruber SB, Hammer GD, Stoffel EM, Greenson JK, Giordano TJ, Else T. *Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2013;31:3012-3018.
- Reginato MJ, Bailey ST, Krakow SL, Minami C, Ishii S, Tanaka H, Lazar MA. *A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor γ -activating properties*. J Biol Chem, 1998;273(49):32679-84.
- Reincke M, Beuschlein F, Menig G, Hofmockel G, Arlt W, Lehmann R, Karl M and Allolio B. *Localization and expression of adrenocorticotropic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex*. Journal of Endocrinology, 1998;156(3):415-23.
- 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;78:790-794.

- Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B. *Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors – implications for tumorigenesis*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1997;82: 3054-8.
- Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. *Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures*. Bioinformatics, 2003;19:368-75.
- 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. USA, 2001;98(16):9330-5.
- Ringel MD, Schwindinger WF, Levine MA. *Clinical implications of genetic defects in G proteins. The molecular basis of McCune-Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy*. Medicine, 1996;75(4):171-184.
- Roman S. *Adrenocortical carcinoma*. Curr Opin Oncol, 2006;18:36-42.
- Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X, Bertherat J. *cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors*. Endocr Res, 2002;28:765-775.
- Rosenzweig SA and Atreya HS. *Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer*. Biochem Pharmacol, 2010;80(8):1115-24.
- Roszbach HC, Baschinsky D, Wynn T, Obzut D, Sutcliffe M, Tebbi C. *Composite adrenal anaplastic neuroblastoma and virilizing adrenocortical tumor with germline TP53R248W mutation*. Pediatr Blood Cancer, 2008;50:681- 683.
- Sabolch A, Feng M, Griffith K, Hammer G, Doherty G, Ben-Josef E. *Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011;80(5):1477-84.
- Samandari E, Kempna P, Nuoffer JM, Hofer G, Mullis PE, Flück CE. *Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities*. Journal of Endocrinology, 2007;195: 459-472.
- Samani AA, Yakar S, LeRoith, D Brodt P. *The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights*. Endocrine Reviews, 2007;28:20-47.
- Samntra V, Vassilopoulou-Sellin R, Fojo A, Oh WK, LaRocca RV, Ernstoff MS, Memoli VA, Cole BF, Quinn DI, Simmons PA, Tretter CP. *A phase II trial of gefitinib monotherapy in patients with unresectable adrenocortical carcinoma (ACC)*. J Clin Oncol, 2007.
- Sasano H, Imatani A, Shizawa S, Suzuki T, Nagura H. *Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenal*. Mod Pathol, 1995;8:11-17.
- Sasano H, Suzuki T, Moriya T. *Recent advances in histopathology and immunohistochemistry of adrenocortical carcinoma*. Endocr Pathol, 2006;17(4):345-54.
- Sasano H, Suzuki T, Shizawa S, Kato K, Nagura H. *Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization*. Mod. Pathol., 1994;7:741-746.
- Sbiera S, Kroiss M, Thamm T, Beyer M, Majidi F, Kuehner D, Wobser M, Becker JC, Adam P, Ronchi C, Allolio B, Fassnacht M. *Survivin in adrenocortical tumors -pathophysiological implications and therapeutic potential*. Horm MetabRes, 2013, 45:137-146.

- Sbiera S, Schnull S, Assie G, Voelker HU, Kraus L, Beyer M, Ragazzon B, Beuschlein F, Willenberg HS, Hahner S, Saeger W, Bertherat J, Allolio B, Fassnacht M. *High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 2010;95:E161-E171.
- Scheys JO, Heaton JH, Hammer GD. *Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice.* Endocrinology. 2011;152(9):3430-9.
- Schimmer BP and White PC *Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease.* Molecular Endocrinology, 2010;24: 1322-1337.
- Schmitt A, Saremaslani P, Schmid S, Rousson V, Montani M, Schmid DM, Heitz PU, Komminoth P, Perren A. *IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours.* Histopathology, 2006;49(3):298-307.
- Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW. *Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours.* Journal of Clinical Pathology, 2011;64:529-535.
- Schröder S, Padberg BC, Achilles E, Holl K, Dralle H, Kloppel G. *Immunocytochemistry in adrenocortical tumours: a clinicomorphological study of 72 neoplasms.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1992;420:65-70.
- Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. *Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference.* Endocr Relat Cancer, 2005;12(3):667-80.
- Schteingart DE, Giordano TJ, Benitez RS, Burdick MD, Starkman MN, Arenberg DA, Strieter RM. *Overexpression of CXC chemokines by an adrenocortical carcinoma: a novel clinical syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2001;86(8):3968-74.
- Schteingart DE. *Adjuvant mitotane therapy of adrenal cancer-use and controversy.* New England Journal of Medicine, 2007; 356:2415-2418.
- Schulick RD, Brennan MF. *Adrenocortical carcinoma.* World J Urol, 1999;17:26-34.
- Schulte KM, Heinze M, Mengel M, Simon D, Scheuring S, Köhrer K, Röher HD. *MEN 1 gene mutations in sporadic adrenal adenomas.* Hum Genet, 1999;105:603-610.
- Schulte KM, Mengel M, Heinze M, Simon D, Scheuring S, Köhrer K, Röher HD. *Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN 1 gene in adrenal cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2000;85:441-448.
- Schwindinger WF, Francomano CA, Levine MA. *Identification of a mutation in the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992;89(11):5152-5156.
- Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. *Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course.* Endocr Relat Cancer, 2005;12:149-159.
- Seidinger AL, Mastellaro MJ, Fortes FP, Assupção JG, Cardinali IA, Ganazza MA, Ribeiro RC, Brandalise SR, Aguiar SS, Yunes JA. *Association of the highly prevalent TP53 mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil.* Cancer, 2011;117(10):2228-35.

- Seow TK, Liang RC, Leow CK, Chung MC. *Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics*. *Proteomics*, 2001; 1:1249-1263.
- Sheng JY, He HC, Zhu Y, Wu YX, Shen ZJ, Zhao JP, Ma G, Xu YZ. *Myxoid adrenal cortical tumor: report of four cases*. *Chin Med J (Engl)*, 2012;125:1672-1674.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A and Der CJ. *Understanding Ras: 'it ain't over til it's over'*. *Trends in Cell Biology*, 2000;10 147-154.
- Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. *Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002;87:3467-3474.
- Sidhu S, Martin E, Gicquel C, Melki J, Clark SJ, Campbell P, Magarey CJ, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. *Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis*. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:549-554.
- Sidhu S, Martin E, Gicquel C, Melki J, Clark SJ, Campbell P, Magarey CJ, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. *Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis*. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2005;31(5):549-554.
- Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E, Oberg K. *Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992;75(1):76-81.
- Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, Bartsch DK. *Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors*. *Eur J Endocrinol*, 2006;154(4):587-98.
- Smas CM, Sul HS. *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*. *Cell* 1993;73, 725-734.
- Smith LT, Lin M, Brena RM, Lang JC, Schuller DE, Otterson GA, Morrison CD, Smiraglia DJ, Plass C. *Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006;103, 982-987.
- Soldes O, Kuick RD, Thompson IA 2nd, Hughes SJ, Orringer MB, Iannettoni MD, Hanash SM, Beer DG. *Differential expression of Hsp27 in normal oesophagus, Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinomas*. *Br. J. Cancer*, 1999; 79:595-603.
- Song SY, Park S, Kim SR, Suh YL. *Oncocytic adrenocortical carcinomas: a pathological and immunohistochemical study of four cases in comparison with conventional adrenocortical carcinomas*. *Pathol Int.*, 2004;54:603-610.
- Soon PS, Libe R, Benn DE, Gill A, Shaw J, Sywak MS, Groussin L, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J, McDonald KL, Sidhu SB, Robinson BG. *Loss of heterozygosity of 17p13, with possible involvement of ACADVL and ALOX15B, in the pathogenesis of adrenocortical tumors*. *Ann Surg*, 2008;247:157-164.
- Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. *Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer*. *Oncologist*, 2008;13: 548-561.
- Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. *MIR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer*. *Clin. Can. Res.*, 2009;15 (24):7684-7692.

- Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, Santini D, Vincenzi B, Badalamenti G, Intrivici C, Del Buono S, De Francia S, Kalomirakis E, Ratti R, Angeli A, Dogliotti L, Papotti M, Terzolo M, Berruti A. *Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study*. *Endocr Relat Cancer*, 2010;17(2):445-53.
- Stigliano A, Cerquetti L, Borro M, Gentile G, Bucci B, Misiti S, Piergrossi P, Brunetti E, Simmaco M, Toscano V. *Modulation of proteomic profile in H295R adrenocortical cell line induced by mitotane*. *Endocr Relat Cancer*, 2008;15:1-10.
- Stratakis CA. *Adrenal cancer in 2013: Time to individualize treatment for adrenocortical cancer?* *Nature Reviews Endocrinology*, 2014;10:76-78.
- Sturgeon C, Shen WT, Clark OH, Duh QY, Kebebew E. *Risk assessment in 457 adrenal cortical carcinomas: how much does tumor size predict the likelihood of malignancy?* *J Am Coll Surg*, 2006;202:423-430.
- Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. *Adrenal cortical carcinoma*. *J Urol*, 1978;120(6):660-5.
- Sun B, Huang Q, Liu S, Chen M, Hawks CL, Wang L, Zhang C, Hornsby PJ. *Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase*. *Cancer Res*, 2004;64(17):6144-51.
- Suresh B, Kishore TA, Albert AS, Joy A. *Myxoid adrenal cortical carcinoma—a rare variant of adrenocortical carcinoma*. *Indian J Med Sci*, 2005;59:505-507.
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. *Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2007; 26(2):299-310.
- Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. *Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas*. *Clinical Endocrinology*, 2008;68: 264-270.
- Takazawa R, Ajima J, Yamauchi A, Goto M. *Unusual double primary neoplasia: adrenocortical and ureteral carcinomas in Werner syndrome*. *Urol Int*, 2004; 72(2):168-70.
- Tamura M, Kanno Y, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N. *Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1*. *Mech. Dev*, 2001;102:135-144.
- Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. *N. Engl. J. Med.*, 2007;356, 2372-2380.
- Terzolo M, Pia A, Berruti A, Osella G, Ali A, Carbone V, Testa E, Dogliotti L, Angeli A. *Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000;85, 2234-2238.
- Thakker RV. *Multiple endocrine neoplasia syndromes of the twentieth century*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998;83(8):2617-20.
- Tolcher A, Papadopoulos K, Agnew J, Marshall J, Tanzola C, Zanghi J, Baker KP, Keer HN, Patniak A. *Preliminary results of a phase 1 study of FP-1039 (FGFR1:Fc), a novel antagonist of multiple fibroblast growth factor (FGF) ligands, in patients with advanced malignancies*. *Mol Cancer Ther*, 2009.

- Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, Riesz P, Reismann P, Patocs A, Liko I, Gaillard RC, Falus A, Racz K, Igaz P. *Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis*. *Endocr. Relat. Can.*, 2009;16 (3):895–906.
- Tong X, Zhao F, Thompson CB. *The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009;19:32-7.
- Tremblay JJ and Viger RS. *Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis*. *J Steroid Biochem*, 2003;85(2-5):291-8.
- Turanyi E, Dezso K, Paku S, Nagy P. *DLK is a novel immunohistochemical marker for adrenal gland tumors*. *Virchows Arch*, 2009;455:295–299.
- Turner HE, Harris AL, Melmed S and Wass JA. *Angiogenesis in endocrine tumors*. *Endocrine Reviews*, 2003; 24:600–632.
- Ueno M, Nakashima J, Akita M, Ban SI, Nakanoma T, Iida M, Deguchi N. *Characterization of a newly established cell line derived from human adrenocortical carcinoma*. *Int J Urol*, 2001;8(1):17-22
- Ummanni R, Mundt F, Pospisil H, Venz S, Scharf C, Barrett C, Fälth M, Köllermann J, Walther R, Schlomm T, Sauter G, Bokemeyer C, Sültmann H, Schuppert A, Brümmendorf TH, Balabanov S. *Identification of clinically relevant protein targets in prostate cancer with 2D-DIGE coupled mass spectrometry and systems biology network platform*. *PLoS One*, 2011;6(2):e16833.
- Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira J, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production*. *J Mol Endocrinol*, 2011;46(1):37-49.
- van Erp NP, Guchelaar HJ, Ploeger BA, Romijn JA, Hartigh Jd, Gelderblom H. *Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity*. *Eur J Endocrinol*, 2011;164:621–626.
- van Slooten H, Moolenaar AJ, van Seters AP, Smeenk D. *The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDD: prognostic implications of serum level monitoring*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984;20(1):47-53.
- van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. *nMorphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors*. *Cancer*, 1985;55:766–773.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, Evans DG, Harris M, Kelsey AM, Birch JM. *Are there low-penetrance TP53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors*. *American Journal of Human Genetics*, 1999;65: 995–1006.
- Vaughan Jr ED. *Diseases of the adrenal gland*. *Med Clin North AM*, 2004;88:443-66.
- 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;138(6):1087-94.
- Verschoor ML, Wilson LA, Singh G. *Mechanisms associated with mitochondrial generated reactive oxygen species in cancer*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2010;88(3):204-219.
- Veugelers M, Wilkes D, Burton K, McDermott DA, Song Y, Goldstein MM, La Perle K, Vaughan CJ, O'Hagan A, Bennett KR, Meyer BJ, Legius E, Karttunen M, Norio R, Kaariainen H, Lavyne M, Neau JP, Richter G, Kirali K, Farnsworth A, Stapleton K, Morelli P, Takanashi Y, Bamforth JS, Eitelberger F, Noszian I, Manfroi W, Powers J, Mochizuki Y, Imai T, Ko GT, Driscoll DA, Goldmuntz

- E, Edelberg JM, Collins A, Eccles D, Irvine AD, McKnight GS, Basson CT. *Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and PRKAR1a haploinsufficient mice*. PNAS, 2004;101:14222-14227.
- Vogel C and Marcotte EM. *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat. Rev. Genet., 2012;13:227-32.
- Vogelstein B, Lane D and Levine AJ. *Surfing the p53 network*. Nature, 2000;408:307-310.
- Volante M, Bollito E, Sperone P, Tavaglione V, Daffara F, Porpiglia F, Terzolo M, Berruti A, Papotti M. *Clinicopathological study of a series of 92 adrenocortical carcinomas: from a proposal of simplified diagnostic algorithm to prognostic stratification*. Histopathology, 2009;55:535-543.
- Volante M, Terzolo M, Fassnacht M, Rapa I, Germano A, Sbiera S, Daffara F, Sperone P, Scagliotti G, Allolio B, Papotti M, Berruti A. *Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer*. Clin. Cancer Res., 2012;18:3452-3461.
- Wachenfeld C, Beuschlein F, Zwermann O, Mora P, Fassnacht M, Allolio B, Reincke M. *Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful?* Eur J Endocrinol, 2001;145(3):335-41.
- Wagner AS, Fleitz JM, Kleinschmidt-Demasters BK. *Pediatric adrenal cortical carcinoma: brain metastases and relationship to NF-1, case reports and review of the literature*. J Neurooncol, 2005; 75(2):127-33.
- 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;88:711-736.
- Waldmann J, Bartsch DK, Kann PH, Fendrich V, Rothmund M, Langer P. *Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening*. Langenbecks Arch Surg, 2007;392(4):437-43.
- Wang T and Rainey WE. *Human adrenocortical carcinoma cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2012;351(1):58-65.
- Warburg O, Posener K, Negelein E. *Ueber den Stoffwechsel der Tumoren*. Biochemische Zeitschrift, 1924; 152:319-344.
- Warburg O. *On the origin of cancer cells*. Science, 1956; 319:309-314.
- Ward PS and Thompson CB. *Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate*. Cancer Cell, 2012; 21(3):297-308.
- Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W and Engelhardt D. *Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands*. European Journal of Endocrinology, 1997a;136:296-303.
- Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ and Engelhardt D. *Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells*. Endocrinology, 1997b;138: 2207-2210.
- Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010; 107(19):8788-8793.

- Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E and Spiegel AM. *Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome*. New England Journal of Medicine, 1991;325:1688-1695.
- Weiss LM. *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. Am J Surg Pathol, 1984;8:163-169.
- Weitzel LR, Byers T, Allen J, Finlayson C, Helmke SM, Hokanson JE, Hunsucker SW, Murphy JR, Newell K, Queensland KM, Singh M, Wischmeyer PE, Duncan MW, Elias A. *Discovery and verification of protein differences between Er positive/Her2/neu negative breast tumor tissue and matched adjacent normal breast tissue*. Breast Cancer Res Treat, 2010;124(2):297-305.
- West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez GC, Pianovski MA, Oliveira Filho AG, Malkin D, Lalli E, Ribeiro R, Zambetti GP. *Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors*. Cancer Res, 2007;67(2):600-8.
- Wong DD, Spagnolo DV, Bisceglia M, Havlat M, McCallum D, Platten MA. *Oncocytic adrenocortical neoplasms - a clinicopathologic study of 13 new cases emphasizing the importance of their recognition*. Hum Pathol, 2011;42:489-499.
- Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M. *Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2010;162(2):349-56.
- Wright KD and Gilbertson RJ. *To infinium, and beyond!* Can Cell, 2010;17 (5): 419-420.
- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. *Proteomic applications for the early detection of cancer*. Nat. Rev. Cancer., 2003;3:267-75.
- Xiao YF, Yong X, Fan YH, Lu MH, Yang SM, Hu CJ. *MicroRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: Novel tools for cancer screening (Review)*. Oncol. Rep., 2013; 30(2):535-544.
- Xin X, Abrams TJ, Hollenbach PW, Rendahl KG, Tang Y, Oei YA, Embry MG, Swinarski DE, Garrett EN, Pryer NK, Trudel S, Jallal B, Mendel DB, Heise CC. *CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice*. Clin Cancer Res, 2006;12(16):4908-15.
- Yang L, Suwa T, Wright WE, Shay JW, Hornsby PJ. *Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells*. MechAgeing Dev, 2001;122(15):1685-94.
- Yang MS, Wang HS, Wang BS, Li WH, Pang ZF, Zou BK, Zhang X, Shi XT, Mu DB, Zhang DX, Gao YS, Sun XW, Xia SJ. *A comparative proteomic study identified calreticulin and prohibitin up-regulated in adrenocortical carcinomas*. Diagn. Pathol., 2013;8:58.
- Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, Robertson CN, LaRocca R, Zbar B. *Genetic changes in human adrenocortical carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1989;81:518 -523.
- 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;18:455-460; discussion 460-461.
- Yu RN, Ito M, Jameson JL. *The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor regulatory element*. Mol. Endocrinol., 1998a;12:1010-1022.

- Zager RA, Johnson ACM, Hanson SY, Lund S. *Acute nephrotoxic and obstructive injury primes the kidney to endotoxin-driven cytokine/chemokine production.* *Kidney International*, 2006; 69(7):1181-1188.
- Zaid H, Abu-Hamad S, Israelson A, Nathan I and Shoshan-Barmatz V. *The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death.* *Cell Death and Differentiation*, 2005;12:751-760.
- Zeiger MA, Thompson GB, Duh QY, Hamrahian AH, Angelos P, Elaraj D, Fishman E, Kharlip J; American Association of Clinical Endocrinologists; American Association of Endocrine Surgeons. *American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons medical guidelines for the management of adrenal incidentalomas: executive summary of recommendations.* *Endocr Pract*, 2009;15(5):450-3.
- Zhang H, Bu H, Chen H, Wei B, Liu W, Guo J, Li F, Liao D, Tang Y, Zhang Z. *Comparison of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of adrenocortical tumors: immunohistochemical analysis of adrenocortical tumors.* *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, 2008;16:32-39.
- Zhang H, Ghai P, Wu H, Wang C, Field J, Zhou GL. *Mammalian adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulates cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion.* *J. Biol. Chem.*, 2013;288:20966-77.
- Zhang H., Masuoka L, Baker K, Sadra A, Bosch E, Brennan T, Doberstein S, Goodworth G, Hestir K, Hollenbaugh D, Long L, Qin M, Williams LT. *FP-1039 (FGFR1:Fc), A Soluble FGFR1 Receptor Antagonist, Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis.* In AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics Discovery, Biology and Clinical Applications, San Francisco, 2007.
- Zhang J, Sun J, Liang Z, Gao J, Zeng X, Liu T. *Myxoid adrenocortical neoplasms: a study of the clinicopathologic features and EGFR gene status of ten Chinese cases.* *Am J Clin Pathol.*, 2011;136:783-792.
- Zhang L, Zhang H, Zhao Y, Li Z, Chen S, Zhai J, Chen Y, Xie W, Wang Z, Li Q, Zheng X, Hu X. *Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: role of Trp112 (Trp111).* *FEBS Lett.*, 2013;15:587:3681-6.
- Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rütimann K, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU, Komminoth P. *Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis.* *Am J Pathol* 1999;155:1039-1045.
- Zhao X, Gao S, Ren H, Sun W, Zhang H, Sun J, Yang S, Hao J. *Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-bundling protein fascin.* *Cancer Res.*, 2014;74:2455-64.
- Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Zhao Y. *2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers.* *Mol Cell Proteomics*, 2002;1:117-124.
- Zhou H, Luo Y, Huang S. *Updates of mTOR inhibitors.* *Anticancer Agents Med Chem*, 2010;10(7):571-81.
- Zini L, Porpiglia F and Fassnacht M. *Contemporary Management of Adrenocortical Carcinoma.* *European Urology*, 2011;60(5):1055-65.
- Zsippai A, Szabo DR, Szabo PM Tömböl Z, Bendes MR, Nagy Z, Rác K, Igaz P. *mRNA and microRNA expression patterns in adrenocortical cancer.* *American Journal of Cancer Research* 2011;1:618-628.

Zsippai A, Szabó DR, Tömböl Z, Szabó PM, Eder K, Pállinger E, Gaillard RC, Patócs A, Tóth S, Falus A, Rácz K, Igaz P. *Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study.* Pharmacogenomics, 2012;13:1351–1361.

PUBBLICAZIONI

1. **Poli G**, Ceni E, Armignacco R, Ercolino T, Canu L, Baroni G, Nesi G, Galli A, Mannelli M, Luconi M. *2D-DIGE Proteomic analysis identifies new potential therapeutic targets for adrenocortical carcinoma*. *Oncotarget*, 2015; in press.
2. Samavat J, Facchiano E, Cantini G, Di Franco A, Alpigiano G, **Poli G**, Seghieri G, Lucchese M, Forti G, Luconi M. *Osteocalcin increase after bariatric surgery predicts androgen recovery in hypogonadal obese males*. *International Journal of Obesity* (2014), 1-7.
3. Pinzani P, Scatena C, Salvianti F, Corsini E, Canu L, **Poli G**, Paglierani M, Piccini V, Pazzagli M, Nesi G, Mannelli M, Luconi M. *Detection of circulating tumor cells in patients with adrenocortical carcinoma: a monocentric study*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Sep;98(9):3731-8.
4. **Poli G**, Guasti D, Rapizzi E, Fucci R, Canu L, Bandini A, Cini N, Bani D, Mannelli M, Luconi M. *Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells*. *Endocrine- Related Cancer*, 2013 Jun 27;20(4):537-50.
5. Baglioni S, Cantini G, **Poli G**, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. *Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell*. *Plos One*, 2012 May;7(5):e36569.
6. Mannelli M, Cantini G, **Poli G**, Mangoni M, Nesi G, Canu L, Rapizzi E, Borgogni E, Ercolino T, Piccini V, Luconi M. *Role of the PPAR- γ system in normal and tumoral pituitary corticotropic cells and adrenal cells*. *Neuroendocrinology*, 2010 Sep; 92 Suppl 1:23-7. Review.

7. Cantini G, Lombardi A, Borgogni E, Francalanci M, Ceni E, Degl'Innocenti S, Gelmini S, **Poli G**, Galli A, Serio M, Forti G, Luconi M. *Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism.* Eur J Cell Biol, 2010 Sep;89(9):645-53.
8. Luconi M, Mangoni M, Gelmini S, **Poli G**, Nesi G, Francalanci M, Pratesi N, Cantini G, Lombardi A, Pepi M, Ercolino T, Serio M, Orlando C, Mannelli M. *Rosiglitazone impairs proliferation of human adrenocortical cancer: preclinical study in a xenograft mouse model.* Endocr Relat Cancer, 2010 Feb 18; 17(1): 169-77.
9. Cantini G, Lombardi A, Piscitelli E, **Poli G**, Ceni E, Marchiani S, Ercolino T, Galli A, Serio M, Mannelli M, Luconi M. *Rosiglitazone Inhibits Adrenocortical Cancer Cell Proliferation by Interfering with the IGF-IR Intracellular Signaling.* PPAR Research, 2008 Jul; 2008: 904041.
10. Antonioli E, Guglielmelli P, **Poli G**, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM. *Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia.* Haematologica. 2008 Jan;93(1):41-48.
11. Antonioli E, Guglielmelli P, **Poli G**, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM. *Polycythemia vera following autologous transplantation for AML: insights on the kinetics of JAK2V617F clonal dominance.* Blood. 2007 Dec 15;110(13):4620-1.
12. Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Ponziani V, **Poli G**, Zini R, Ferrari S, Manfredini R, Bosi A, Vannucchi AM. *MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients.* Exp Hematol. 2007 Nov;35(11):1708-18.

13. Bocchia M., Vannucchi A.M., Gozzetti A., Guglielmelli P., **Poli G.**, Crupi R., Defina M., Bosi A., Lauria F. *Insights into JAK2-V617F mutation in CML*. *Lancet Oncol.* 2007 Oct;8(10):864-6.

2D-DIGE Proteomic analysis identifies new potential therapeutic targets for adrenocortical carcinoma

Giada Poli^{1,*}, Elisabetta Ceni^{2,*}, Roberta Armignacco¹, Tonino Ercolino³, Letizia Canu¹, Gianna Baroni⁴, Gabriella Nesi⁴, Andrea Galli², Massimo Mannelli^{1,5} and Michaela Luconi^{1,5}

¹ Endocrinology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

² Gastroenterology Unit, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Florence, Italy

³ Endocrinology Unit, Careggi Hospital, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Florence, Italy

⁴ Division of Pathological Anatomy, Department of Surgery and Translational Medicine, University of Florence, Florence, Italy

⁵ Istituto Toscano Tumori, Florence, Italy

* These authors equally contributed to the work

Correspondence to: Michaela Luconi, email: michaela.luconi@unifi.it

Massimo Mannelli, email: massimo.mannelli@unifi.it

Keywords: proteomics, cancer metabolism, biomarkers

Received: December 02, 2014

Accepted: January 02, 2015

Published: January 21, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare aggressive tumor with poor prognosis when metastatic at diagnosis. The tumor biology is still mostly unclear, justifying the limited specificity and efficacy of the anti-cancer drugs currently available. This study reports the first proteomic analysis of ACC by using two-dimensional-differential-in-gel-electrophoresis (2D-DIGE) to evaluate a differential protein expression profile between adrenocortical carcinoma and normal adrenal. Mass spectrometry, associated with 2D-DIGE analysis of carcinomas and normal adrenals, identified 22 proteins in 27 differentially expressed 2D spots, mostly overexpressed in ACC. Gene ontology analysis revealed that most of the proteins concurs towards a metabolic shift, called the Warburg effect, in adrenocortical cancer. The differential expression was validated by Western blot for Aldehyde-dehydrogenase-6-A1, Transferrin, Fascin-1, Lamin A/C, Adenylate-cyclase-associated-protein-1 and Ferredoxin-reductase. Moreover, immunohistochemistry performed on paraffin-embedded ACC and normal adrenal specimens confirmed marked positive staining for all 6 proteins diffusely expressed by neoplastic cells, compared with normal adrenal cortex.

In conclusion, our preliminary findings reveal a different proteomic profile in adrenocortical carcinoma compared with normal adrenal cortex characterized by overexpression of mainly metabolic enzymes, thus suggesting the Warburg effect also occurs in ACC. These proteins may represent promising novel ACC biomarkers and potential therapeutic targets if validated in larger cohorts of patients.

INTRODUCTION

Adrenocortical tumors are rather common, with a prevalence of about 9% in the older age, and mostly benign adenomas (ACA). On the other hand, adrenocortical carcinomas (ACC) are rare and aggressive tumors with an incidence of 1-2 cases/million people/year

and poor prognosis (5-year survival rate around 30%) [1-4]. Survival rate drops below 10% when metastasis is found at diagnosis.

In spite of recent studies on the genetics and molecular biology of this neoplasia [5-9], its pathogenesis is still not completely understood: new diagnostic and prognostic biomarkers as potential therapeutic targets are



ORIGINAL ARTICLE

Osteocalcin increase after bariatric surgery predicts androgen recovery in hypogonadal obese males

J Samavat¹, E Facchiano², G Cantini¹, A Di Franco¹, G Alpigiano³, G Poli¹, G Seghieri⁴, M Lucchese², G Forti¹ and M Luconi¹

OBJECTIVE: Bone modulates testis function through osteocalcin (OCN) production. This paper assesses the association between serum OCN and androgen production recovery in morbidly obese males at 9 months after bariatric surgery.

SUBJECTS: A cohort of $n = 103$ obese males with mean \pm s.d. body mass index (BMI) $47.7 \pm 8.2 \text{ kg m}^{-2}$, age 42 ± 11 years, consisting of $n = 76$ patients undergoing gastric bypass and $n = 27$ in the waiting list for surgery.

RESULTS: At 9 months from surgery, a significant increase was observed in mean \pm s.d. total OCN (tOCN = $10.4 \pm 10.3 \text{ ng ml}^{-1}$, $P < 0.001$) and undercarboxylated OCN (ucOCN = $5.4 \pm 3.7 \text{ ng ml}^{-1}$, $P < 0.001$), total testosterone (TT, $5.6 \pm 6.5 \text{ nm}$, $P < 0.001$) and calculated free testosterone (cFT, $0.035 \pm 0.133 \text{ nm}$, $P < 0.006$), sex hormone binding globulin (SHBG, $21.2 \pm 16.7 \text{ nm}$, $P < 0.001$) and decrease in estradiol (E2, $-30.1 \pm 51.9 \text{ pm}$, $P < 0.001$) levels only in operated patients, with a significant reduction in BMI (24%) and waist (20%). A positive correlation existed between tOCN and ucOCN (age-adjustment (age-adj.): $\beta = 0.692$, $P < 0.001$) and their variations (age-adj.: $\beta = 0.629$, $P < 0.001$) after surgery. Multivariate analysis in operated patients showed a significant positive association between variations in tOCN and TT (age-adj.: $\beta = 0.289$, $P = 0.012$), SHBG (age-adj.: $\beta = 0.326$, $P = 0.005$) but not with cFT variation. tOCN, but not luteinizing hormone (LH) variation was the only significant predictive factor of cFT recovery in the hypogonadal (TT $< 12 \text{ nm}$) operated subjects even after age- and BMI-adjustment (adj.: $\beta = 0.582$, $P < 0.05$). cFT improvement was significantly higher when considering operated patients with tOCN increase (0.045 ± 0.123 vs $-0.02 \pm 0.118 \text{ nm}$, $P = 0.015$), hypogonadism (0.059 ± 0.111 vs $-0.059 \pm 0.138 \text{ nm}$, $P = 0.002$) and younger than 35 years (0.102 ± 0.108 vs $-0.019 \pm 0.123 \text{ nm}$, $P = 0.009$).

CONCLUSION: OCN recovery observed after bariatric surgery is significantly associated with cFT improvement independently of BMI variation and age in hypogonadal morbidly obese males.

International Journal of Obesity advance online publication, 14 January 2014; doi:10.1038/ijo.2013.228

Keywords: prospective longitudinal study; osteocalcin; free testosterone; male obesity; bariatric surgery; bone and testis

INTRODUCTION

Sex steroid hormones have a major role in modulating bone remodeling in both sexes.^{1–3} An increasing body of evidence obtained in animal models and in humans suggests a reciprocal control of bone on testis through secretion of the osteoblast-produced peptide hormone, osteocalcin (OCN).^{4–11} Animal models have been previously developed to demonstrate that OCN mediates the skeleton regulation of glucose and lipid metabolism, as mice lacking OCN gene display metabolic dysregulation, with abnormal expansion of visceral adiposity, glucose intolerance, insulin resistance and impaired pancreatic secretion.¹² A positive association between circulating levels of OCN and development of dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes and insulin resistance have been also demonstrated in humans.^{11,14–17} In addition to these endocrine effects displayed as regulator of energy homeostasis, OCN has been recently hypothesized to also promote male fertility through direct stimulation of testosterone production in Leydig cells in the testis.^{4,7} Circulating levels of testosterone, testis weight and sperm production are all factors significantly reduced in knock-out male mouse models of OCN and, conversely, enhanced in Esp knock-out, lacking the phosphatase that inhibits OCN maturation in bone and testis,⁴ suggesting that OCN is involved in the signaling of this novel-discovered bone-testis axis, which can concur with the

pituitary one to regulate male fertility.⁵ OCN is very low in obesity, although this hormone can be produced not only in the bone but also in the adipose tissue.¹⁸ Testosterone is positively associated with OCN in diabetic patients.¹⁹ However, very little is known about the relation between androgens and OCN in humans. Both androgens and OCN are inversely correlated with BMI, and reach abnormal levels in morbid obesity. Massive weight loss obtained by caloric restriction or bariatric surgery resulted in an increase in testosterone levels from one side^{20–24} and in the regularization of bone turnover and OCN production,^{25–27} from the other side. However, the role of OCN variation in stimulating testosterone production in humans has never been investigated so far. The aim of this study was to evaluate the association between serum OCN and androgen production recovery after bariatric surgery in a cohort of morbidly obese males. We postulated that OCN increase after bariatric surgery was significantly associated with testosterone recovery in hypogonadal obese subjects.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The clinic-based survey was performed on a consecutive series of morbidly obese (body mass index, BMI $> 40 \text{ kg m}^{-2}$) patients referring to the bariatric

¹Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Endocrinology Unit, University of Florence, Florence, Italy; ²Bariatric and Metabolic Surgery, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy; ³Servizio di Dietologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy and ⁴Servizio Dietetico, General Hospital, Pistoia, Italy. Correspondence: Professor M Luconi, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Endocrinology Unit, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy.

E-mail: michaela.luconi@unifi.it

Received 23 July 2013; revised 25 November 2013; accepted 26 November 2013; accepted article preview online 5 December 2013

Detection of Circulating Tumor Cells in Patients With Adrenocortical Carcinoma: A Monocentric Preliminary Study

Pamela Pinzani,* Cristian Scatena,* Francesca Salvianti, Elisa Corsini, Letizia Canu, Giada Poli, Milena Paglierani, Valentina Piccini, Mario Pazzagli, Gabriella Nesi, Massimo Mannelli, and Michaela Luconi

Clinical Biochemistry (P.P., F.S., M.Paz.) and Endocrinology (E.C., L.C., G.P., V.P., M.M., M.L.) Units, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence 50139, Italy; Division of Pathological Anatomy (C.S., M.Pag., G.N.), Department of Surgery and Translational Medicine, University of Florence, Florence 50139, Italy; and Istituto Toscano Tumori (M.M.), Florence 50139, Italy

Context: Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy, the prognosis of which is mainly dependent on stage at diagnosis. The identification of disease-associated markers for early diagnosis and drug monitoring is mandatory. Circulating tumor cells (CTCs) are released into the bloodstream from primary tumor/metastasis. CTC detection in blood samples may have enormous potential for assisting in the diagnosis of malignancy, estimating prognosis, and monitoring the disease.

Objective: The aim of the study was to investigate the presence of CTCs in blood samples of patients with ACC or benign adrenocortical adenoma (ACA).

Setting: We conducted the study at a university hospital.

Intervention: CTC analysis was performed in blood samples from 14 ACC patients and 10 ACA patients. CTCs were isolated on the basis of cell size by filtration through ScreenCell devices, followed by identification according to validated morphometric criteria and immunocytochemistry.

Main Outcome Measure: We measured the difference in CTC detection between ACC and ACA.

Results: CTCs were detected in all ACC samples, but not in ACA samples. Immunocytochemistry confirmed the adrenocortical origin. When ACC patients were stratified according to the median value of tumor diameter and metastatic condition, a statistically significant difference was found in the number of CTCs detected after surgery. A significant correlation between the number of CTCs in postsurgical samples and clinical parameters was found for tumor diameter alone.

Conclusions: Our findings provide the first evidence for adrenocortical tumors that CTCs may represent a useful marker to support differential diagnosis between ACC and ACA. The correlation with some clinical parameters suggests a possible relevance of CTC analysis for prognosis and noninvasive monitoring of disease progression and drug response. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 3731–3738, 2013)

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and very aggressive endocrine tumor with a poor prognosis, mainly dependent on tumor stage at diagnosis. Early di-

agnosis followed by surgical tumor removal, possibly associated to adjuvant mitotane therapy (1), has been proven as the best option for ACC treatment. The mean

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2013 by The Endocrine Society
Received February 14, 2013. Accepted June 26, 2013.
First Published Online July 8, 2013

* P.P. and C.S. contributed equally to the work.
Abbreviations: ACA, adrenocortical adenoma; ACC, adrenocortical carcinoma; CTC, circulating tumor cell; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; SF-1, steroidogenic factor 1; TBS, Tris-buffered saline.

Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells

Giada Poli¹, Daniele Guasti², Elena Rapizzi¹, Rossella Fucci¹, Letizia Canu¹,
Alessandra Bandini³, Nicoletta Cini³, Daniele Bani², Massimo Mannelli^{1,4}
and Michaela Luconi¹

¹Endocrinology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, and ²Research Unit of Histology and Embryology, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy

³Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy

⁴Istituto Toscano Tumori, 50139 Florence, Italy

Correspondence
should be addressed
to M Luconi
Email
michaela.luconi@unifi.it

Abstract

At present, mitotane (MTT) represents the first-line pharmacological approach for the treatment of advanced adrenocortical carcinoma (ACC). Despite clear evidence that the drug can reduce the clinical signs of steroid excess in secreting ACC, the mechanism mediating the possible toxic effect of MTT on tumor cells still remains obscure. This study investigated the intracellular events underlying the toxic effect of MTT by studying qualitative and quantitative alterations in mitochondrial morphology and functions in human adrenocortical cancer cell lines, H295R and SW13. Increasing concentrations of MTT resulted in rapid intracellular accumulation and conversion of the drug. Cytostatic and cytotoxic effects were evident at doses corresponding to the therapeutic window (30–50 μ M) through an apoptotic mechanism involving caspase 3/7. Electron microscopic analysis of cell mitochondria displayed MTT-induced dose- and time-dependent alterations in the morphology of the organelle. These alterations were characterized by a marked swelling and a decrease in the number of respiratory cristae, accompanied by a significant depolarization of the mitochondrial membrane potential, finally leading to the disruption of the organelle. A drastic reduction of oxygen consumption was observed due to mitochondrial membrane damage, which was accompanied by a decrease in the levels of VDAC1 integral membrane channel. These findings contribute to better understand the intracellular mechanism of action of MTT in ACC cells, showing that its cytotoxic effect seems to be mainly mediated by an apoptotic process activated by the disruption of mitochondria.

Key Words

- ▶ adrenal cortex
- ▶ carcinoma
- ▶ intracellular signalling

Endocrine-Related Cancer
(2013) 20, 537–550

Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and aggressive endocrine tumor with an incidence of 0.5–2 cases per million people every year. ACC prognosis is mainly

dependent on the stage at diagnosis (Fassnacht *et al.* 2009), with the overall 5-year survival rate being drastically reduced from 35% (Allolio & Fassnacht 2006) to

Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell

Silvana Baglioni^{1,3}, Giulia Cantini^{1,3}, Giada Poli¹, Michela Francalanci¹, Roberta Squecco², Alessandra Di Franco¹, Elisa Borgogni¹, Salvatore Frontera¹, Gabriella Nesi³, Francesco Liotta⁴, Marcello Lucchese⁵, Giuliano Perigli⁶, Fabio Francini², Gianni Forti¹, Mario Serio¹, Michaela Luconi^{1*}

1 Endocrine Unit, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence, Italy, **2** Department of Physiological Sciences, University of Florence, Florence, Italy, **3** Department of Human Pathology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy, **4** Department of Internal Medicine, University of Florence, Florence, Italy, **5** General and Vascular Surgery, ADU Careggi, Florence, Italy, **6** Department of General Surgery, University of Florence, Florence, Italy

Abstract

Metabolic pathologies mainly originate from adipose tissue (AT) dysfunctions. AT differences are associated with fat-depot anatomic distribution in subcutaneous (SAT) and visceral omental (VAT) pads. We address the question whether the functional differences between the two compartments may be present early in the adipose stem cell (ASC) instead of being restricted to the mature adipocytes. Using a specific human ASC model, we evaluated proliferation/differentiation of ASC from abdominal SAT-(S-ASC) and VAT-(V-ASC) paired biopsies in parallel as well as the electrophysiological properties and functional activity of ASC and their *in vitro*-derived adipocytes. A dramatic difference in proliferation and adipogenic potential was observed between the two ASC populations, S-ASC having a growth rate and adipogenic potential significantly higher than V-ASC and giving rise to more functional and better organized adipocytes. To our knowledge, this is the first comprehensive electrophysiological analysis of ASC and derived-adipocytes, showing electrophysiological properties, such as membrane potential, capacitance and K⁺-current parameters which confirm the better functionality of S-ASC and their derived adipocytes. We document the greater ability of S-ASC-derived adipocytes to secrete adiponectin and their reduced susceptibility to lipolysis. These features may account for the metabolic differences observed between the SAT and VAT. Our findings suggest that VAT and SAT functional differences originate at the level of the adult ASC which maintains a memory of its fat pad of origin. Such stem cell differences may account for differential adipose depot susceptibility to the development of metabolic dysfunction and may represent a suitable target for specific therapeutic approaches.

Citation: Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, et al. (2012) Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. PLoS ONE 7(5): e36569. doi:10.1371/journal.pone.0036569

Editor: Jeffrey M. Gimble, Pennington Biomedical Research Center, United States of America

Received: July 18, 2011; **Accepted:** April 10, 2012; **Published:** May 4, 2012

Copyright: © 2012 Baglioni et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Ente Cassa di Risparmio di Firenze and the Ente Cassa di Risparmio di Pistoia e Pescia to M. Luconi. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: m.luconi@dfc.unifi.it

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Metabolic pathologies can originate from white adipose tissue dysfunctions. This organ can no longer be referred to as a mere energy storage site since it has been demonstrated to also display pivotal endocrine functions through the secretion of specific hormones called adipokines. Functional differences in the adipose tissue and the impact of its dysfunction on metabolism is associated with the regional distribution of fat depots, in particular subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues [1]. Epidemiological studies highlighted that VAT accumulation associates with an increased metabolic risk and overall mortality [2,3], whereas SAT expansion ameliorates insulin sensitivity and decreases type 2 diabetes risk [4]. Notably, in the mouse, SAT rather than VAT transplantation in either subcutaneous or visceral depots decreases circulating insulin and glucose levels, resulting in an improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity [5,6], suggesting that adipose tissue depots maintain an intrinsic memory of their site of origin.

Human adult adipose stem cell (ASC) populations have recently been characterized in parallel by paired biopsies from subcutaneous (S-ASC) and visceral omental (V-ASC) adipose tissue [7], representing a valuable cell model for the *in vitro* study of early events and processes occurring in the adipose tissue from different anatomical sites. Differences in gene expression and biological responses have been described in adipocytes and preadipocytes of the two adipose compartments [8–11]. In the present study, by the use of this specific model of human adult ASC cultures obtained from paired abdominal SAT and VAT biopsies, we address the question whether the functional differences observed between these tissues may be present early in the adipose stem cell which retains the memory of its fat pad of origin. In particular, we compare morphologic properties, proliferation activity, and adipogenic potential of the paired ASC populations and the functional properties of their *in vitro*-derived adipocytes. Previous electrophysiological studies have shown that preadipocytes and adipocytes express K⁺ channels [12,13] and increasing evidence has pointed toward a functional relationship

Role of the PPAR- γ System in Normal and Tumoral Pituitary Corticotrophic Cells and Adrenal Cells

Massimo Mannelli^a Giulia Cantini^a Giada Poli^a Monica Mangoni^a
Gabriella Nesi^b Letizia Canu^a Elena Rapizzi^a Elisa Borgogni^a Tonino Ercolino^a
Valentina Piccini^a Michaela Luconi^a

^aDepartments of Clinical Physiopathology and ^bHuman Pathology and Oncology, DENOTHE Center of Excellence for Research, Transfer and High Education, University of Florence and Istituto Toscano Tumori, Florence, Italy

Key Words

Glitazones · Pituitary · Cushing's disease · Adrenal cancer

Abstract

PPAR- γ is a member of the nuclear hormone receptor superfamily of transcription factors, whose thiazolidinedione ligands (TZD) have been recently demonstrated to also possess anticancer properties in addition to their well-known insulin-sensitizer and glucose/lipid regulation activity. In this minireview, we summarize the current knowledge on PPAR- γ in normal and tumoral corticotrophic pituitary and adrenal cells. The receptor expression has been shown in ACTH-secreting cells in both normal and adenoma pituitary as well as in normal and tumor adrenal cortex. Preclinical studies conducted both in vitro on tumor cells and in vivo on xenograft tumor models obtained by subcutaneous injection of cancer cells have evidenced the anticancer properties of TZD, in particular rosiglitazone (RGZ) and pioglitazone (PIO). In both pituitary and adrenocortical cancer, RGZ treatment results in inhibition of cell proliferation, through G0/G1 cell-cycle arrest and induction of cell apoptosis, leading to sig-

nificant inhibition of tumor growth in the xenograft tumor models. In addition, since RGZ can reduce ACTH and corticosterone secretion in mouse corticotrophic pituitary tumors, both RGZ and PIO have been used in the treatment of Cushing's disease with variable but generally unsatisfactory results. Discrepancies in the antitumor effects of TZD observed between successful preclinical and unsuccessful clinical studies may be particularly due to differences in treatment duration and doses used.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

PPAR- γ is a member of the nuclear hormone receptor superfamily of transcription factors, widely expressed in the organism, including adipose, vascular and immune cells.

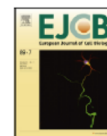
Besides its well-known role in the regulation of metabolism, PPAR- γ has also recently emerged as a key regulator of inflammatory and immune responses [1] as well as of proliferation, differentiation and apoptosis in nor-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
0028-3835/10/0925-0023\$26.00/0
Accessible online at:
www.karger.com/nen

Massimo Mannelli
Department of Clinical Pathophysiology, University of Florence
Viale Pieraccini 6
IT-50139 Florence (Italy)
Tel. +39 055 427 1428, Fax +39 055 422 1931, E-Mail m.mannelli@dfc.unifi.it



Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism

Giulia Cantini, Adriana Lombardi, Elisa Borgogni, Michela Francalanci, Elisabetta Ceni, Selene Degl'Innocenti, Stefania Gelmini, Giada Poli, Andrea Galli, Mario Serio, Gianni Forti, Michaela Luconi*

DENoThe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education, Dept. of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence 50139, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2010
Received in revised form 24 March 2010
Accepted 7 April 2010

Keywords:

MAPK
extranuclear effects
glitazones
cytokines

ABSTRACT

Besides their well-known anti-diabetic effects, the peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) thiazolidinedione ligands (TZD) have been suggested to also display anti-inflammatory properties. The receptor role in mediating such effects is far from being elucidated. Here, we demonstrated that PPAR γ is necessary for TZD to interfere with TNF α and IFN γ inflammatory activity in human endothelial cells. Different PPAR γ ligands similarly inhibit cytokine stimulation of IFN γ -inducible-protein-of-10-kDa (IP10) secretion in a dose-dependent manner and prevent the induced phosphorylation/activation of extracellular-signaling-regulated-kinases (ERK1/2). To further confirm the PPAR γ role in mediating both rapid and long term anti-inflammatory effects of its ligands, we evaluated RGZ inhibitory action in PPAR γ -silenced and -overexpressing cells. PPAR γ -silencing results in a reversion of RGZ inhibitory activity on cyto/chemokine secretions and rapid ERK phosphorylation. Conversely, receptor overexpression significantly increases RGZ inhibitory activity. Finally, PPAR γ -overexpression results in a reduction of ERK1/2 phosphorylation and inflammatory secretions in response to TNF α and IFN γ even in the absence of RGZ, suggesting a restraining effect controlled by endogenous ligands.

In conclusion, our data provide the first evidence that PPAR γ is involved in the anti-inflammatory action of TZD in endothelial cells, not only by modulating cyto/chemokine secretions but also by restraining ERK activation through a novel rapid nongenomic mechanism.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) belongs with the other members of PPARs to the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors. It is widely expressed in the organism where it plays a pivotal role in the metabolic control through stimulating insulin sensitivity, glucose-lowering and lipid uptake and storage in peripheral organs (Giannini et al., 2004). In particular, PPAR γ is the key regulator of adipogenesis and adipocyte metabolism (Tontonoz and Spiegelman, 2008). The endogenous ligands of PPAR γ are still far to be characterized, although some fatty acids and derivatives of eicosanoids and prostaglandins have been described to bind the receptor. Conversely, a number of high affinity pharmacological ligands, in particular the thiazolidinediones (TZD) such as rosiglitazone (RGZ) and pioglitazone (PIO), have been developed for their ability to ameliorate insulin response and glu-

cose tolerance in type 2 diabetes patients. Besides their effects as anti-diabetic drugs, TZD have recently emerged to also exert anti-inflammatory and anti-atherosclerotic actions (Daynes and Jones, 2002). In particular, RGZ and PIO interfere with pro-inflammatory activation of endothelial cells through inhibition of inflammatory cyto/chemokine secretions as well as of expression of adhesion molecules (Marx and Walcher, 2007; Hetzel et al., 2005; Ramirez et al., 2008; Lombardi et al., 2008), blocking trans-endothelial migration of inflammatory cells (Duan et al., 2008).

Ligand activated-PPAR γ acts as a transcription factor stimulating expression of target genes containing the specific receptor responsive element PPRE. This transcription transactivating mechanism seems to be mainly involved in the metabolic regulation exerted by PPAR γ . Conversely, the anti-inflammatory effects of TZD have been claimed to be independent of the presence of the receptor or be mainly sustained by a transrepression mechanism, by which the activated PPAR γ interferes with the activity of pro-inflammatory transcription factors, such as NF κ B and STAT (Luconi et al., 2009). In particular, besides the very well described DNA binding activity of PPAR γ , the ability of the receptor to directly

* Corresponding author. Tel.: +39 055 4271369; fax: +39 055 4271371.
E-mail address: m.luconi@dfc.unifi.it (M. Luconi).

Rosiglitazone impairs proliferation of human adrenocortical cancer: preclinical study in a xenograft mouse model

Michaela Luconi¹, Monica Mangoni¹, Stefania Gelmini¹, Giada Poli¹, Gabriella Nesi², Michela Francalanci¹, Nicola Pratesi¹, Giulia Cantini¹, Adriana Lombardi¹, Monica Pepi², Tonino Ercolino¹, Mario Serio¹, Claudio Orlando¹ and Massimo Mannelli¹

Departments of ¹Clinical Physiopathology and ²Human Pathology and Oncology, DENOthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education, University of Florence, Viale Pieraccini 6, Florence 50139, Italy

(Correspondence should be addressed to M Luconi; Email: m.luconi@dfc.unifi.it)

Abstract

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare aggressive tumor with a poor prognosis. The lack of a specific and effective medical treatment is due to the poor knowledge of the mechanisms underlying tumor growth. Research on potential drugs able to specifically interfere with tumor proliferation is essential to develop more efficacious therapies. We evaluated for the first time the *in vivo* effect of rosiglitazone (RGZ), an anti-diabetic drug with *in vitro* anti-tumor properties, on ACC proliferation in a xenograft model obtained by s.c. injection of human ACC H295R cells in athymic mice. When the tumor size reached 5 mm, animals were allocated to 5 mg/kg RGZ- or water-treated groups. Tumor volume was measured twice a week. A significant reduction of tumor growth in RGZ versus control (control) group was observed and was already maximal following 17 day treatment (1 – T/C = 75.4% (43.7–93.8%)). After 31 days of treatment, mice were killed and tumor analyzed. Tumor histological evaluation revealed characteristics of invasiveness, richness in small vessels and mitotic figures in control group, while RGZ group tumors presented non infiltrating borders, few vessels, and many apoptotic bodies. Tumor immunohistochemistry showed that Ki-67 was reduced in RGZ versus control group. Quantitative real-time RT-PCR demonstrated a significant reduction in the expression of angiogenic (VEGF), vascular (CD31), proliferation (Bcl-1), and anti-apoptotic (Bcl-2) genes in RGZ versus control group tumors. The same inhibitory effects were confirmed in *in vitro* RGZ-treated H295R. Our findings support and expand the role of RGZ in controlling ACC proliferation and angiogenesis *in vivo* and *in vitro*.

Endocrine-Related Cancer (2010) 17 169–177

Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare (1.4×10^6 annual estimated incidence) and aggressive endocrine tumor with a poor prognosis, generally characterized by a limited response to radio/chemotherapy (Allolio & Fassnacht 2006). At present, early diagnosis followed by total surgical tumor resection is the only valuable option for ACC cure. Prognosis depends on the tumor stage at surgery – mean survival rate at 5 years is 16–38% (Allolio & Fassnacht 2006); however, metastatic disease reduces survival to <10% (Fassnacht *et al.* 2009). The lack of a specific and effective medical regimen is due to the poor

knowledge of the mechanisms underlying malignant tumor transformation and progression. Mitotane is the only pharmacological adjuvant treatment available for ACC in advanced disease (Luton *et al.* 1990, Terzolo *et al.* 2007), and its combination with other chemotherapeutic drugs has led to variable results (Khan *et al.* 2000, Berruti *et al.* 2005). However, its effects are mainly due to its adrenocortical cytotoxicity. Thus, the development of new efficacious and less toxic drugs, specific for ACC, to be eventually combined with mitotane (Barlaskar *et al.* 2009) are required.

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ is a ligand-activated transcription factor,

Research Article

Rosiglitazone Inhibits Adrenocortical Cancer Cell Proliferation by Interfering with the IGF-IR Intracellular Signaling

Cantini Giulia,¹ Lombardi Adriana,¹ Piscitelli Elisabetta,¹ Giada Poli,¹ Ceni Elisabetta,² Marchiani Sara,³ Ercolino Tonino,¹ Galli Andrea,² Serio Mario,¹ Mannelli Massimo,¹ and Luconi Michaela¹

¹ DENOthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Sections of Endocrinology, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy

² DENOthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Sections of Gastroenterology, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy

³ DENOthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Sections of Andrology, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy

Correspondence should be addressed to Mannelli Massimo, m.mannelli@dfc.unifi.it

Received 11 March 2008; Revised 21 May 2008; Accepted 9 June 2008

Recommended by Dipak Panigrahy

Rosiglitazone (RGZ), a thiazolidinedione ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , has been recently described as possessing antitumoral properties. We investigated RGZ effect on cell proliferation in two cell line models (SW13 and H295R) of human adrenocortical carcinoma (ACC) and its interaction with the signaling pathways of the activated IGF-I receptor (IGF-IR). We demonstrate a high expression of IGF-IR in the two cell lines and in ACC. Cell proliferation is stimulated by IGF-I in a dose- and time-dependent manner and is inhibited by RGZ. The analysis of the main intracellular signaling pathways downstream of the activated IGF-IR, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt, and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) cascades reveals that RGZ rapidly interferes with the Akt and ERK1/2 phosphorylation/activation which mediates IGF-I stimulated proliferation. In conclusion, our results suggest that RGZ exerts an inhibitory effect on human ACC cell proliferation by interfering with the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways downstream of the activated IGF-IR.

Copyright © 2008 Cantini Giulia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. INTRODUCTION

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare tumor with an incidence of approximately 1-2 millions of the population per year. ACC is a very aggressive tumor, characterized by a poor prognosis: approximately 50% of patients do not survive beyond 2 years from the diagnosis and the 5-year mortality rate is around 80% [1]. Its poor prognosis depends mainly upon the limited therapeutic resources. At present, a complete surgical removal following an early diagnosis is the only valuable option for the tumor's cure. Moreover, other than improved surgical management, the prognosis for ACC has not changed significantly over the past three decades [2]. The tumor is, in fact, resistant to radio- and chemotherapy and medical treatment very rarely leads to a complete remission in the case of recurrences or metastatic spread. Although several new medical therapeutic options have been recently proposed [3], at present the medical

treatment of advanced ACC is far from being satisfactory, due to our poor knowledge of the molecular mechanisms leading to malignant transformation of adrenocortical cells. In fact, although some intracellular signaling pathways have been shown to be altered in ACC cells [4], efforts to identify the events leading to neoplastic transformation and tumor invasiveness have met with limited success. The role of IGF-I system in mediating proliferation and progression has been well documented in several cancers, including adrenocortical carcinoma [5]. In particular, ACC, as well as the H295R cell line [6], overexpress both IGF-II [7] and its promiscuous receptor IGF-IR [8] in comparison to adrenal adenomas and normal adrenal tissue. The overexpressed IGF-II is thought to act in a paracrine fashion through the IGF-IR to sustain tumor and cell proliferation [6, 9, 10].

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ is a ligand-activated transcription factor and a member of the nuclear hormone receptors superfamily. Thiazolidinediones



Influence of $JAK2^{V617F}$ allele burden on phenotype in essential thrombocythemia

Elisabetta Antonioli, Paola Guglielmelli, Giada Poli, Costanza Bogani, Alessandro Pancrazzi, Giovanni Longo, Vanessa Ponziani, Lorenzo Tozzi, Lisa Pieri, Valeria Santini, Alberto Bosi, and Alessandro M. Vannucchi, for the Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPD-RC)

Department of Hematology, University of Florence, Florence, Italy; and the MPD-RC, Mount Sinai Hospital, New York, USA

Funding: this study was supported by Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Milano; Ente Cassa di Risparmio di Firenze; and MIUR (COFIN 2006067001_003) grants to AMV. AP was the recipient of a fellowship from the Associazione Italiana per le Leucemie, Firenze.

The project described was supported by grant number P01CA108671 from the National Cancer Institute. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Cancer Institute or the National Institute of Health.

Manuscript received April 26, 2007
Manuscript accepted September 5, 2007.

Correspondence:
Alessandro M. Vannucchi,
Department of Hematology,
University of Florence, 50134
Florence, Italy.
E-mail: amvannucchi@unifi.it

ABSTRACT

Background

Fifty to sixty percent of patients with essential thrombocythemia harbor the $JAK2^{V617F}$ mutation. The impact of this mutation on clinical phenotype is still debated. The aim of this study was to evaluate possible correlations between $JAK2^{V617F}$ mutant allele burden and both clinical presentation and hematologic abnormalities in essential thrombocythemia patients.

Design and Methods

In this single-center retrospective study, $JAK2^{V617F}$ allele load was measured by sensitive quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in the granulocytes of 260 patients diagnosed as having essential thrombocythemia according to WHO criteria.

Results

Median $V617F$ allele burden in patients with the mutation ($n=165$, 63.4%) was 24%, ranging from 1% to 87%; an allele burden greater than 51% was found in 5% of the patients. Older patients presented progressively higher percentages of the $V617F$ allele. Signs of stimulated erythropoiesis and myelopoiesis, as well as higher $PRV-1$ levels, were found in patients with the mutation, but no linear correlation with load of mutant allele could be ascertained; on the other hand, the frequency of patients with erythropoietin-independent erythroid colonies progressively increased depending on mutant allele load. Splenomegaly and microvessel symptoms were significantly more represented among patients with greater than 50% and 25% $JAK2^{V617F}$ allele burden, respectively. Increasing mutant allele load correlated with higher frequency of arterial thrombosis at diagnosis, as confirmed also in multivariate analysis; the relative risk was 3.0 (95% CI 1.3-6.8; $p=0.01$) in patients having a greater than 25% mutant allele burden.

Conclusions

The $JAK2^{V617F}$ mutant allele burden contributes to determining the clinical phenotype in patients with essential thrombocythemia.

Key words: $JAK2^{V617F}$, allele burden, essential thrombocythemia, phenotype

Citation: Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM. Influence of $JAK2^{V617F}$ allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008 Jan; 93(1):41-48.
DOI: 10.3324/haematol.11653

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

From www.bloodjournal.org at BIBLIOTECA BIOMEDICA on December 5, 2007. For personal use only.

blood

2007 110: 4620-4621
doi:10.1182/blood-2007-07-103267

Polycythemia vera following autologous transplantation for AML: insights on the kinetics of JAK2V617F clonal dominance

Elisabetta Antonioli, Paola Guglielmelli, Giada Poli, Valeria Santini, Alberto Bosi and Alessandro M. Vannucchi

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/110/13/4620>

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

To the editor:

Polycythemia vera following autologous transplantation for AML: insights on the kinetics of JAK2V617F clonal dominance

A JAK2V617F mutation is harbored by most patients with polycythemia vera (PV) and has pathogenetic¹ and diagnostic² relevance. We used this molecular marker to trace origin of disease in a case of PV manifested 5 years after autologous transplantation for acute myeloid leukemia (AML).

A 60-year-old man was diagnosed as having AML, M2 FAB subtype with normal karyotype, in January 1999. Complete remission was obtained after induction chemotherapy with fludarabine, cytarabine, and idarubicin, followed by consolidation with idarubicin and etoposide. He was conditioned with oral busulphan and cyclophosphamide and reinfused with 4.3×10^6 /kg peripheral blood (PB)-primed C34⁺ cells in December 1999. Clinical and hematologic follow-up, and bone marrow (BM) biopsies performed yearly thereafter, were unremarkable until March 2006, when he reported pruritus after hot showers, visual disturbance, and paresthesia of a few months' duration. Spleen was palpable, white blood cell count (WBC) was 6.1×10^9 /L; Hb, 187 g/L (18.7 g/dL); platelet count, 517×10^9 /L; LDH, 558 U/L; serum ferritin, 10 ng/mL; and erythropoietin 7.6 U/L; endogenous erythroid colonies were present, and karyotype was normal. BM biopsy showed increased cellularity with panmyelosis, prominent erythroid, and megakaryocytic proliferation; JAK2V617F mutation was found,³ and diagnosis of PV was established.

Archived BM or PB samples were analyzed for V617F mutation with quantitative polymerase chain reaction (PCR; sensitivity, < 1%; interassay, $\leq 3\%$).⁴ Leukemic blasts at diagnosis, BM cells at remission, and leukapheresis were all V617F negative. A 20% V617F allele burden was first detected in BM aspirate 4 years after transplantation and it was 25% 1 year later (May 2005); ad hoc revision of both biopsies failed to satisfy criteria for PV.⁵ At diagnosis, granulocyte V617F allele burden was 28% (Figure 1).

Although the patient's JAK2 genotype before AML was unknown, normal hematologic parameters 1 year before would exclude a V617F-negative AML transformed from preexisting, unrecognized, V617F-positive PV.⁶ A JAK2V617F-positive essential thrombocythemia after transplantation for AML has also been reported.⁷

Availability of sequential samples after AML diagnosis allowed us to trace emergence of mutant clone and to correlate it with disease manifestation. In this patient, the target cell for JAK2V617F mutation was most likely a reinfused hematopoietic stem cell (HSC) that had been exposed to chemotherapy for AML. The time interval between transplantation and appearance of V617F allele was 4 years; of note, this interval is similar to that in a case of PV that developed after chemotherapy for Hodgkin disease⁸ and significantly shorter than the 10 to 20 years reported in nuclear explosion exposure.⁹ Stochastic calculation of the kinetics of clonal



MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients

Paola Guglielmelli^a, Lorenzo Tozzi^a, Alessandro Pancrazzi^a, Costanza Bogani^a,
Elisabetta Antonioli^a, Vanessa Ponziani^a, Giada Poli^a, Roberta Zini^b, Sergio Ferrari^b, Rossella
Manfredini^b, Alberto Bosi^a, and Alessandro M. Vannucchi^a for the MPD Research Consortium^c

^aDepartment of Hematology, University of Florence, Florence, Italy; ^bDepartment of Biomedical
Sciences, Biological Chemistry Section, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy;
^cMyeloproliferative Disorders Research Consortium, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY., USA

(Received 30 April 2007; revised 30 July 2007; accepted 14 August 2007)

Objective. Expression profiling of microRNA (miRNA) was performed in granulocytes isolated from patients with primary myelofibrosis (PMF), with the aim of identifying abnormally expressed miRNAs in comparison with normal subjects or patients with polycythemia vera (PV) or essential thrombocythemia (ET).

Patients and Methods. Using stem loop–primed reverse transcription and TaqMan quantitative real-time polymerase chain reaction, the expression of 156 mature miRNAs was evaluated using pooled granulocytes from PMF patients, either wild-type or *JAK2*^{617V>F} mutant with >51% allele burden, and control subjects. Differentially expressed miRNAs were then validated on additional control and PMF samples, and also on PV or ET granulocytes.

Results. There was a global downregulation of miRNA expression in PMF granulocytes; 60 miRNAs, of 128 called *present*, displayed differential expression compared to normal samples. Twelve miRNAs, which had been selected based on statistically different expression level, were finally validated. In PMF granulocytes, levels of *miR-31*, *-150*, and *-95* were significantly lower, while those of *miR-190* significantly greater, than control and PV or ET samples; on the other hand, *miR-34a*, *-342*, *-326*, *-105*, *-149*, and *-147* were similarly reduced in patients with PMF, PV, or ET compared to controls. Increased expression of *miR-182* and *-183* correlated with *JAK2*^{617V>F} allele burden. Three in silico–predicted putative target genes (*DTR*, *HMG2*, and *MYB*), showed deregulated expression in PMF granulocytes that correlated with expression level of regulatory miRNA.

Conclusions. A defined miRNA profile distinguishes PMF granulocytes from those of normal subjects and, partially, also from PV or ET patients. © 2007 ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc.

Primary myelofibrosis (PMF) [1] is a clonal disorder of a hematopoietic multipotent stem cell included in the Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders (MPD), together with polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) [2]. PMF is characterized by extensive proliferation of abnormal megakaryocytes, which accumulate in the bone marrow (BM);

development of BM fibrosis and eventually osteosclerosis; constitutive release of hematopoietic progenitor cells and their accumulation in peripheral blood with extramedullary hematopoiesis; and a leukoerythroblastosis picture [3].

The *617Val>Phe* mutation in exon14 of *JAK2* represented the first reliable molecular marker of PMF [4–6]; however, unlike in PV, where the percentage of *JAK2*-mutant patients is ≈95%, only 50% to 60% of PMF patients are mutated, although this figure goes up to almost 100% in post-polycythemic/post-thrombocytopenic myelofibrosis. More recently, *MPL* mutations (*515W>L* and/or *515W>K*) have been detected in 5% of patients with

Offprint requests to: Alessandro M. Vannucchi, M.D., Department of Hematology, University of Florence, Viale Morgagni 85, 50134 Florence, Italy; E-mail: amvannucchi@unifi.it

importance to uncover bi-clonal proliferations, as presented by Krämer and colleagues,³ and other groups.⁵⁻⁷ Furthermore, histopathological signs of myeloproliferation might precede clinical symptoms of myeloproliferative disorder.

The Philadelphia-chromosome anomaly⁸ and the JAK2-V617F mutation⁹ might be secondary to yet unknown initial stem-cell defects that induce clonal haematopoiesis. The patient studied by Krämer's group³ and the previously published findings^{5,7,10} suggest that, in rare cases, two different subclones might evolve from the same clonal haematopoietic proliferation. The BCR-ABL junction might be acquired by a previously diagnosed Ph- CMPD,¹⁰ but in three patients, an antecedent Ph- CMPD^{13,6} had not been evident. To our knowledge, only one case study has been published in which the BCR-ABL clone did not outgrow the pre-existing Ph- CMPD.⁷ In all other published cases studies with co-existing aberrations, the BCR-ABL-positive clone dominated the JAK2-V617F clone, which needed suppression, induced by imatinib mesylate, of the competing clone to become clinically manifest.^{13,7} The emergence of a previously unknown JAK2-V617F-positive CMPD might be mistaken as treatment failure in patients with CML who have been treated with imatinib mesylate, unless the JAK2-V617F-positive disease is diagnosed by bone-marrow histology combined with molecular testing.

Guntram Bösche, Kais Hussein, Oliver Bock, *Hans Kreipe
 Institute of Pathology, Hannover Medical School, 30625
 Hannover, Germany
 Kreipe.Hans@MH-Hannover.de

OB and HK have received research grants from Deutsche Krebshilfe, 10-2191, and Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG BO 1954/3-1.

- 1 Krämer A, Reiter A, Kruth J, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 658-60.
- 2 James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 3144-48.
- 3 Bösche G, Hehlmann R, Hecker H, et al. Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukaemia—prospective long-term results from a randomised-controlled trial. *Leukemia* 2003; 17: 2444-53.
- 4 Bösche G, Freund M, Hehlmann R, et al. Treatment intensity significantly influencing fibrosis in bone marrow independently of the cytogenetic response: meta-analysis of the long-term results from two prospective controlled trials on chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2004; 18: 1450-57.
- 5 Hussein K, Bock O, Seegens A, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood* 2007; 109: 4106-07.

- 6 Inami M, Inokuchi K, Okabe M, et al. Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 1103-04.
- 7 Bornhäuser M, Mohr B, Oelschlaegel U, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia* 2007; 21: 1824-26.
- 8 Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RL, Hansen JA. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1981; 58: 158-63.
- 9 Kralovic R, Tso SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 1377-80.
- 10 Haq AU. Transformation of polycythemia vera to Ph-positive chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol* 1990; 35: 110-13.

Krämer and colleagues³ recently reported on a patient with BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia (CML) which later evolved into a JAK2-V617F-positive myelofibrosis; retrospective assessment of stored blood samples showed that JAK2 mutation was already present at the time of the diagnosis of CML. Findings of a V617F-allele burden during a 6-year disease course, as opposed to the rapid disappearance of BCR-ABL transcript after imatinib treatment, led the researchers to postulate that BCR-ABL had occurred in a pre-existing JAK2-V617F mutant clone; however, the group did not have experimental evidence of this speculation.

We treated CML in a patient with a 16 year-long history of polycythemia vera in whom we had the opportunity to study both JAK2-V617F and BCR-ABL at the single haemopoietic progenitor cell level. In 1990, a 43 year-old man was diagnosed with polycythemia vera, and phlebotomy has been done routinely since then. In 2000, he was assessed in our centre for the first time and polycythemia vera was confirmed. At that time, cytogenetic analysis showed presence of an add18q due to a t(9;18)(p10;q10) by fluorescent in-situ hybridisation (FISH) analysis, resulting in an extra copy of chromosome 9p in 17 of 20 metaphases from bone-marrow cells; few reports of this abnormality exist, and they are mostly associated with polycythemia vera.² Cytogenetics, FISH, and molecular analysis excluded a Philadelphia chromosome. The patient continued phlebotomies until December, 2006, when his white blood cell counts suddenly increased to 100x10⁹/L, his spleen markedly enlarged, and his haematocrit concentration dropped to 36%. Cytogenetics showed 46,XY, t(9;22)(q34;q11) in 27 of 30 metaphases and 46,XY, der(t9;18)(p10;q10) in the remaining three metaphases. Allele-specific PCR

<http://oncology.thelancet.com> Vol 8 October 2007

few months, several reports of Philadelphia-positive CML in the context of JAK2-V617F mutation-positive chronic myeloproliferative disorders have been described.^{1,3,5,6} Our case provides direct evidence that both JAK2-V617F mutation and the BCR-ABL transcript might co-exist in the same progenitor cell.

Monica Bocchia, Alessandro M Vannucchi,
 *Alessandro Gozzetti, Paola Guglielmelli, Giada Poli,
 Rosaria Crupi, Marzia Defina, Alberto Bosi, Laura Francesco
 Department of Hematology, Siena University, Italy (BM, GA, CR,
 DM, LF), and Department of Hematology, University of Florence,
 Florence, Italy (VAM, PG, GP, AB)
 gozzetti@unisi.it

The authors declared no conflicts of interest.

- 1 Krämer A, Reiter A, Kruth J, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 658-60.
- 2 Larsen T, Hasselbalch H, Pallisgaard N, Kærndrup GB. A der(18)t(9;18)(p13;p11) and a der(9;18)(p10;q10) in polycythemia vera associated with a hyperproliferative phenotype in transformation to postpolycythemic myelofibrosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 172: 107-12.
- 3 Bornhäuser M, Mohr B, Oelschlaegel U, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia* 2007 21: 1824-26.
- 4 Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMM1, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3370-73.
- 5 Inami M, Inokuchi K, Okabe M, et al. Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Leukemia* 2007; 21: 1103-04.
- 6 Hussein K, Bock O, Seegens A, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood* 2007; 109: 4106-07.

RINGRAZIAMENTI

Dietro il lavoro di questa tesi ci sono veramente tante persone che, in maniera diversa, hanno contribuito al raggiungimento di questo traguardo.

In primis vorrei ringraziare il Prof. Mannelli e la Prof. Luconi, che ormai sette anni fa mi hanno accolta in laboratorio, hanno creduto in me e nelle mie capacità, incoraggiandomi e sostenendomi: grazie a loro ho raggiunto risultati di grande soddisfazione oltre ad una inaspettata fiducia in me stessa...sono riusciti a portarmi su un palco internazionale nonostante la mia zoppicante padronanza dell'inglese!!!

Senza il supporto del lab le giornate sarebbero state senz'altro molto grigie!

Ringrazio Giulia e Alessandra, che mi sono accanto dal giorno del mio ingresso in laboratorio, e con le quali ho condiviso veramente tanti bei momenti, da quelli più seri e costruttivi, a quelli di follia totale...e il bello del rapporto che si è creato è che non si è limitato all'ambito lavorativo, ma è diventato un rapporto di amicizia che ha preso forma anche al di fuori delle mura "cubiche"!

Come non ringraziare Roberta, entrata in lab come "mia" tesista e dimostratasi un valido braccio destro negli esperimenti; la sua disponibilità e la sua dolcezza non sono venute meno neanche durante i miei momenti di follia più totale...le è toccato perfino il lavoro sporco della risistemazione della bibliografia, che non ha esitato a fare pur di essermi di aiuto!

Ma il gruppo del lab non è solo questo...vorrei ringraziare anche Jinous, con le sue "perle di saggezza" e le notizie bomba, ma anche con le sue risate genuine e coinvolgenti; Tonino, il mitico Toni, anche conosciuto come l'"InformaCubo", sempre disponibile e aperto allo scherzo, e sempre pronto a sdrammatizzare le situazioni più difficili con una battuta e il sorriso sulla bocca, e il suo inseparabile compagno di merende, Valentino! Rossella, con la sua solarità e la sua coinvolgente energia, che mi è stata di grande aiuto nei momenti più bui davanti all'infernale ossigrafo!; Letizia, per la sua professionalità e il contributo clinico.

Un ringraziamento particolare va a Danielone, che ha messo a nostra disposizione le sue conoscenze nel campo della microscopia elettronica, fornendoci delle preziose immagini, e che nel tempo è diventato un amico e un vincente capofila del gruppo sciistico!!

Una buona parte di questo lavoro non sarebbe stata possibile senza il fondamentale apporto di Elisabetta, con cui ho iniziato questo lungo e tortuoso cammino nei meandri della proteomica; oltre a lei ringrazio tutto il gruppo della "Gastro", con cui ho condiviso intere giornate "meditative" davanti al pc!

Il mio più sincero ringraziamento va ai miei genitori, che mi hanno incoraggiata e sostenuta fino alla fine, fornendomi un preziosissimo aiuto con la piccola Ambra!

E un GRAZIE infinito va a Francesco e ad Ambra, che hanno sopportato pazientemente per un lungo periodo il mio umore altalenante, dall'euforia agli scatti di nervosismo...nonostante le notti insonni e le borse sotto agli occhi, sono arrivata in fondo grazie al loro sostegno e alla loro costante e fondamentale presenza!

Il periodo del Dottorato lo ricorderò come il più bel periodo della mia vita, in cui Francesco ed Ambra sono entrati a far parte della mia famiglia.