

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche Biotecnologie Endocrinologiche, Molecolari e Rigenerative

CICLI XXXI

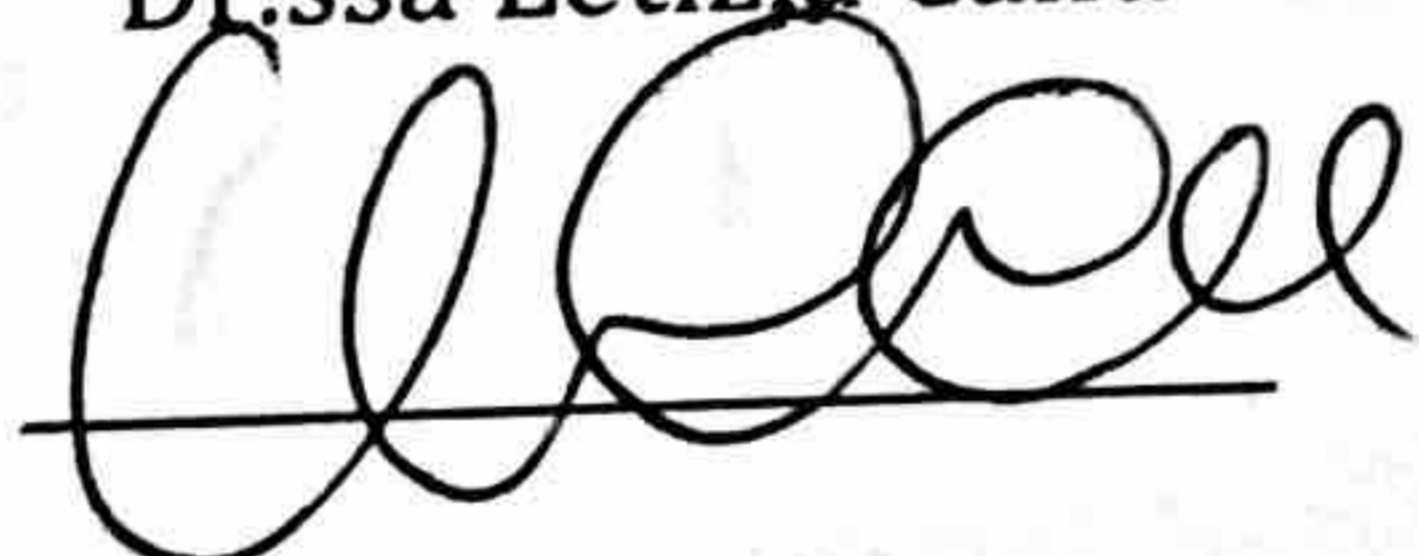
COORDINATORE Prof. Massimo Stefani

Feocromocitoma/paraganglioma: aspetti radiologici ed associazione con seconde neoplasie

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

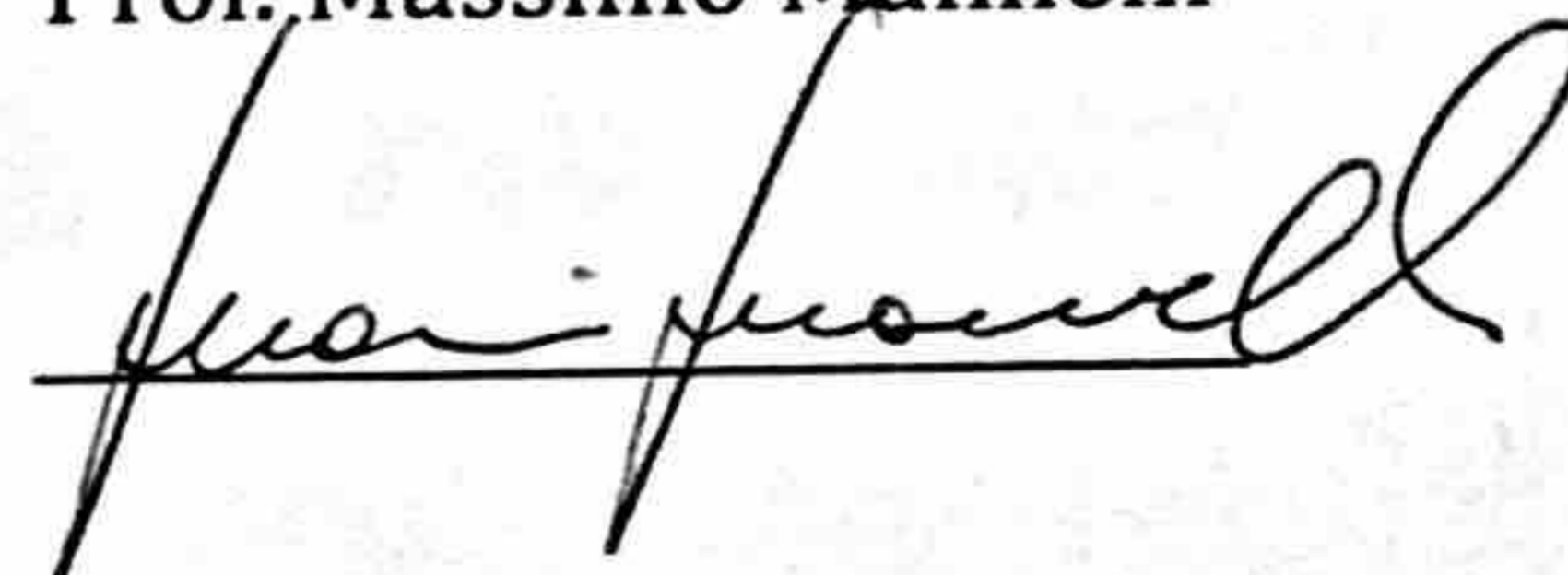
Dottorando

Dr.ssa Letizia Canu



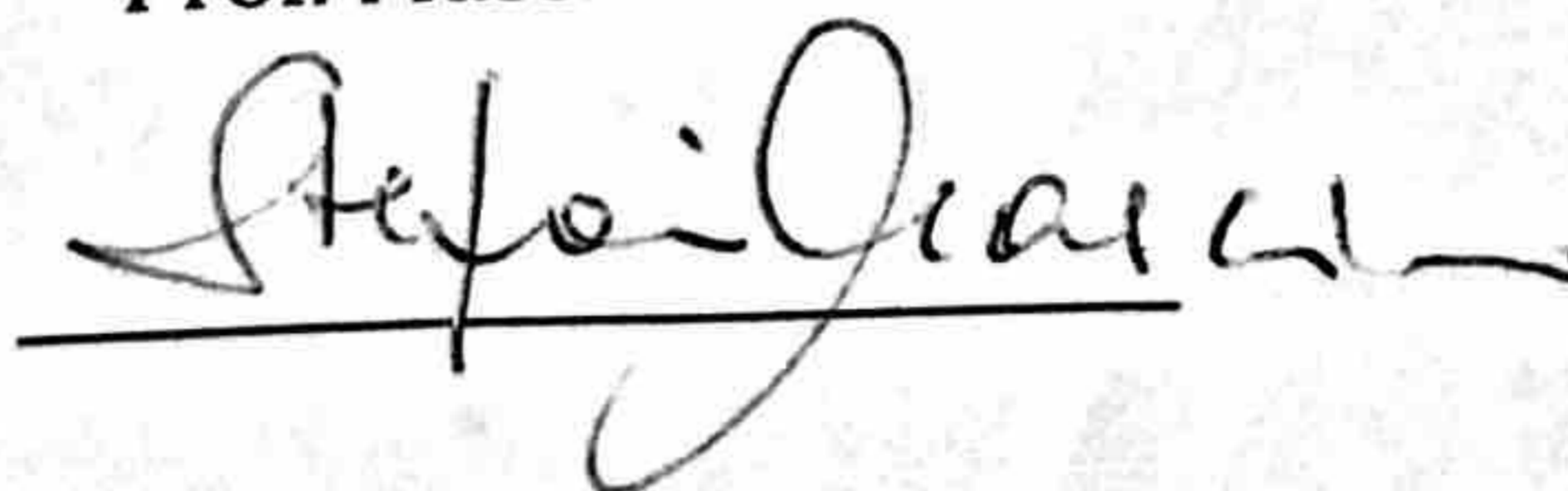
Tutore

Prof. Massimo Mannelli



Coordinatore

Prof. Massimo Stefani



Anni 2015/2018

Indice

1 Introduzione

- 1.1. Feocromocitoma/Paraganglioma: epidemiologia ed eziopatogenesi pag. 1-8
- 1.2. Diagnosi biochimica pag. 9
- 1.3. Aspetti radiologici pag.10-11
- 1.4. Associazione con altri tumori pag. 12-26

2 “CT characteristics of pheochromocytoma – relevance for the evaluation of adrenal incidentaloma”

- 2.1 Scopo pag. 27
- 2.2 Materiali e metodi pag. 28-30
- 2.3 Risultati pag. 31-37
- 2.4 Discussione pag.38-41
- 2.5 Conclusioni pag.42

3 “Feocromocitoma/Paraganglioma ed altre neoplasie.

Studio multicentrico retrospettivo e confronto con la popolazione generale”

- 3.1 Scopo pag. 43
- 3.2 Materiali e metodi pag. 44-45
- 3.3 Risultati pag. 46-55
- 3.4 Discussione pag. 56-64
- 3.5 Conclusioni pag. 65

4 Bibliografia

pag. 66-74

1. Introduzione

1.1 Feocromocitoma/paraganglioma: epidemiologia ed eziopatogenesi

Feocromocitoma (FEO) e paraganglioma (PGL) sono tumori rari di derivazione dalla cresta neurale; durante l'embriogenesi le cellule migrano dalla cresta neurale fino a raggiungere la midollare del surrene dove possono dare origine al FEO. In sede extra-surrenalica queste cellule si localizzano a livello dei gangli simpatici di torace e addome dove possono svilupparsi i paragangliomi simpatergici, e a livello dei gangli parasimpatici della testa/collo dove possono svilupparsi gli HNPG. Mentre i FEO ed i PGL di natura simpatica sono in grado di produrre catecolamine, i PGL originatisi dai gangli parasimpatici sono per lo più silenti dal punto di vista biochimico.

Data la comune origine tissutale, il FEO può essere altresì definito come un "paraganglioma intra-surrenalico" ¹. Queste lesioni hanno un'incidenza di 0,8 casi/100000/anno ed una prevalenza nella popolazione generale di 1:6500-1:2500 ². Il numero di nuovi casi non differisce tra i due sessi. Il picco di incidenza interessa la terza - quinta decade. Il FEO rappresenta circa il 7% di tutti gli incidentalomi surrenalici ^{3 4 5 6} (Tab.1).

Tipo di lesione	Mediana (%)
Adenoma	80.0
Feocromocitoma	7.0
Carcinoma cortico-surrenalico	8.0
Metastasi	5.0

Tab.1: frequenze dei differenti tipi di tumore a localizzazione surrenalica riscontrati incidentalmente (modificata da Fassnacht et al., 2016) ⁷.

Il 10-49% dei FEO/PGL vengono riscontrati incidentalmente durante l'esecuzione di indagini strumentali ^{8 9 10 11}. Circa il 90% (89,4%) delle lesioni che vengono riscontrate sono localizzate a carico della midollare del surrene ¹² e solamente in circa il 10% dei casi si tratta

di PGL. In questo caso le lesioni esordiscono più precocemente e sono più frequentemente di natura maligna (32.1% vs 7.2%)¹². Fino al 2017 il FEO/PGL era considerato un tumore a comportamento incerto con la possibilità di fare diagnosi di forma maligna solo nei pazienti con disseminazione a distanza della malattia¹³. Nel 2017 la WHO ha incluso tutti i tumori di natura cromaffine tra i tumori potenzialmente maligni eliminando la precedente distinzione tra forme benigne e maligne e preferendo un approccio basato sulla valutazione del rischio di metastatizzazione a distanza^{14 15}. Fino al 40% dei casi rientrano nello spettro di sindromi familiari dovute alla mutazione di uno dei geni di suscettibilità noti. In questi casi FEO/PGL tendono a presentarsi più precocemente e più frequentemente con lesioni multifocali^{16 17}. Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi nella comprensione delle basi genetiche di queste sindromi ereditarie. Fino al 2000 infatti si conoscevano solo tre sindromi nell'ambito delle quali il paziente può sviluppare un FEO familiare: neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), Sindrome di von Hippel-Lindau (VHL) e neoplasia endocrina multipla di tipo 2 (MEN2) legata alla mutazione del gene *RET*^{18 19 20 21} (Fig.1).

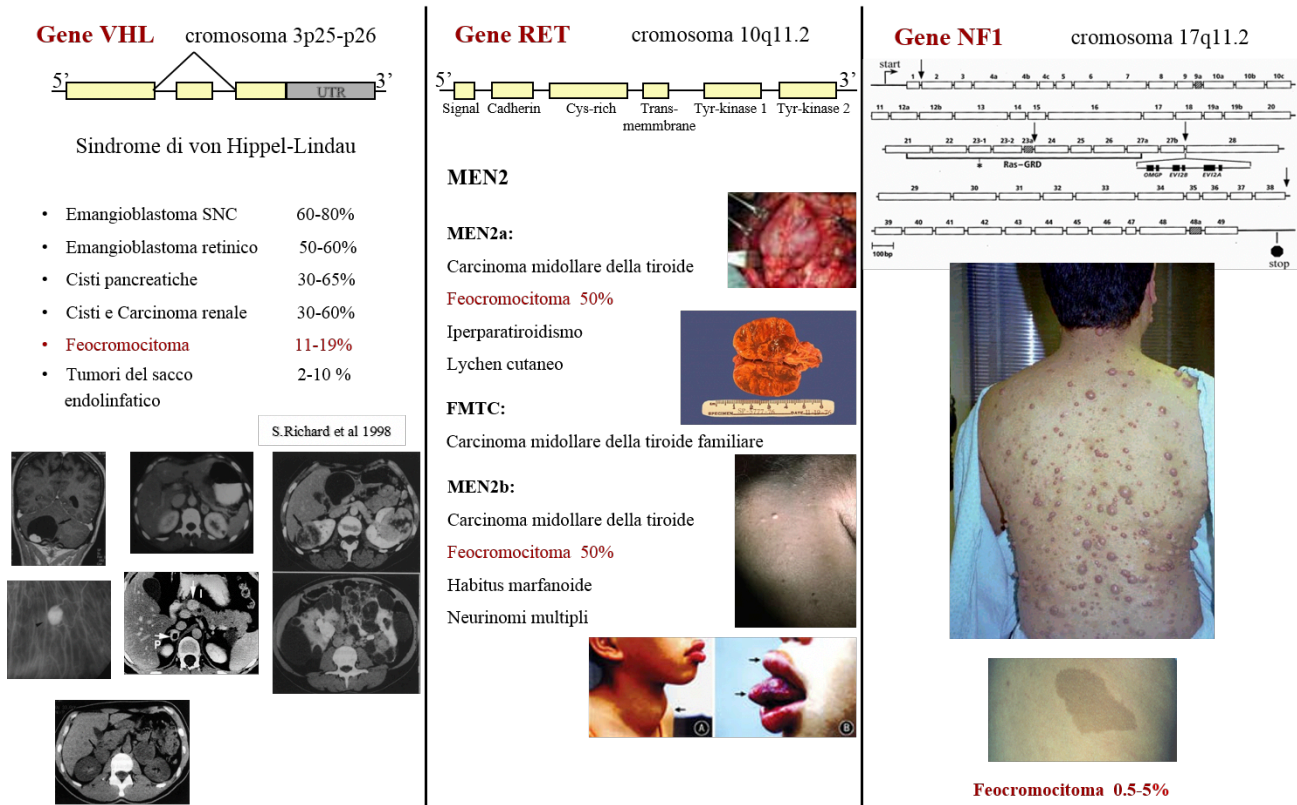


Fig.1: geni responsabili delle tre forme sindromiche comprendenti feocromocitoma. Gene VHL (von Hippel-Lindau), gene RET (MEN2), gene NF1 (neurofibromatosi tipo 1).

All'inizio degli anni 2000 sono state trovate mutazioni a carico dei geni che codificano per le subunità della succinato deidrogenasi (SDH) o complesso enzimatico mitocondriale di tipo II e di un gene correlato (*SDHAF2*). Le mutazioni a carico di queste subunità sono responsabili delle paragangliomatosi familiari di tipo 1-5^{22 23 24 25 26}.

Più recentemente, è stato dimostrato che i FEO/PGL causati da mutazioni di un altro gene implicato nel ciclo di Krebs, la fumarato idratasi (*FH*), possono associarsi al carcinoma renale (RCC) o alla leiomiomatosi ereditaria²⁷.

Mutazioni di altri geni di più recente scoperta, *TMEM127* e *MAX*, sono inizialmente state ritenute responsabili del solo sviluppo di FEO/PGL²⁸ anche se mutazioni del gene *MAX* sono state riconosciute come responsabili dello sviluppo di tumori renali²⁹. Inoltre recentemente sono stati descritti quattro casi di pazienti con mutazione germinale di *MAX* affetti da FEO e

adenoma ipofisario ^{30 31}; due secernenti prolattina (PRLomi) e due secernenti ormone della crescita (GHomi). In nessuno di questi casi è stata effettuata l'immunoistochimica sul tessuto ipofisario e pertanto non possibile dire se si tratti di una associazione casuale o geneticamente determinata.

La presenza di FEO è stata anche descritta in pazienti con mosaicismo per mutazioni attivanti il fattore ipossia-inducibile tipo 2 alfa (*HIF2alfa*) ³². Ad oggi sono noti almeno 19 geni di suscettibilità per le sindromi FEO/PGL ³³; infatti oltre a quelli sopra citati ne sono responsabili anche il gene della prolidrossilasi tipo 1 e 2 (*PHD1* e *PHD2*) ³⁴, *H-ras* ed il gene codificante per la malato deidrogenasi tipo 2 (*MDH2*) ³⁵. Anche nell'ambito della Sindrome X-linked alfa-talassemia/ritardo mentale (*ATRX*) è stata descritta la presenza di FEO/PGL ³⁶. Ci sono poi dei reports che descrivono l'associazione di FEO/PGL con mutazioni dell'isocitrato deidrogenasi tipo 1 (*IDH1*), della proteina tipo 1 associata al carcinoma mammario (*BAP1*) e della chinasi 1beta (*KIF1beta*) ^{37 38 39 40 41 42 43}.

Una piccola parte di FEO/PGL si trovano inoltre nell'ambito della triade di Carney, della Sindrome Carney-Stratakis ⁴⁴ e, molto raramente, della MEN1 ⁴⁵.

La triade di Carney è stata descritta nel 1977 e si caratterizza per la presenza di GIST, PGL e condroma polmonare ⁴⁶. Nella Sindrome Carney-Stratakis non sono invece presenti i condromi polmonari.

In seguito all'analisi del profilo trascrizionale, FEO/PGL sono stati raggruppati in due gruppi (cluster 1 e 2) ⁴⁷.

Al cluster 1 appartengono FEO/PGL con mutazioni a carico di *VHL*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *HIF2A*, *PHD2*, *IDH*, *FH* e *MDH2* ⁴⁸. Questi tumori si caratterizzano per un marcato incremento della vascolarizzazione e dell'espressione di VEGF e dei suoi recettori ⁴⁹.

Inoltre nei tumori con mutazioni a carico di *SDHx* e di *FH* è stata descritta un'ipermetilazione

del DNA ⁵⁰.

Il Cluster 1 può a sua volta essere suddiviso in 1A (*SDHx* ed *FH*) ed 1B (*HIF2A* e *VHL*) ⁵¹ (Fig.2).

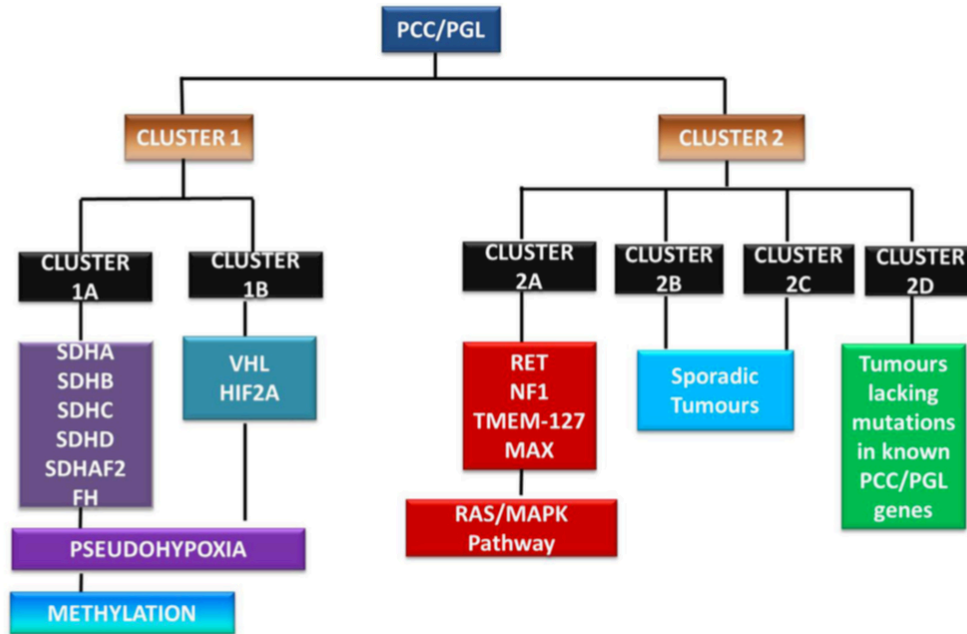


Fig.2: suddivisione dei FEO/PGL nei due Cluster ⁴⁸.

I FEO/PGL appartenenti al Cluster 1 si caratterizzano per l'attivazione di HIFs ⁵²; quando questa via di segnalazione è attivata costituzionalmente si realizza una condizione denominata pseudo-ipossia dovuta alla stabilizzazione di HIF1alfa che induce l'attivazione di geni target implicati nella regolazione dell'angiogenesi, dell'ematopoiesi, della crescita e della migrazione cellulare ⁵³ (Fig.3).

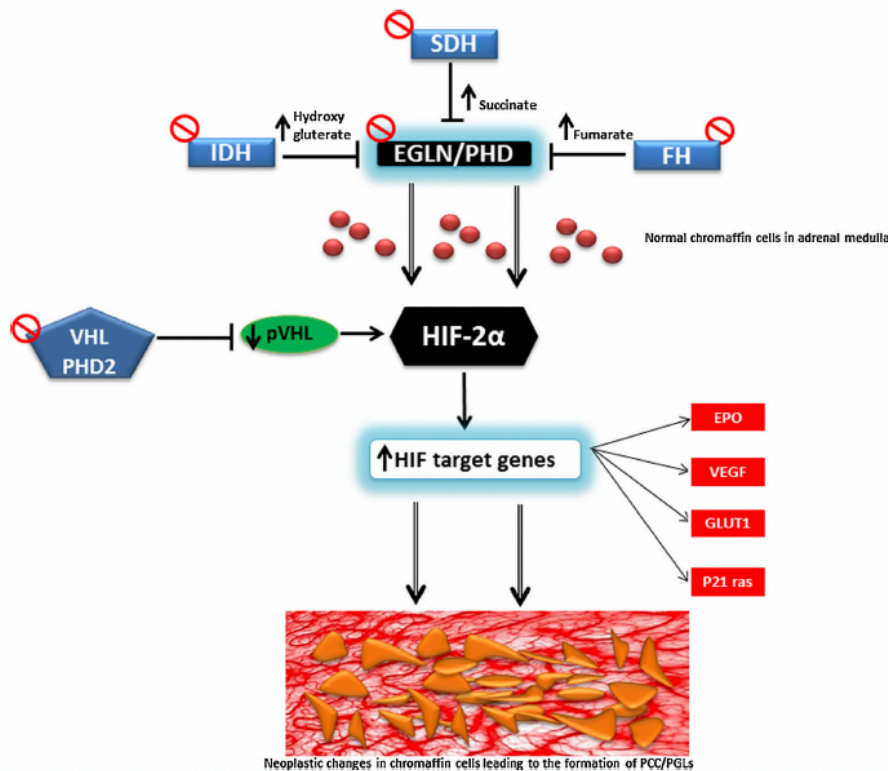


Fig.3: vie di trascrizione attivate nei FEO/PGL appartenenti al Cluster 1 ⁴⁸.

È noto infatti che mutazioni del complesso mitocondriale II determinano una perdita della sua attività enzimatica con conseguente accumulo del succinato, che diffondendo nel citoplasma della cellula, diventa un inibitore competitivo dell'enzima prolidrossilasi (PHD), bloccandone il sito di legame dell' α ketoglutarato. Le PHD sono responsabili dell'idrossilazione di due residui prolinici di HIF, essenziale per l'ubiquitinizzazione e la degradazione di HIF stesso. Studi effettuati *in vivo* ed *in vitro* ⁵⁴ su modelli sperimentali hanno dimostrato che l'accumulo del succinato porta ad inibizione della normale idrossilazione di HIF, che di conseguenza si accumula e passa nel nucleo attivando l'espressione di geni inducibili dall'ipossia, fra cui il VEGF. In presenza di un deficit della SDH, si attivano quindi processi angiogenetici anche in condizioni di normossia ⁵⁵; questo spiega l'aspetto estremamente vascolarizzato di questi tumori ⁵⁶. Anche mutazioni a carico di *VHL* o del gene codificante per PHD caratterizzano tumori appartenenti a questo Cluster infatti causano la mancanza della proteina VHL funzionante che induce la comparsa di pseudo-ipossia e, come conseguenza, HIF1alfa si

accumula e lega HIF1beta. Questo processo induce la trascrizione di geni bersaglio implicati nello sviluppo di FEO/PGL⁵⁷⁻⁵⁸. Mutazioni a carico di *FH* sono responsabili dell'accumulo di fumarato intracellulare che inibisce competitivamente le PHD con stabilizzazione di HIF e tumorigenesi analoga ai tumori dovuti a mutazioni di SDHx⁵⁹.

Al cluster 2 invece appartengono FEO/PGL con mutazioni a carico di *RET*, *NF1*, *TMEM127*, *MAX* e *KIF1beta*⁴⁸ (Fig.4).

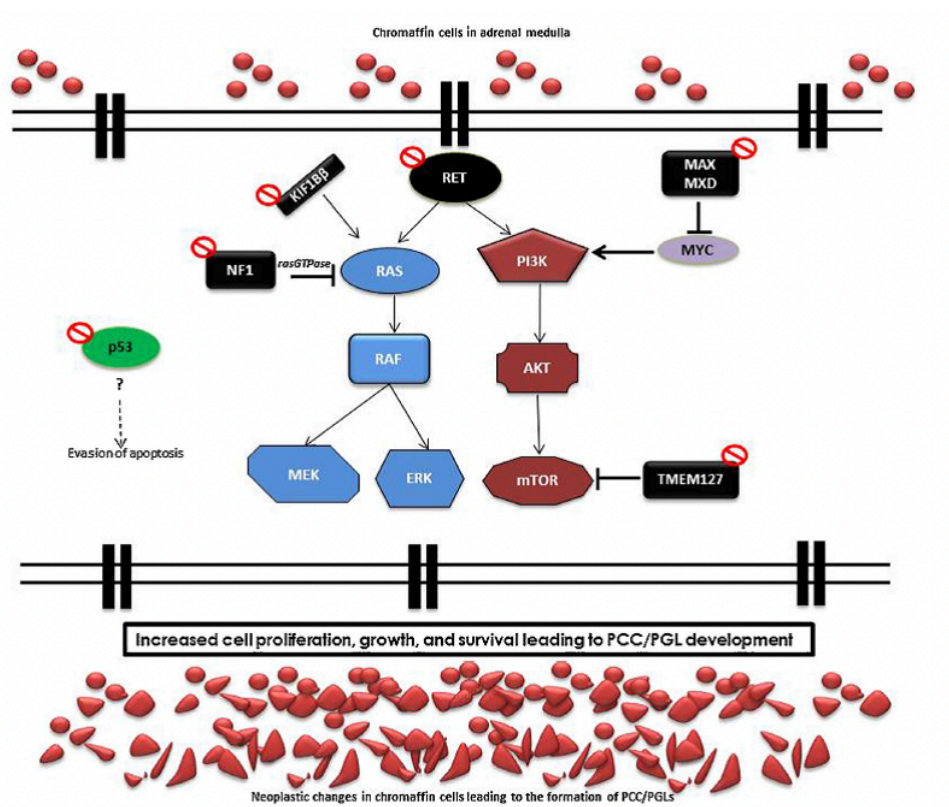


Fig.4: vie di trascrizione attivate nei FEO/PGL appartenenti al Cluster 2⁴⁸.

Anche in questo caso si possono effettuare ulteriori distinzioni suddividendo il cluster in 2A (*RET*, *MAX*, *NF1* e *TMEM127*), 2B e 2C che comprendono i tumori sporadici⁶⁰⁻⁶¹ e 2D che include i tumori per i quali non sia stata identificata nessuna tra le mutazioni note per lo sviluppo di FEO/PGL. I tumori appartenenti al Cluster 2 presentano l'attivazione delle vie di segnale della fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K)/AKT/mTOR e di RAS/RAF/ERK⁶².

Entrambe queste vie promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare che portano

allo sviluppo di FEO/PGL ⁶³ ⁶⁴.

1.2 Diagnosi biochimica

La diagnosi di FEO/PGL è biochimica e si basa sul riscontro di un eccesso di produzione di catecolamine da parte del tumore ⁶⁵. Anche le linee guida ESE del 2014 ⁶⁶ raccomandano di effettuare indagini strumentali solo dopo che sia stata fatta diagnosi tramite adeguate indagini laboratoristiche. Le catecolamine vengono metabolizzate a metanefrine: l'adrenalina (A) a metanefrina (MN), la noradrenalina (NA) a normetanefrina (NMN) e la dopamina (DA) a metossitiramina (MTX) ⁶⁷. Nel tumore questo processo metabolico è indipendente dal rilascio delle catecolamine ed i rispettivi metaboliti (MN, NMN e MTX) vengono rilasciati continuamente. Il dosaggio delle metanefrine plasmatiche o urinarie è quello maggiormente sensibile e rappresenta pertanto la misura da richiedere quale marker tumorale. ⁶⁸. Un incremento di questi indici di 4 volte è considerato diagnostico di lesione cromaffine ⁶⁵.

1.3 Aspetti radiologici

La TC (tomografia computerizzata) è l'esame di prima scelta per la valutazione delle lesioni surrenaliche. I parametri da valutare sono: il valore dell'attenuazione all'esame diretto in HU (Hounsfield Units) ed i valori di washout assoluto (AWP: absolute percentage washout) e relativo (RPW: relative percentage washout).

L'esame di seconda scelta è invece rappresentato dalla RMN (risonanza magnetica nucleare) nella quale è importante valutare la caduta del segnale nelle sequenze fuori fase (LOS: Loss Of Signal) e l'intensità della lesione rispetto al parenchima epatico nelle sequenze T2. In entrambi i casi, sia con la TC che con la RMN, è importante valutare i margini della lesione, la forma, l'omogeneità e la presenza o meno di aree di necrosi, emorragia o calcificazioni. Gli adenomi nella maggior parte dei casi sono ricchi di lipidi e questo è il motivo per cui alla TC diretta presentano bassi valori di attenuazione ⁶⁹. Va tenuto in considerazione che esistono anche adenomi atipici poveri di lipidi che presentano valori più elevati di HU alla TC diretta. Il cut-off comunemente utilizzato per identificare lesioni benigne è di 10 HU ⁷⁰ con una sensibilità del 71% ed una specificità del 98% ⁷¹.

Gli adenomi, sia ricchi che poveri in lipidi, presentano elevati valori di washout. Nella valutazione di una lesione vanno considerati sia il washout assoluto che quello relativo calcolabili con l'utilizzo di apposite formule partendo dai valori di HU alla TC diretta, in fase precoce e tardiva.

Il razionale alla base dell'utilizzo dei valori di washout per distinguere lesioni benigne e maligne è la presenza di una rete vascolare anomala nelle lesioni maligne che determina una riduzione della dismissione del mezzo di contrasto (mdc) e quindi più bassi valori di washout ⁷². Valori di washout assoluto $\geq 60\%$ e relativo $\geq 40\%$ sono diagnostici di lesioni adenomatose con una specificità del 100% ^{73 74 75 76 77}. I dati di letteratura relativi all'utilizzo

della RMN sono meno numerosi. La TC rappresenta il gold standard per la maggiore accessibilità ed il minor costo ⁷⁰. La RMN può essere comunque utilizzata quando il paziente ha delle controindicazioni all'utilizzo del mezzo di contrasto iodato ⁷⁰. Con questa metodica gli adenomi, per la presenza di lipidi al loro interno, si caratterizzano per la caduta di segnale nelle sequenze fuori fase ⁷⁸. Alla RMN inoltre è possibile valutare l'intensità della lesione in relazione a quella del parenchima epatico nelle sequenze T2 e T1 pesate. Gli adenomi appaiono ipo/isointensi nelle sequenze T1 e iso/lievemente iperintensi nelle sequenze T2. Nelle sequenze T2 feocromocitomi, metastasi e carcinomi corticosurrenali appaiono iperintensi ⁷⁹ (Tab.2).

Indagine strumentale	Criterio diagnostico
TC senza mdc	≤ 10 HU
RMN	Caduta di segnale fuori fase
TC con mdc (3 fasi)	APW ≥ 60% RPW ≥ 40%

Tab.2: caratteristiche agli esami strumentali suggestive di lesione benigna (modificata da Fassnacht et al., 2016) ⁷.

1.4 Associazione con altri tumori

Negli ultimi anni è cresciuto progressivamente l'interesse riguardo all'identificazione di altri tumori solidi in pazienti affetti da FEO/PGL. In particolar modo l'interesse è stato rivolto all'identificazione di altre neoplasie nei pazienti con forme familiari ed ancor più con mutazioni *SDHx*⁸⁰. Nei pazienti portatori di FEO/PGL da mutazione *SDHx* sono state riportate rare associazioni con altri tumori quali gastrointestinal stromal tumors (GIST), carcinomi a cellule renali (RCC) e adenomi ipofisari (PA). Ancora più raramente sono state inoltre descritte altre neoplasie quali carcinoma papillare della tiroide⁸¹, linfomi⁸² e tumori neuroendocrini del pancreas⁸³.

I GIST possono essere sporadici o familiari; le forme familiari sono dovute nell'85-90% dei casi a mutazioni di *KIT* o *PDGFRA*^{84 85}. I casi considerati sporadici, sono in realtà per il 50% dovuti a mutazioni di *NF1*^{86 87} o *BRAF*⁸⁸ e nell'altra metà dei casi a mutazioni di *SDHx*. Quasi tutti i GIST *SDH* mutati sono a localizzazione gastrica (maggior predilezione per l'antrum gastrico), multipli, frequentemente multinodulari con un decorso indolente per un lungo tempo anche se possono metastatizzare ai linfonodi^{89 90 91 92}. Più frequentemente questo tipo di GIST compaiono in bambini e giovani adulti e mostrano una predilezione per il sesso femminile⁹³. Nella maggior parte dei casi di GIST considerati sporadici ma in realtà *SDH* mutati, è il gene codificante per la subunità A della succinato deidrogenasi ad essere mutato⁹⁰. Dal punto di vista cellulare, i GIST *SDHx* mutati si caratterizzano per la presenza di cellule epitelioidi o di una popolazione mista cellule epitelioidi-cellule fusate (questo ultimo tipo cellulare è quello tipicamente presente nei GIST mutati *KIT* o *PDGFRA* degli adulti)⁹⁴.

Nel 2007 McWhinney e Pasini⁹⁵ hanno riportato 9 pazienti affetti da GIST con mutazioni di *SDHx* di cui è stato possibile analizzarne 8 (5 *SDHB*, 2 *SDHC*, 1 *SDHD*); su tutti i tessuti è stata dimostrata la perdita di eterozigosi (LOH).

Nel 2010 Gill et al.⁹⁶ hanno riportato i risultati relativi ad una rivalutazione effettuata sui GIST sottoposti ad asportazione tra il 1997 ed il 2009 presso il Royal North Shore Hospital di Sydney. In totale hanno incluso nello studio 123 GIST. Sono risultati negativi all'analisi immunostochimica per SDHB 9 casi (5 affetti da Triade di Carney, 1 pediatrico e 3 sporadici).

Miettinen et al. nel 2011⁹⁴ hanno valutato in immunostochimica una grande casistica (n=1134) di GIST; in 66 casi (tutti a localizzazione gastrica e prevalentemente identificati in giovane età) l'immunostochimica per *SDHB* è risultata negativa.

Nello stesso anno Janeway et al.⁸⁹ hanno condotto l'analisi genetica per *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* sul sangue di 34 pazienti affetti da GIST senza familiarità per FEO/PGL nei quali non erano state identificate varianti a chiaro significato patogenetico a carico di *KIT* e *PDGFRA*. Gli autori hanno identificato 3 mutazioni *SDHB*, 1 *SDHC* e due *SDHD* (queste ultime di dubbio significato patogenetico). È stato inoltre possibile effettuare l'analisi immunostochimica su 2 dei tre GIST mutati *SDHB* (negativa) e su 1 dei due GIST con mutazione a carico di *SDHD* (positiva).

Sempre nel 2011 Gaal et al.⁹⁷ hanno effettuato l'analisi immunostochimica per SDHB su 4 GIST di pazienti affetti da Sindrome di Carney-Stratakis e 6 da Triade di Carney, 5 GIST con varianti di significato patogenetico a carico di *KIT* o *PDGFRA* e 42 lesioni sporadiche. I GIST nell'ambito della Sindrome di Carney-Stratakis e della Triade di Carney sono risultati *SDHB*-negativi insieme ad un caso (1/42) tra le forme considerate sporadiche.

Doyle et al.⁹⁸ nel 2012 hanno effettuato l'analisi immunostochimica per *SDHB* in 179 GIST con mutazioni a carico di *KIT*, 32 mutati *PDGFRA* e 53 senza varianti di chiaro significato patogenetico. In 22 su 53 GIST apparentemente sporadici, l'esito dell'analisi è risultato negativo.

Italiano et al.⁹⁹ nello stesso anno hanno analizzato 17 GIST (13 pediatriche e 4 in giovani adulti) considerati sporadici per l'assenza di varianti patogenetiche a carico di *KIT* e *PDGFRA*. Cinque

dei 13 casi pediatrici rientravano nell'ambito della Triade di Carney. Sei casi sono stati sottoposti ad analisi genetica che ha mostrato una mutazione nonsense a carico del gene *SDHA*. Dall'analisi del tessuto è emersa una perdita parziale dell'allele wild type. In aggiunta gli autori hanno successivamente effettuato l'analisi genetica in altri 11 casi di GIST sporadici; in questo gruppo è stato identificato un altro paziente con una mutazione missense a carico di *SDHA*.

Nel 2013 Oudijk et al.¹⁰⁰ hanno descritto 16 su 33 GIST (24 in adulti e 9 in bambini/adolescenti) analizzati in immunohistochimica per *SDHB* con esito negativo (4 negativi anche per *SDHA*).

Nello stesso anno Wagner et al.¹⁰¹ hanno valutato 33 GIST risultati tutti *SDHB* negativi. Di questi, nove sono risultati negativi anche per *SDHA*. In 5 casi su 9 è stata dimostrata la perdita di eterozigosi. In altri due casi sono stati riscontrati una delezione ed una mutazione somatica.

Miettinen et al.¹⁰² hanno effettuato l'analisi immunohistochimica per *SDHA* su 944 GIST già studiati per *SDHB* (127 GIST gastrici *SDHB* negativi, 556 GIST gastrici *SDHB* positivi, 261 GIST intestinali *SDHB* positivi) ed hanno identificato 36 GIST gastrici negativi per *SDHA* nel gruppo dei tumori già risultati negativi per *SDHB*. Gli autori hanno dimostrato la presenza di perdita di eterozigosi in 6 su 7 GIST *SDHA* negativi.

Tirumani et al.¹⁰³ hanno effettuato uno studio al fine di valutare le caratteristiche dei GIST *SDHx* negativi. Per farlo hanno incluso 34 pazienti con GIST *SDHx* negativo diagnosticato tra il 1999 ed il 2012 presso il Brigham and Women's Hospital di Boston.

Renella et al.⁸² hanno riportato il caso di una giovane ragazza affetta da FEO, GIST e linfoma con mutazione germinale di *SDHC*. Non è stata effettuata nessuna analisi sul tessuto tumorale (GIST).

Niemeijer, et al.⁸³ hanno incluso nel loro studio 26 pazienti mutati *SDHx*; in questo gruppo hanno identificato 2 pazienti affetti da GIST gastrico sul cui tessuto è stata effettuata l'analisi immunohistochimica che è risultata negativa. In entrambi i casi è stata inoltre dimostrata la perdita di eterozigosi. Jiang et al.¹⁰⁴ nel 2015 hanno descritto il caso di un ragazzo di 23 anni affetto da GIST e carcinoma renale cromofobo. In entrambi i casi l'immunohistochimica per *SDHB* è risultata negativa a differenza di quella per *SDHA*. Inaspettatamente però sia sul sangue che sul tessuto di entrambi i tumori è stata identificata una mutazione *de novo* di *SDHA*. Per chiarire questo risultato gli autori hanno effettuato uno studio di metilazione del promotore del gene *SDHB* che ha dimostrato la presenza di ipometilazione.

Nel 2016 Mason et al.¹⁰⁵ hanno riportato una casistica di 76 GIST *SDH* negativi all'analisi immunohistochimica di cui 28 negativi sia per *SDHB* che per *SDHA*. Questi casi sono derivati da una più ampia serie di 705 GIST valutati in un periodo di 10 anni (2005-2015) presso il Dipartimento di Patologia del Brigham and Women's Hospital di Boston. Di questi pazienti, 6 erano affetti da sindrome di Carney-Stratakis ed 8 dalla Triade di Carney. L'analisi genetica è stata effettuata solo in 26 pazienti: 11 *SDHA*, 8 *SDHB*, 6 *SDHC*, 1 *SDHD*. Anche in questo caso tutti i GIST erano a localizzazione gastrica e presentavano la caratteristica architettura multinodulare.

Andrews et al.¹⁰⁶ nel 2018 hanno identificato 1 GIST in un paziente mutato *SDHC* su un totale di 751 pazienti mutati *SDHx*.

	Popolazione di partenza	Casi	Casi sottoposti ad analisi immunoistochimica	Immunoistochimica negativa	Valutazione perdita di eterozigosi	Perdita di eterozigosi
McWhinney & Pasini, 2007 ⁹⁵	9 GIST mutati <i>SDHx</i>	9	0	-	8	8
Gill et al., 2010 ⁹⁶	123 GIST	123	123	9 SDHB-	0	-
Miettinen et al., 2011 ⁹⁴	1134 GIST	1134	1134	66 SDHB-	0	-
Janeway et al., 2011 ⁸⁹	34 GIST sporadici	34	3	2 SDHB-	0	-
Gaal et al., 2011 ⁹⁷	57 GIST	57	57	11 SDHB-	0	-
Doyle et al., 2012 ⁹⁸	264 GIST	264	264	22 SDHB-	0	-
Italiano et al., 2012 ⁹⁹	28 GIST	28	7	4 SDHB- (di cui 3 SDHB-/SDHA-)	17	1 perdita parziale, 1 mutazione somatica
Oudijk et al., 2013 ¹⁰⁰	33 GIST	33	33	16 (di cui 4 SDHB-/A-)	0	-
Wagner et al., 2013 ¹⁰¹	33 GIST	33	33	33 SDHB- (di cui 9 SDHB-/A-)	9 SDHA-	5 (+ 1 delezione ed 1 mutazione somatica)
Miettinen et al., 2013 ¹⁰²	944 GIST	944	944	127 SDHB- (di cui 36 SDHB-/A-)	7 SDHA-	6
Tirumani et al., 2014 ^{103*}	34 GIST <i>SDHx</i> negativi in immunoistochimica	34	34	34 SDHB-	0	-
Renella et al., 2014 ⁸²	1 paziente affetta da GIST, FEO e linfoma	1	0	-	0	-
Niemeijer et al., 2015 ⁸³	Pazienti mutati <i>SDHx</i> (n=26)	2	2	2 SDHB-	2	2
Jiang et al., 2015 ¹⁰⁴	1 paziente affetto da GIST e carcinoma renale cromofobo	1 (GIST)	1	1 SDHB-	1	1
Mason et al., 2016 ^{105*}	705 GIST	76	76	76 SDHB- (di cui 28 SDHB-/A-)	0	-
Andrews et al., 2018 ¹⁰⁶	751 pazienti mutati <i>SDHx</i>	1	0	-	0	-

Tab.3: GIST descritti in letteratura in pazienti affetti da FEO/PGL e/o mutati.

* parziale sovrapposizione temporale tra questi due studi; è possibile che alcuni pazienti siano stati inclusi in entrambi gli studi.

Nel 2004 è stata descritta per la prima volta ¹⁰⁷ l'associazione tra mutazione *SDHB* ed RCC (3 pazienti). In tutti e tre i casi è stata dimostrata la LOH. Nello stesso anno Neumann et al. ¹⁰⁸ hanno valutato 100 pazienti (53 *SDHB* e 47 *SDHD*) ed hanno descritto la presenza di due RCC. Nel 2010 Ricketts et al. ¹⁰⁹ hanno descritto 12 carcinomi renali in una coorte di 358 pazienti mutati *SDHB* ed *SDHD* (11 B e 1 D). Due anni dopo ¹¹⁰ sono stati riportati 24 casi di pazienti appartenenti a famiglie *SDHx* con RCC (17 *SDHB*, 6 *SDHC*, 1 *SDHD*) in alcuni casi associato a FEO/PGL nello stesso paziente (2 *SDHB* e 1 *SDHD*). Nel 2014 Gill et al. ¹¹¹ hanno riportato i risultati dell'analisi immunohistochimica su 36 RCC di 27 pazienti risultata negativa in tutti i casi. Solo 15/36 RCC non erano stati precedentemente riportati in letteratura. In 17 pazienti è stata in seguito effettuata l'analisi genetica che ha identificato 16 mutazioni *SDHB* ed 1 *SDHC*. Papathomas et al. nel 2014 ¹¹² hanno analizzato un'ampia serie di 348 tumori inclusi 5 RCC, identificando 4 carcinomi renali con immunohistochimica negativa per *SDHB* e LOH.

Nel 2015 Williamson et al. ¹¹³ hanno analizzato 37 RCC con caratteristiche istologiche compatibili con tumori mutati *SDHx*. L'analisi immunohistochimica per *SDHB* è stata effettuata su tutti i tessuti ottenendo un esito negativo in 11 casi. In un caso è risultata negativa anche l'analisi per *SDHA*. In 5 su 6 tumori è stata inoltre dimostrata la perdita allelica. Niemeijer, et al. ⁸³, partendo dalla valutazione di 26 pazienti mutati *SDHx*, hanno identificato 3 RCC su 35 tumori (non solo RCC) con immunohistochimica negativa per *SDHB* e LOH. Yakirevich et al. ¹¹⁴ hanno descritto il caso di un RCC con immunohistochimica negativa per *SDHB* ed *SDHA*. Dall'analisi del tessuto è poi emersa una delezione biallelica a carico di *SDHA*. Ozluk et al. ¹¹⁵ hanno riportato il caso di un paziente di 63 anni affetto da RCC. Il tessuto è stato analizzato ed è risultato negativo all'analisi immunohistochimica per *SDHB* ed *SDHA*. L'analisi del DNA estratto dal tessuto ha dimostrato la presenza di delezione in un sito di splicing non precedentemente descritta. Dall'analisi bioinformatica questo tipo di delezione appare più verosimilmente di origine somatica che germinale. Nel corso dell'ultimo anno Andrews et al.

¹⁰⁶ hanno condotto uno studio molto ampio su pazienti con mutazione germinale *SDHx*. Nel sottogruppo di 751 pazienti per i quali erano disponibili notizie cliniche, hanno riportato 16 casi di carcinoma renale (15 *SDHB* ed 1 *SDHD*).

Nel 2015 Jiang et al. ¹⁰⁴ hanno descritto il caso di un diverso istotipo di carcinoma renale, il carcinoma renale cromofobo, in un giovane paziente affetto anche da GIST. Come precedentemente descritto il caso non risulta chiaro in quanto entrambi i tumori sono risultati negativi all'immunoistochimica per *SDHB* e positivi per *SDHA* di fatto escludendo la possibilità di una mutazione a carico di questo ultimo gene. In realtà è stata successivamente dimostrata la presenza di una mutazione a carico di *SDHA* con LOH dimostrata sul tessuto.

Nel 2016 la World Health Organization (WHO) ha riconosciuto l'RCC causato da mutazioni dell'*SDHx* come un'entità a sé stante ^{111 116}. Istologicamente infatti questi tumori si presentano in maniera peculiare con vacuoli citoplasmatici e spazi che appaiono come inclusioni di liquido eosinofilo o materiale flocculento ¹¹¹.

Si tratta frequentemente di lesioni multifocali; fino ad un quarto dei pazienti presenta forme bilaterali. Nella maggior parte dei casi le forme *SDHx* mutate sono dovute ad una mutazione della subunità B. Questo rappresenta una differenza rispetto ai GIST *SDHx* che fino al 30% dei casi sono dovuti a mutazioni di *SDHA* ¹¹⁷.

	Popolazione di partenza	Casi	Casi sottoposti ad analisi immunoistochimica	Immunoistochimica negativa	Valutazione perdita di eterozigosi	Perdita di eterozigosi
Vanharanta et al., 2004 ¹⁰⁷	Pazienti <i>SDHB</i> mutati affetti da RCC (2 con PGL)	3	0	-	3	3
Neumann et al., 2004 ¹⁰⁸	53 pazienti mutati <i>SDHB</i> e 47 pazienti mutati <i>SDHD</i>	2	0	-	0	-
Ricketts et al., 2010 ¹⁰⁹	358 pazienti mutati <i>SDHB</i> o <i>SDHD</i>	12	0	-	0	-
Ricketts et al., 2012 ¹¹⁰	Famiglie <i>SDHx</i>	24	0	-	0	-
Gill et al., 2014 ¹¹¹	36 RCC in 27 pazienti mutati <i>SDHx</i>	36*	36	36 <i>SDHB</i> -	0	-
Papathomas et al., 2014 ¹¹²	Serie di 348 tumori (non solo RCC)	5	4	4 <i>SDHB</i> -	4	4
Williamson et al., 2015 ¹¹³	RCC con caratteristiche istologiche compatibili con <i>SDHx</i>	37	37	11 <i>SDHB</i> - (di cui 1 <i>SDHB</i> -/ <i>A</i> -)	6	5
Niemeijer et al., 2015 ⁸³	Pazienti mutati <i>SDHx</i> (n=26)	3	3	3 <i>SDHB</i> -	3	3
Yakirevich et al. 2015 ¹¹⁴	1 RCC	1	1	1 <i>SDHB</i> -/ <i>A</i> -	1	1
Ozluk et al., 2015 ¹¹⁵	1 RCC	1	1	1 <i>SDHB</i> -/ <i>A</i> -	1	Verosimile mutazione somatica
Andrews et al., 2018 ¹⁰⁶	751 pazienti <i>SDHx</i>	16 RCC**	0	-	0	-
Jiang et al. 2015 ¹⁰⁴	1 paziente affetto da GIST e carcinoma renale cromofobo	1 carcinoma renale cromofobo	1	1 <i>SDHB</i> -	1	1

Tab.4: RCC descritti in letteratura in pazienti affetti da FEO/PGL e/o mutati. *15/36 casi non precedentemente riportati in letteratura. ** 4/16 casi non precedentemente riportati in letteratura.

Il primo caso di associazione tra PA e FEO/PGL risale al 1952 ¹¹⁸ (riportato nella casistica di O'Toole et al.¹¹⁹).

Nel 2008 è stata descritta per la prima volta l'associazione tra HNPGL e PA secernente PRL in un paziente mutato *SDHC* ¹²⁰. Quattro anni dopo è stata descritta la presenza di un GHoma in un paziente mutato *SDHD*; in questo caso l'osservazione è stata avallata dall'analisi immunohistochimica e dalla LOH dimostrate sul tessuto ipofisario ¹²¹. Nello stesso anno Xekouki et al. ¹²² hanno riportato 27 casi di pazienti con PA e FEO (più un caso di associazione tra PA e carcinoma midollare della tiroide ed un caso già descritto dallo stesso gruppo): 16 GHoma, 3 PRLoma, 1 PA secernente ACTH (ACTHoma), 2 PA non secernenti, 3 PA verosimilmente non secernenti e 2 PA non meglio definiti. Non è descritta analisi sul tessuto.

L'anno successivo Dwight et al. ¹²³ hanno descritto la presenza di un PA non secernente in un paziente *SDHA* ottenendo un esito negativo all'analisi immunohistochimica sul tessuto ipofisario e dimostrando la LOH. Nel 2014 Gill et al. ¹¹¹ dopo l'analisi di 309 PA, hanno identificato un solo caso con immunohistochimica negativa per *SDHB/SDHA*. Sul tessuto sono state inoltre identificate due mutazioni inattivanti non presenti a livello germinale. Gli autori hanno anche descritto altri 9 casi di pazienti *SDHx* con tumori non-FEO/PGL. Considerando solo i 5 casi che non abbiamo riportato separatamente (3 *SDHB*, 1 *SDHC*, 1 *SDHD*), l'analisi immunohistochimica è risultata negativa in un PRLoma.

Papathomas et al. ¹¹² nel 2014 hanno analizzato un'ampia serie di 348 tumori inclusi due PA. L'analisi immunohistochimica per *SDHB* è risultata negativa in 1 su 2 adenomi ipofisari sul quale è stata poi confermata la LOH.

Xekouki et al. ¹²⁴ nel 2015 hanno valutato 168 PA; solo in 4 casi i pazienti avevano presentato l'associazione con FEO ed in tre casi su quattro si trattava di pazienti con mutazione *SDHx* (2 *SDHB* e 1 *SDHD*).

Gli autori per identificare l'associazione tra questi tre tipi di tumore (PA, FEO e PGL), hanno coniato il termine "3Pas" ¹²⁴.

O'Toole et al. ¹¹⁹ hanno riportato 72 casi presenti in letteratura, 60 considerando solo quelli non già precedentemente descritti (13 PA + FEO + mutazioni note, 21 PA + FEO + no mutazioni note + clinica sospetta, 26 PA + FEO + no mutazioni note + no caratteristiche cliniche sospette). Nel gruppo dei 13 casi di PA + FEO + mutazioni note (4 *SDHB*, 2 *RET*, 4 *MENINA*, 1 *SDHA*, 1 *SDHC*, 1 *SDHAF2*), la LOH è risultata positiva in due casi ma non è noto in quanti casi sia stata valutata.

Niemeijer, et al. ⁸³ partendo dalla valutazione di 26 pazienti mutati *SDHx*, hanno identificato 1 PA su 35 tumori (non solo PA) con immunohistochimica negativa per *SDHB* ed uno negativo per *SDHB* ed *SDHA*. In entrambi i casi si trattava di un macroprolattinoma; in un caso è stata dimostrata la LOH sul tessuto e nell'altro identificata una mutazione somatica.

Nel 2018 Andrews et al. ¹⁰⁶ valutando le caratteristiche cliniche di 751 pazienti con mutazioni *SDHx* hanno identificato 3 adenomi ipofisari (1 *SDHB*, 1 *SDHC*, 1 *SDHD*).

Dai dati riportati in letteratura emerge che gli adenomi ipofisari associati ad *SDHx* possono presentare un diverso fenotipo (diversa secrezione ormonale) ¹²⁵. In alcuni casi descritti ¹²³ ¹²¹ ¹²⁰ le lesioni presentavano caratteristiche aggressive; si trattava infatti di macroadenomi che hanno richiesto l'intervento chirurgico.

	Popolazione di partenza	Casi	Casi sottoposti ad analisi immunoistochimica	Immunoistochimica negativa per SDHB	Valutazione perdita di eterozigosi	Perdita di eterozigosi
Lopez-Jimenez et al., 2008 ¹²⁰	PA + HNPGL in paziente <i>SDHC</i>	1	0	-	0	-
Xekouki et al., 2012 ¹²¹	PA + PGLs + <i>SDHD</i>	1	1	1 SDHB-	1	1
Xekouki et al., 2012 ¹²²	PA + PGLs (casi dalla letteratura*)	27	0	-	0	-
Dwight et al., 2013 ¹²³	PA in <i>SDHA</i>	1	1	1 SDHB-/A-	1	1
Gill et al., 2014 ¹¹¹	309 PA + 5 casi dalla letteratura* di <i>SDHx</i> ed altri tumori associati	1+5	1+1	2 SDHB- (di cui 1 SDHB-/A)	Caso SDHB-/A-	Due mutazioni inattivante non presenti a livello germinale
Papathomas et al., 2014 ¹¹²	Serie di 348 tumori (non solo PA)	2	2	1 SDHB-	2	1
Xekouki et al., 2015 ¹²⁴	168 PA (4 FEO+PA → 3 <i>SDHx</i>)	3	0	-	0	-
O'Toole et al., 2015 ^{119*}	72 casi di letteratura	60 casi non precedentemente descritti**	0	-	Non noto in quanti casi sia stata effettuata	2
Niemeijer et al., 2015 ⁸³	Pazienti mutati <i>SDHx</i> (n=26)	2	2	2 SDHB- (di cui 1 SDHB-/A-)	2	1 (+ 1 mutazione somatica)
Andrews et al., 2018 ¹⁰⁶	751 pazienti mutati <i>SDHx</i>	3	0	-	0	-

Tab.5: PA descritti in letteratura in pazienti affetti da FEO/PGL e/o mutati.

* eliminati casi già riportati in altri lavori citati separatamente.

** 13 PA +FEO + mutazioni note, 21 PA + FEO + no mutazioni note + clinica sospetta, 26 PA + FEO + no mutazioni note + no caratteristiche cliniche sospette.

Più raramente altri tumori sono stati descritti in associazione a mutazioni dell'*SDHx*. Nel 2004 Neumann et al.¹⁰⁸ hanno valutato 100 pazienti (53 *SDHB* e 47 *SDHD*) ed hanno descritto la presenza di due carcinomi papillari della tiroide. Nel 2011 Ngeow et al.¹²⁶ hanno valutato 2723 pazienti affetti da sindrome di Cowden o Cowden-like¹²⁷ che si caratterizza per la presenza di amartomi multipli associati ad un rischio aumentato di sviluppare alcuni tipi di tumori (mammella, tiroide, endometrio, colon-retto, rene, melanoma). Nella maggior parte dei casi una mutazione di *PTEN* è la causa di questa sindrome; più raramente invece sono implicate mutazioni di altri geni tra i quali *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*¹²⁸. Gli autori hanno identificato mutazioni di *SDHD* e *SDHB* (26 missense) in 47 pazienti affetti da carcinoma della tiroide che non presentavano mutazioni di *PTEN*.

Gaal et al.⁹⁷ nell'ambito dell'analisi di una serie di 57 pazienti affetti da GIST, hanno descritto un paziente affetto da GIST *SDHB*- all'analisi immunohistochimica e carcinoma midollare della tiroide con immunohistochimica invece positiva.

Renella et al.⁸² hanno descritto il caso di un paziente *SDHB* affetto da linfoma di Hodgkin e PGL. Solo su questa ultima lesione l'immunohistochimica è risultata chiaramente negativa mentre sul tessuto linfoide è risultata di difficile valutazione. Il paziente presentava una mutazione germinale *SDHB*. Il secondo caso presentato dagli autori si riferisce invece ad una ragazza di 15 anni affetta da GIST e FEO che ha sviluppato anch'essa un linfoma all'età di 24 anni. La ragazza presentava una mutazione *SDHC* ma il tessuto tumorale non era disponibile per l'analisi.

Nel 2014 Choi et al.¹²⁹ hanno riportato 206 casi di tumore filloide della mammella (tumore derivante dallo stroma intralobulare) sui quali è stata effettuata l'analisi immunohistochimica per *SDHB/SDHA*. Gli autori hanno identificato 31 casi *SDHB*- e 5 *SDHA*-. A differenza di quanto ci si attende comunemente nei PGL con mutazioni *SDHx*, in questi casi gli autori hanno descritto una correlazione positiva tra l'espressione di *SDHB* ed *SDHA* e quella di HIF-1alfa. I

casi con immunohistochemical negativa per *SDHB* alla valutazione istopatologica sono risultati quelli con minor atipia ed un grading più basso. Niemeijer et al. nel 2015⁸³ hanno descritto 5 differenti tumori associati (oligodendroglioma, tumore neuroendocrino del pancreas, ganglioneuroma, meningioma e carcinoma mammario) in 4 pazienti *SDHx* (1 *SDHA*, 1 *SDHB*, 2 *SDHD*). L'immunohistochemical ha mostrato esito negativo nel ganglioneuroma e nel tumore neuroendocrino del pancreas mentre è risultata di difficile interpretazione nel carcinoma mammario e positiva nell'oligodendrioglioma e nel meningioma. La LOH è stata confermata nel tumore neuroendocrino del pancreas. Ni et al.¹³⁰ hanno invece analizzato un'ampia serie di 754 pazienti comprendente carcinomi differenziati della tiroide e carcinomi della mammella più i dati di oltre 470 pazienti dal The Cancer Genome Atlas (TCGA). Gli autori hanno identificato una serie di polimorfismi e solo 3 mutazioni germinali *SDHB* nella serie del TCGA.

Analizzando 751 pazienti mutati *SDHx* con storia clinica nota, Andrews et al.¹⁰⁶ hanno identificato un adenoma delle paratiroidi ed un carcinoide polmonare entrambi in pazienti mutati *SDHB*.

	Popolazione di partenza	Casi	Casi sottoposti ad analisi immunoistochimica	Immunoistochimica negativa per SDHB	Valutazione perdita di eterozigosi	Perdita di eterozigosi
Neumann et al., 2004 ¹⁰⁸	53 pazienti mutati <i>SDHB</i> e 47 pazienti mutati <i>SDHD</i>	2 (carcinoma papillare della tiroide)	0	-	0	-
Ngeow et al., 2011 ¹²⁶	539 pazienti affetti da CS o CSL* e carcinoma tiroideo	47 (carcinoma tiroideo) con mutazioni germinali <i>SDHD-B</i>	0	-	0	-
Gaal et al., 2011 ⁹⁷	1 carcinoma midollare della tiroide	1	1	0	0	-
Renella et al., 2014 ⁸²	2 pazienti affetti da linfoma	2	1	Mal valutabile	0	-
Choi et al., 2014 ¹²⁹	206 casi di tumore filloide della mammella	206	206	36 SDHB- (di cui 5 SDHB-/A-)	0	-
Niemeijer et al., 2015 ⁸³	Pazienti mutati <i>SDHx</i> (n=26)	4 pazienti <i>SDHx</i> con 5 diversi tumori	5	2 SDHB- (ganglioneuroma e tumore neuroendocrino del pancreas)	2	1
Ni et al., 2015 ¹³⁰	754 pazienti** di cui 3 con mutazioni <i>SDHB</i>	3	0	-	0	-
Andrews et al., 2018 ¹⁰⁶	751 pazienti mutati <i>SDHx</i>	2 (1 adenoma delle paratiroidi 1 carcinoide polmonare)	0	-	0	-

Tab.6: altri tumori descritti in letteratura in pazienti affetti da FEO/PGL e/o mutati.

* CS: Cowden Syndrome, CSL Cowden Syndrome like **carcinomi differenziati della tiroide, carcinomi della mammella e dati di più di 470 pazienti dal The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Rispetto all'associazione tra seconde neoplasie ed *SDHx*, non ci sono altrettanti dati relativi agli altri geni di suscettibilità. Questo è verosimilmente da mettere in relazione alla loro più recente scoperta.

Nel 2017 Roszko et al.³¹ hanno descritto il caso di un PRLoma in un paziente con una nuova mutazione del gene *MAX* e FEO bilaterale.

Recentemente Daly et al.³⁰ hanno descritto l'associazione tra mutazione del gene *MAX* e adenoma ipofisario. In particolare hanno riportato tre casi clinici: un maschio di 32 anni affetto da FEO asportato chirurgicamente e poi recidivato. Anamnesi familiare negativa per tumori endocrini. All'età di 49 anni il paziente ha sviluppato un PRLoma trattato efficacemente con cabergolina. Negli altri due casi invece si trattava di pazienti affetti da acromegalia. Una ragazza di 26 anni sottoposta a chirurgia con esito non radicale per GHoma, terapia medica con cabergolina e Pegvisomant e successiva radioterapia. La paziente è stata inoltre sottoposta ad asportazione di feocromocitoma bilaterale e nodulo tiroideo (variante follicolare del papillare).

Infine un ragazzo di 16 anni con anamnesi familiare negativa, affetto da macroadenoma ipofisario GH secernente sottoposto a chirurgia e radioterapia e feocromocitoma bilaterale metastatico.

2. CT characteristics of Pheochromocytoma - relevance for the evaluation of adrenal incidentaloma”

2.1 Scopo

In questa tesi sono riportati i risultati di due studi ai quali ho preso parte durante il mio Dottorato di Ricerca.

Il primo è lo studio denominato “CT characteristics of Pheochromocytoma - Relevance for the evaluation of adrenal incidentaloma” che ho condotto durante i sei mesi trascorsi in Olanda presso la Radboud University di Nijmegen. In quel periodo ho collaborato con il Professor Henri Timmers, Endocrinologo esperto in patologie surrenaliche con il quale avevo già avuto modo di lavorare nell’ambito della rete Europea per lo studio dei tumori surrenalici (ENS@T).

Durante un precedente congresso della nostra rete, il Professor Timmers aveva proposto questo studio collaborativo rivolto alla valutazione delle caratteristiche radiologiche TC dei FEO con lo scopo finale di rispondere ad un quesito sollevato dalle linee guida ESE (European Society of Endocrinology)/ENS@T ⁷ sulla gestione dell’incidentaloma surrenalico.

Nelle linee guida infatti viene consigliato di effettuare le indagini biochimiche per escludere la natura cromaffine della lesione in tutti i casi di incidentaloma surrenalico. Gli autori riportano due studi che, su piccoli numeri, hanno dimostrato che caratteristiche TC tipiche per adenoma potrebbero essere sufficienti per evitare l’effettuazione dei dosaggi di metanefrina e normetanefrina, rivolte ad escludere la presenza di un feocromocitoma.

Il nostro è ad oggi il più ampio studio multicentrico retrospettivo volto a valutare la proporzione di FEO con caratteristiche TC analoghe ad adenoma surrenalico ed a rispondere quindi al quesito se sia necessario effettuare le indagini biochimiche per escludere FEO/PGL in tutti i casi di incidentaloma.

2.2 Materiali e metodi

Abbiamo incluso nello studio pazienti con esame istologico positivo per FEO (singolo o multiplo) sottoposti ad uno studio TC pre-operatorio: TC diretta, TC diretta e con mdc o TC con mdc ed acquisizione in 3 fasi. Quest'ultima metodica è quella che meglio riesce a valutare una lesione surrenalica e prevede la misurazione dell'attenuazione espressa in HU prima dell'iniezione del mdc, dopo 60 secondi (fase precoce) e dopo 10-15 minuti (fase tardiva) (Fig.5).

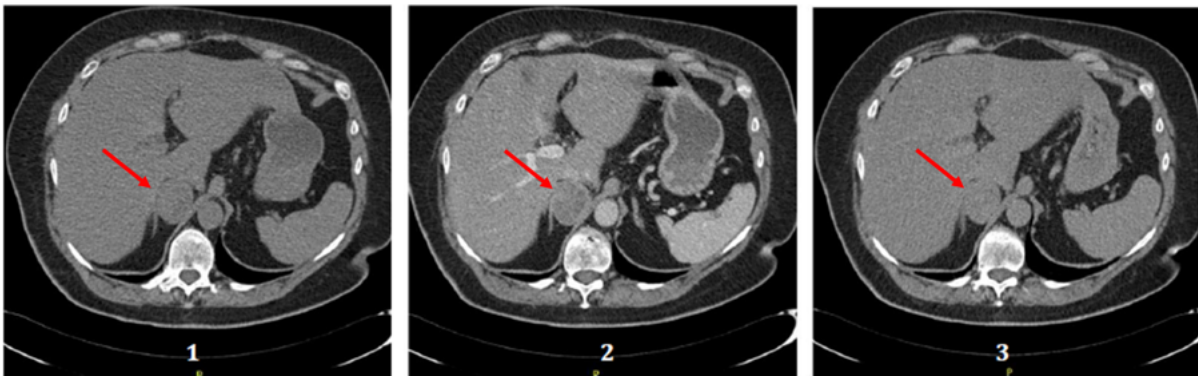


Fig.5: TC con mdc ed acquisizione in 3 fasi. 1 acquisizione diretta; 2 acquisizione in fase precoce a distanza di 60 secondi dall'iniezione del mdc; 3 acquisizione tardiva a distanza di 10-15 minuti dalla somministrazione del contrasto.

Sono stati esclusi i pazienti per i quali era disponibile solo una TC con mdc. Tutti i pazienti inclusi sono stati valutati e trattati presso un Centro ENS@T: Mayo Clinic (n=153), Rochester, USA; Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands (n=46); University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia (n=43); Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania (n=42); Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland (n=33); CHU de Bordeaux, Pessac, France (n=29); University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands (n=21); University Hospital of Florence, Florence, Italy (n=21); University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom (n=20); Center hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Canada (n=19); Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

(n=17); University Hospital of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany (n=17); University Hospital of Krakow, Krakow, Poland (n=16); Cambridge University Hospitals, Cambridge, United Kingdom (n=12); Endocrinology in Charlottenburg, Berlin, Germany (n=12); Center Hospitalier Universitaire de Liege, Liege, Belgium (n=10); Medizinische Klinik und Poliklinik IV Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany (n=10); Hospital General Universitario de Albacete, Albacete, Spain (n=5). Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato quando necessario. I criteri di inclusione sono stati: età maggiore di 18 anni, diagnosi dopo il 2000, disponibilità del referto TC e di informazioni cliniche relative al paziente.

La valutazione biochimica della lesione, tramite dosaggio delle metanefrine plasmatiche o sulle urine delle 24 ore, è stata effettuata presso ogni Centro e valutata tenendo conto dei valori di riferimento locali. Il fenotipo biochimico è stato categorizzato in “adrenergico” o “noradrenergico” in accordo con Eisenhofer et al.¹³¹. Il fenotipo è stato definito “adrenergico” quando l’incremento della metanefrina superava di almeno il 5% la somma dell’eccesso di metanefrina e normetanefrina. I pazienti nei quali questo criterio non poteva essere soddisfatto ma che comunque avevano un valore di normetanefrina al di sopra del limite, sono stati definiti con fenotipo “noradrenergico”.

Le indagini TC sono state effettuate per ciascun paziente nel Centro di appartenenza e pertanto sono state eseguite in base ai protocolli locali per quanto concerne l’iniezione del mdc, l’acquisizione e la ricostruzione delle immagini e l’identificazione della ROI (region of interest) per la misurazione delle HU.

Presso la Sezione di Endocrinologia del Dipartimento di Medicina Interna della Radboud University, io ed un altro operatore, abbiamo valutato in maniera indipendente i referti delle TC. Nei casi in cui venivano menzionati più valori di attenuazione, abbiamo considerato quello più alto. Quando i valori di APW (absolute percentage washout) e RPW (relative percentage

washout) non erano menzionati ma erano invece disponibili i valori di HU nelle diverse fasi di acquisizione, li abbiamo valutati con le seguenti formule:

$$APW = \frac{HU \text{ precoce} - HU \text{ fase tardiva}}{HU \text{ fase precoce} - HU \text{ prima mdc}} \times 100\%$$

$$RPW = \frac{HU \text{ fase precoce} - HU \text{ fase tardiva}}{HU \text{ fase precoce}} \times 100\%$$

I FEO sono stato classificati come ACA-like (analoghi ad adenoma surrenalico), considerando le caratteristiche TC quantitative riportate nei referti, se: attenuazione alla TC diretta ≤ 10 HU o attenuazione alla TC diretta > 10 HU e $APW \geq 60\%$ e/o $RPW \geq 40\%$.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS 17.0 per windows. Abbiamo comparato le caratteristiche cliniche tra pazienti con e senza un'attenuazione compatibile con adenoma tenendo in considerazione le caratteristiche TC quantitative. Per le variabili continue è stato utilizzato il t-test e per le variabili categoriali il Chi-quadro. Un valore $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

2.3 Risultati

I 18 centri partecipanti hanno identificato 1011 casi da poter includere nello studio ed hanno escluso, già a livello locale, 407 casi. Il principale motivo di esclusione è stata la sola disponibilità di informazioni riguardanti la TC dopo mdc (305 casi). Dopo la revisione centrale effettuata a Nijmegen abbiamo escluso altri 71 casi a causa di: età inferiore ai 18 anni (n=5), indisponibilità del referto TC (n=21), referto TC incompleto (n=14), solo TC con mdc (n=2), mancanza della conferma istologica di FEO (n=4), PGL (tumori cromaffini extrasurrenali) (n=25) (Fig.6).

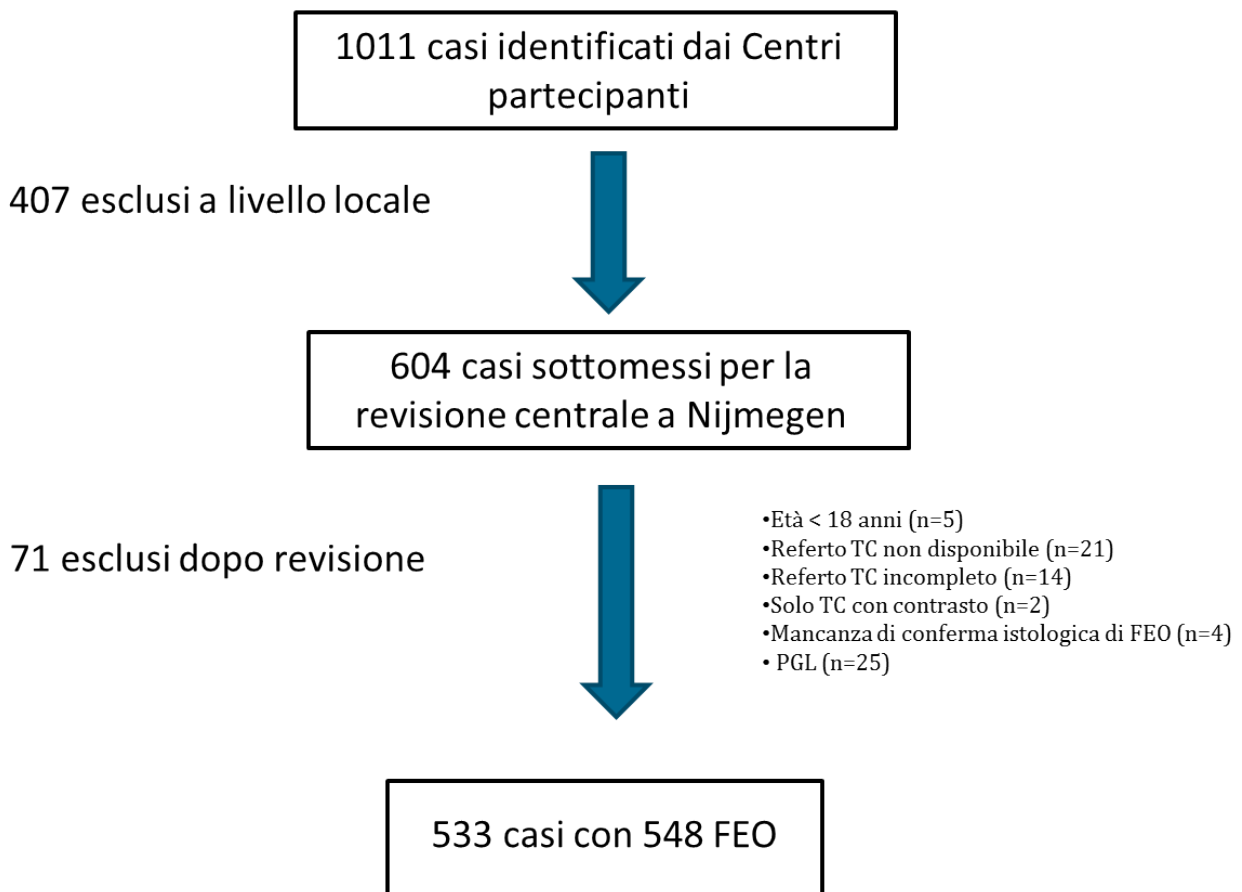


Fig.6: processo di selezione dei 533 pazienti affetti da 548 FEO inclusi nello studio.

La valutazione dei protocolli TC utilizzati, ha mostrato che solamente nel 27% dei casi (n=148) è stato utilizzato il protocollo più adatto per la valutazione delle lesioni surrenaliche (TC con mdc ed acquisizione in 3 fasi). Anche in questi casi però, su un totale di 148 referti, i

valori di attenuazione alla TC diretta e la valutazione del washout, sono stati valutati entrambi solamente in 77 casi (52%) (Tab. 7).

			Protocollo TC, nr (%)			
			TC diretta 94 (17,2)	TC diretta e con mdc 117 (21,4)	TC con mdc (3 fasi) 148 (27,0)	Non noto 189 (34,5)
Dati quantitativi disponibili, n (%)	Solo HU senza mdc	298 (54,4)	55 (58,5)	40 (34,2)	24 (16,2)	179 (94,7)
	HU senza mdc e APW/RPW	78 (14,2)			77 (52,0)	1 (0,5)
	Solo APW/RPW	6 (1,1)			6 (4,1)	
	Nessun dato quantitativo	166 (30,3)	39 (41,5)	77 (65,8)	41(27,7)	9 (4,8)

Tab.7: protocollo TC effettuato (diretta, diretta e con mdc, con mdc in 3 fasi, non noto) e dati quantitativi disponibili nel referto. HU: Hunsfield Units, APW: absolute percentage washout, RPW: relative percentage washout.

Analizzando i referti TC, abbiamo osservato che la descrizione delle caratteristiche quantitative era disponibile solo per 368 pazienti con 382 FEO (HU alla TC diretta +/- washout disponibili in 376 FEO + washout disponibile in 6 FEO con HU non disponibili) (Fig.7).

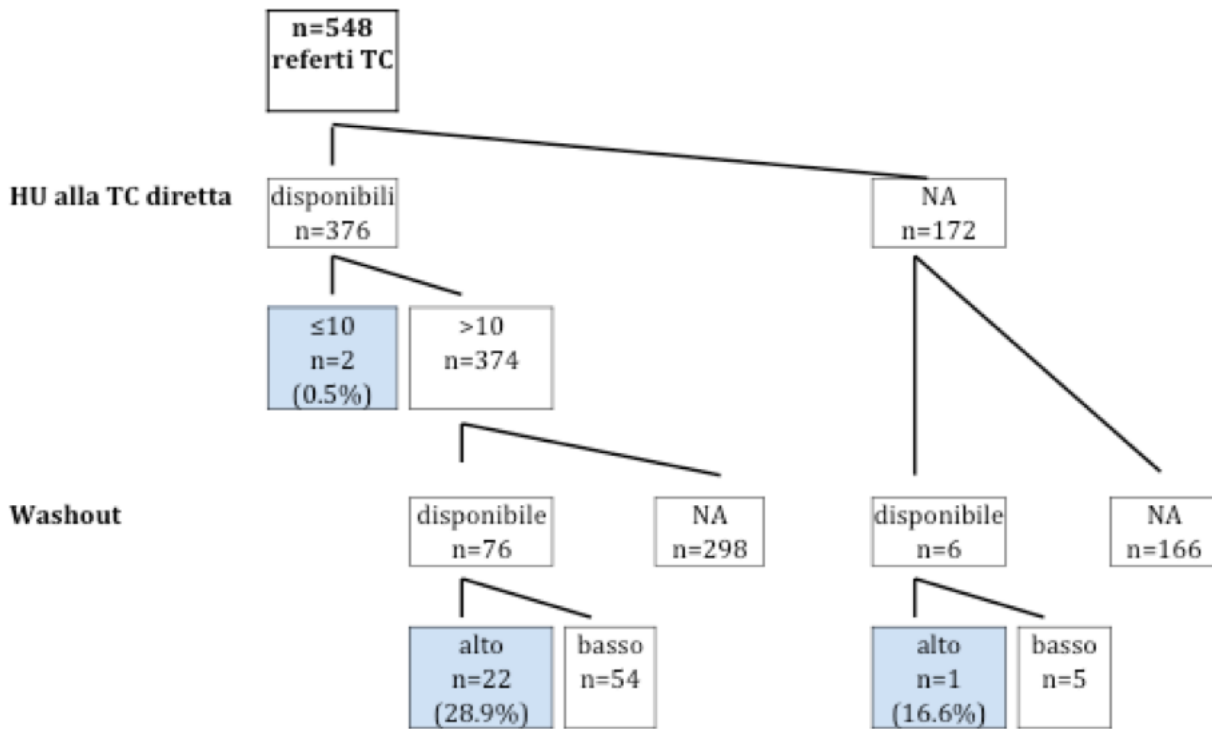


Fig.7: dati quantitativi disponibili nei 548 referti TC e selezione dei casi con caratteristiche compatibili con adenoma. HU: Hunsfield Units, APW: absolute percentage washout, RPW: relative percentage washout, NA: not available.

Considerando solo i 368 pazienti per i quali erano disponibili le caratteristiche TC quantitative, il 44.2% (n=163) erano maschi e l'età media alla diagnosi è stata di circa 54 anni. Più della metà dei pazienti presentava un fenotipo biochimico "adrenergico" (n=200, 54.3%) ed il 60% era affetto da una mutazione a carico di uno dei geni di suscettibilità. Il diametro medio delle lesioni era di 42.73 mm \pm 21.96. Il valore di attenuazione alla TC diretta era in media di 35.04 HU \pm 10.95 (Tab.8) (Fig.8).

n 368

Sesso: maschi (%)	163 (44.2)
Età alla diagnosi: media±SD (anni)	54.01±15.05
Fenotipo biochimico: n (%)	
Adrenergico	200 (54.3)
Noradrenergico	111 (30.1)
Valori nella norma	18 (4.8)
NA	39 (10.5)
Sindrome ereditaria: n (%)	60 (16.3)
Diametro massimo: media±SD (mm)	42.73±21.96 (n=306)
Attenuazione alla TC diretta media±SD (HU)	35.04±10.95 (n=375)

Tab.8: caratteristiche dei pazienti (n=368) e dei FEO (n=382) per i quali erano disponibili le caratteristiche TC quantitative.

*RET (n=32), VHL (n=11), NF1 (n=11), SDHB (n=2), SDHD (n=2), MAX (n=1) and SDHAF2 (n=1).

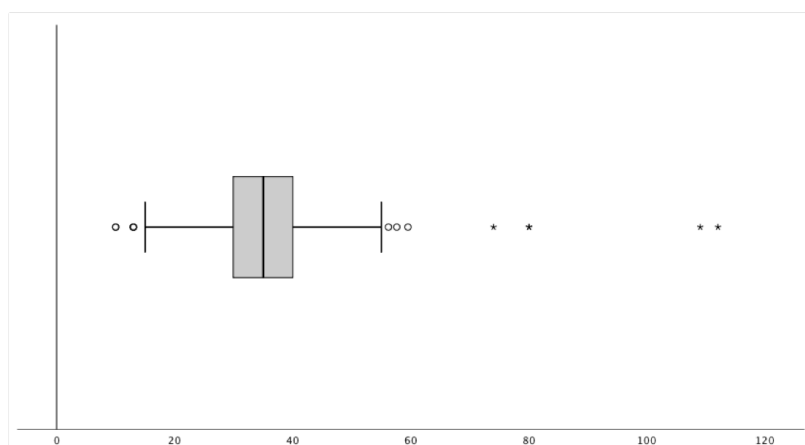


Fig.8: distribuzione dei valori di attenuazione alla TC diretta (HU).

Dei 376 FEO per i quali nei referti erano riportate le HU alla TC diretta, 374 (99.5%) avevano

un valore > 10 HU. In due casi (0.5%) il valore riportato era esattamente di 10 HU che corrisponde al cut-off comunemente utilizzato per fare diagnosi di adenoma. (Tab.9).

	ID	Età alla diagnosi	Genere	Fenotipo biochimico	Analisi genetica	Mutazione germinale	Localizzazione	Diametro massimo (mm)	Attenuazione (HU)	Washout assoluto (%)	Washout relativo (%)	Forma tumorale	Contorni ben definiti?	Omogeneità	Giudizio del Radiologo locale: adenomali-like SI/NO	
HU	1	41	M	Valori normali	Si	Analisi negativa	Destra	42	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	2	69	F	Non noto	No	-	Sinistra	48	10	NA	NA	NA	NA	No	Si	
APW/RPW	3	54	F	Adrenergico	Si	Analisi negativa	Sinistra	37	50	80	40	Sferica	NA	NA	No	
	4	58	F	Adrenergico	Si	Analisi negativa	Destra	20	35	70,8	50,8	NA	NA	NA	Si	
	5	76	M	Noradrenergico	Si	Analisi negativa	Sinistra	48	NA	68,6	50,7	NA	NA	NA	Si	
	6	42	F	Non noto	No	-	Destra	28	38	77,8	42,2	Sferica	Si	NA	Si	
	7	58	F	Valori normali	No	-	Sinistra	12	20	78	54,3	NA	NA	NA	Si	
	8	56	M	Noradrenergico	No	-	Destra	28	32	64	45,5	NA	NA	NA	Si	
	9	65	F	Adrenergico	Si	Analisi negativa	Destra	20	30	67	53	NA	NA	No	Si	
	10	38	F	Adrenergico	Si	Analisi negativa	Sinistra	40	35	61,5	46	NA	NA	No	No	
	11	61	F	Noradrenergico	No	-	Sinistra	16	37	60	42	NA	NA	NA	No	
	12	46	F	Noradrenergico	No	-	Destra	35	17	61,4	51,4	Ovale	Si	No	No	
	13	46	M	Adrenergico	No	-	Destra	53,5	20,5	62,2	40,4	Ovale	Si	No	NA	
	14	40	F	Adrenergico	No	-	Sinistra	30	32	64,9	48,8	NA	NA	Si	NA	
	15	57	F	Noradrenergico	No	-	Destra	55,5	18,5	73,7	62,4	Ovale	Si	Si	NA	
	16	70	F	Noradrenergico	No	-	Destra	25,4	33,5	78	43,2	NA	Si	No	NA	
	17	60	M	Non noto	No	-	Sinistra	35	40	84,8	56,3	NA	NA	NA	NA	
	18	55	F	Noradrenergico	Si	Analisi negativa	Destra	57	39	78,5	49	Ovale	NA	No	NA	
	19	26	F	Adrenergico	Si	RET	Destra	19	38	78,6	41,3	NA	NA	NA	NA	
	20	30	F	Adrenergico	Si	NF1	Sinistra	45	52	60,5	27,4	NA	NA	No	No	
	21	40	F	Noradrenergico	Si	Analisi negativa	Sinistra	28	80	60	NA	NA	NA	NA	No	No
	22	38	F	Adrenergico	Si	SDHAF2	Sinistra	21	44	71	29,3	NA	NA	NA	NA	NA
	23	47	F	Adrenergico	No	-	Destra	42,7	40,5	75,9	31,9	Sferica-Ovale	Si	No	NA	
	24	40	M	Adrenergico	Si	Analisi negativa	Destra	NA	40	70	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	25	55	F	Adrenergico	No	-	Sinistra	48	13	64	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tab.9: caratteristiche delle lesioni compatibili con adenoma in base ai valori di attenuazione alla TC diretta e/o ai valori di washout.

Abbiamo rivalutato il referto istologico di queste due lesioni e abbiamo visto che nel primo caso si trattava di un FEO con un'area centrale molto estesa di emorragia; nel secondo caso invece a carico della surrene era presente una lesione mista composta da un FEO associato ad un'area di iperplasia nodulare.

Tra i 76 FEO con HU alla TC diretta non compatibili con adenoma (> 10) e valori di washout disponibili, 22 (28.9%) avevano un AWP $\geq 60\%$ e/o RPW $\geq 40\%$, suggestivo per adenoma.

Un altro FEO per il quale non erano disponibili le HU, presentava valori elevati di APW/RPW. I radiologi dei diversi Centri hanno inoltre descritto come ACA-like altri 6 FEO ma le ragioni di questa conclusione non sono chiare visto che i valori relativi al washout non erano disponibili e nei due casi nei quali le HU alla TC diretta sono state menzionate, il loro valore risultava superiore a 10.

Comparando i FEO con HU alla TC diretta superiori a 10 ed elevato washout (n=22) con quelli con HU > 10 e basso washout (n=54), non sono state riscontrate differenze significative in relazione a sesso, dimensioni della lesione e presenza o meno di mutazioni a carico dei geni di suscettibilità.

Dei 548 FEO inclusi nello studio, 282 (51.4%) sono stati riscontrati incidentalmente in 276 pazienti. In questo sottogruppi 1 lesione tra le 199 (0.5%) con dati TC quantitativi disponibili, aveva come valore di HU alla TC diretta 10. Considerando i 29 FEO con HU alla TC diretta > 10 e washout disponibile, 10 (34.4%) avevano valori elevati di APW e/o RPW.

2.4 Discussione

Nello studio “CT characteristics of Pheochromocytoma – Relevance for the evaluation of adrenal incidentaloma” abbiamo valutato retrospettivamente i referti del più ampio numero di FEO presente in letteratura. Il nostro obiettivo principale è stato quello di valutare la proporzione di FEO con caratteristiche TC analoghe ad adenoma (HU alla TC diretta ≤ 10 o elevati valori di washout) nella nostra coorte. I valori di attenuazione erano disponibili per 376 su 548 FEO e due di questi (0.5%) avevano un’attenuazione all’acquisizione diretta di esattamente 10 HU. Oltre a queste due lesioni, dei 76 FEO con HU > 10 e valori di washout disponibili, 22 (28.9%) presentavano valori elevati di washout, suggerendo in maniera errata la natura adenomatosa della lesione surrenalica. Nel 2016 sono state pubblicate le linee guida ESE/ENS@T ⁷ per la gestione dei pazienti affetti da incidentaloma surrenalico, nelle quali veniva raccomandata l’esclusione della presenza di una lesione cromaffine tramite la determinazione delle metanefrine plasmatiche o urinarie in tutti i pazienti. Nonostante questa raccomandazione, gli autori hanno riportato i dati di due precedenti studi nei quali si ipotizzava di poter evitare tali test biochimici in quei pazienti nei quali l’attenuazione alla TC diretta fosse risultata ≤ 10 HU ^{132 133}. L’evidenza a supporto di questa possibile eccezione era però molto bassa. Sane et al. hanno valutato se fosse possibile escludere la presenza di un FEO solo basandosi sui valori di attenuazione basale. Per farlo hanno condotto uno studio retrospettivo nel quale hanno incluso 174 pazienti con incidentaloma surrenalico. I valori di HU alla TC diretta erano disponibili solo per 115 pazienti; nove presentavano un FEO ed in nessuno di questi i valori erano risultati < 10 HU. Gli autori hanno quindi concluso che non è necessario effettuare routinariamente il dosaggio delle metanefrine plasmatiche o urinarie nei pazienti asintomatici con incidentaloma surrenalico a patto che la lesione presenti bassi valori di attenuazione basale, sia piccola ed omogenea. Il lavoro di Schalin-Jantti C et al. ¹³³ ha riportato i risultati di uno studio prospettico durato 5 anni teso a valutare il follow-up di 56

pazienti affetti da 69 incidentalomi surrenalici ricchi in lipidi (presentazione classica che determina bassi valori di HU alla TC diretta). Lo studio ha dimostrato che i valori di metanefrine sulle urine delle 24 ore erano nella norma al baseline e si sono mantenuti tali nei 5 anni successivi. Un altro studio ⁷² ha riportato risultati analoghi includendo 251 pazienti nei quali era stata riscontrata incidentalmente la presenza di una massa surrenalica; gli autori hanno concluso infatti che nel caso di lesioni di piccole dimensioni (≤ 3 cm) la TC diretta è in grado di sostituire i test biochimici per escludere la presenza di FEO. Le conclusioni di questi studi sono basate su un esiguo numero di FEO compreso in gruppi più ampi di pazienti affetti da incidentaloma surrenalico. Nel nostro studio invece abbiamo utilizzato come criterio di inclusione la conferma istologica di FEO. Lo stesso criterio ha rappresentato il punto di partenza di un altro studio ¹³⁴ retrospettivo nel quale gli autori hanno incluso 214 pazienti affetti da 222 FEO istologicamente confermati. Le immagini TC delle lesioni sono state rivalutate in maniera indipendente da due radiologi esperti. Solamente in uno su 222 FEO è stato misurato un valore di attenuazione all'acquisizione diretta < 10 HU. In particolare si trattava di un raro caso di malattia di Cushing ACTH-indipendente causata da un FEO. Nel nostro studio la proporzione di FEO con aspetto radiologico analogo ad adenoma è risultata bassa (n=2, 0.5%) ed in linea con i dati di questo recente studio di Buitenwerf et al. ¹³⁴. In entrambi i casi da noi identificati, l'aspetto istologico delle lesioni ci ha fornito una possibile spiegazione del valore di HU compatibile con adenoma; la presenza di emorragia, necrosi e alterazioni della componente corticale ¹³⁵ possono essere responsabili di un aspetto eterogeneo della lesione. Questo aspetto ci induce a sottolineare come sia di fondamentale importanza la corretta selezione della ROI per la valutazione dei valori di attenuazione.

In circa il 70% degli incidentalomi surrenalici i valori di attenuazione alla TC diretta risultano ≤ 10 HU, ciò significa che in più della metà dei pazienti la valutazione delle caratteristiche radiologiche potrebbe permettere di evitare lo screening biochimico per escludere la

presenza di un FEO ¹³⁶.

In considerazione della prevalenza del FEO tra gli incidentalomi surrenalici (7%), dovremmo effettuare la valutazione biochimica in circa 2000 pazienti con riscontro incidentale di massa surrenalica e valore di attenuazione basale ≤ 10 per diagnosticare un FEO. Questa osservazione potrebbe giustificare l'omissione dei test biochimici negli incidentalomi surrenalici con bassi valori di attenuazione alla TC diretta al fine di evitare falsi positivi e costi non necessari. In termini economici infatti, considerando che il dosaggio delle metanefrine ha un costo di circa 50 USD, evitare di effettuarlo in tutti gli incidentalomi equivarrebbe a ridurre la spesa di circa 100.000 USD.

Nonostante le indicazioni delle linee guida ⁷, per la valutazione della natura delle lesioni surrenaliche nella comune pratica oltre ai valori di HU alla TC diretta vengono presi in considerazione anche i valori di washout. La maggior parte degli adenomi surrenalici con valori basali di HU $>$ di 10 presentano alti valori di washout. Al contrario, alti valori di washout non escludono la presenza di FEO. Dai nostri dati è emerso che più di un terzo dei FEO, tra quelli per i quali erano riportati nei referti i valori di washout, presenta valori elevati di APW/RPW. Questi risultati sono in linea con una metanalisi condotta su 10 studi ¹³⁷ che ha riportato una percentuale di FEO con elevato washout del 35%. In base a questi dati quindi i valori di washout degli incidentalomi surrenalici non dovrebbero essere utilizzati per decidere se sia utile o meno effettuare test biochimici specifici.

Questo studio presenta delle limitazioni. Si tratta infatti di uno studio retrospettivo nel quale abbiamo valutato i referti delle TC provenienti da diversi Centri nei quali queste indagini sono state effettuate utilizzando differenti apparecchiature e protocolli. Infatti l'utilizzo di diverse apparecchiature potrebbe indurre una lieve variazione nella valutazione dell'attenuazione ma non tale da influenzare la classificazione delle lesioni poiché quasi tutti i feocromocitomi dimostrano un valore di attenuazione molto al di sopra del valore soglia di 10 HU. Inoltre

nello studio di Buitenwerf et al. ¹³⁴ è stata dimostrata una concordanza perfetta alla valutazione delle immagini TC, che ha previsto anche il disegno della ROI, da parte di due operatori indipendenti.

Le variazioni dell'attenuazione tra diverse apparecchiature TC con differenti impostazioni non superano le 2 HU ¹³⁸.

Molti casi sono stati esclusi per la disponibilità di un referto sul quale erano presenti solamente informazioni relative all'acquisizione post iniezione del mdc. Nei referti inoltre molti dati quantitativi non sono stati riportati limitando pertanto i dati disponibili. D'altro canto, i dati riportati in questo studio derivano direttamente dalla pratica clinica e sono quindi rappresentativi della vita reale.

2.5 Conclusioni

In considerazione dell'assenza di FEO con attenuazione basale < 10 HU e della bassa percentuale (0.5%) di FEO con HU =10, sembra ragionevole astenersi dall'effettuazione di test biochimici per escludere la presenza di FEO nel caso di incidentalomi surrenalici con HU ≤ 10 . La valutazione del washout invece non è utile per escludere la natura cromaffine della lesione.

3. “Feocromocitoma/paraganglioma ed altre neoplasie. Studio multicentrico retrospettivo e confronto con la popolazione generale”

3.1 Scopo

Il secondo studio presentato in questa tesi nasce dalla collaborazione di 10 Centri Italiani di Endocrinologia che si occupano di FEO/PGL. Anche in questo caso si tratta di uno studio multicentrico retrospettivo, volto a valutare quali siano le seconde neoplasie presenti in pazienti affetti da FEO/PGL, se vi siano dei fattori predisponenti, se l'incidenza di neoplasie associate nella nostra coorte sia maggiore rispetto all'incidenza di neoplasie maligne presenti nella popolazione generale (dati tratti dal registro AIRTUM 2008 ¹³⁹) e se nei nostri pazienti ci sia un maggior rischio di sviluppare una seconda neoplasia maligna rispetto alla popolazione generale (registro AIRTUM 2013 ¹⁴⁰).

3.2 Materiali e metodi

In questo studio sono stati inclusi pazienti affetti da FEO/PGL valutati presso 10 Centri italiani di Endocrinologia: Istituto Oncologico Veneto IRCCS, Padova (n=251); Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, AOU Careggi, Firenze (n=164); Centro Specialistico Ipertensioni Secondarie, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università di Roma "Sapienza", Policlinico Umberto I, Roma (n=57); Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Città della Salute e della Scienza, Torino e Endocrinologia Oncologica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Città della Salute e della Scienza, Torino (n=52); Medicina Interna ed Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, AOU San Luigi, Orbassano Torino (n=48); Endocrinologia AO S. Croce e Carle, Cuneo (n=26); Unità di Endocrinologia Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma (n=18); Medicina Interna e Ipertensione, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Città della Salute e della Scienza, Torino (n=15); Endocrinologia, AO Ordine Mauriziano, Torino (n=12); Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Università Roma "Sapienza", Ospedale Sant'Andrea, Roma (n=9).

Sono stati inclusi 652 pazienti valutati tra il 1962 ed il 2017 per i quali fossero disponibili informazioni cliniche e che avessero effettuato un follow up dopo la diagnosi di patologia cromaffine di almeno 12 mesi. Sono stati inclusi sia pazienti operati con diagnosi istologica di FEO/PGL, sia pazienti non operati con diagnosi strumentale e/o laboratoristica di patologia cromaffine. Sono stati esclusi dallo studio pazienti affetti da VHL, MEN2 ed NF1. Non tutti i pazienti inclusi sono stati sottoposti ad analisi genetica. Nella nostra popolazione abbiamo valutato la comparsa di neoplasie associate a FEO/PGL, sia maligne che benigne, comparse prima o dopo lo sviluppo della patologia cromaffine.

Abbiamo valutato se vi fossero differenze tra pazienti con lesioni di natura simpatica e

parasimpatica, e se alcuni fattori avessero influenzato lo sviluppo della neoplasia associata.

Abbiamo infine confrontato l'incidenza di seconde neoplasie maligne nella nostra popolazione rispetto all'incidenza di tumori maligni nella popolazione generale (dati del registro AIRTUM 2008 ¹³⁹) e rispetto all'incidenza di secondi tumori maligni sempre in popolazione generale (dati del registro AIRTUM del 2013 ¹⁴⁰).

Le analisi sono state effettuate con R versione 3.5.0. Le variabili continue sono state descritte utilizzando la mediana ed il range interquartile come misura di variabilità; le variabili categoriche con frequenze e percentuali. Le differenze tra gruppi sono state testate con il test di Mann-Whitney per le variabili continue ed il test Chi-quadrato, o test di Fisher quando opportuno, per le variabili categoriche. Per valutare i fattori associati al rischio di seconda neoplasia è stata condotta un'analisi univariata per stimare l'hazard ratio ed il corrispondente intervallo di confidenza al 95% con il modello a rischi proporzionali di Cox. Sulla base dei fattori di rischio identificati nell'analisi univariata, è stata successivamente condotta un'analisi multivariata. Tutte le possibili combinazioni dei fattori di rischio identificati sono state valutate e la selezione del modello finale è stata effettuata utilizzando l'Akaike Information Criterion. Per verificare l'assunzione di proporzionalità dei rischi è stato utilizzato il metodo basato sui residui di Schoenfeld. Infine, il rapporto di incidenza di seconde neoplasie standardizzato per età è stato calcolato in riferimento ai dati di incidenza sulla popolazione italiana ^{139,140}.

3.3 Risultati

In questo studio sono stati inclusi 652 pazienti affetti da FEO/PGL di cui 291 (44.6%) maschi. La mediana dell'età alla diagnosi è stata di 50 anni [37.00-61.00]. Suddividendo la nostra popolazione per fasce di età, la maggior parte dei pazienti (n 309, 48,4%) erano compresi nella fascia di età 0-49, 155 (24.3%) nella fascia 50-59, 169 nel range 60-79 (26.4%) e 6 (0.9%) nel gruppo dei grandi anziani (>80 anni). In 165 casi (25.3%) i pazienti erano affetti da HNPG, 476 (73.0%) presentavano FEO/PGL di torace o addome e 11 (1.7%) avevano sia lesioni di natura simpatergica che parasimpatergica. La mediana di mesi di follow up è stata di 44.50 mesi [12.00-101.25].

Considerando solo i pazienti affetti da FEO/PGL (n 476) e da FEO/PGL associato ad HNPG (n 11), sono risultati secernenti 347 casi versus 17 non secernenti. In 123 casi non stati riportati dati al riguardo della secrezione da parte della lesione.

Quarantuno (6.3%) dei 652 pazienti inclusi nello studio hanno presentato metastasi a distanza.

Per 649 pazienti erano disponibili dati sulla familiarità per neoplasie; 226 (34.8%) pazienti avevano un familiare affetto da neoplasia, mentre la storia familiare era negativa nella maggior parte dei casi (n 423, 65.2%).

Abbiamo valutato inoltre l'esposizione ad alcool, fumo e sostanze tossiche della nostra popolazione. Centotrentasei pazienti (22.6%) sui 602 per i quali il dato era disponibile sono risultati fumatori mentre la maggior parte, n 466 (77.4%), non aveva mai fumato.

Anche per quanto riguarda l'assunzione di alcool, la maggior parte della nostra popolazione non è risultata esposta a questo fattore di rischio (n 582/609, 95.5%).

L'esposizione a sostanze tossiche, ad esempio per motivi lavorativi, è risultata riguardare solo

una piccola parte della popolazione in esame (n 29/609, 4.8%).

Successivamente abbiamo valutato il risultato dell'analisi genetica nei 466 pazienti nei quali è stata effettuata. Abbiamo considerato i pazienti nei quali fossero stati analizzati almeno i geni codificanti per la succinato deidrogenasi, MAX e TMEM127. Dall'analisi 138 pazienti sono risultati portatori di mutazione: 71 SDHD (51.4%), 34 SDHB (24.7%), 12 MAX (8.7%), 9 TMEM127 (6.6%), 7 SDHC (5.0%), 4 SDHA (2.9%) e 1 SDHAF2 (0.8%). Suddividendo i pazienti portatori di mutazione in Cluster, 117 (84.8%) sono risultati appartenere al Cluster 1 e 21 (15.2%) al Cluster 2.

Centodiciotto pazienti (18.0%), oltre alla patologia cromaffine hanno presentato, prima o dopo la diagnosi di FEO/PGL, un'altra neoplasia risultata maligna in 76 casi (64.4%) (Tab.10).

<i>Neoplasie associate</i>	<i>Altra neoplasia, n (%)</i>	<i>Altra neoplasia maligna, n (%)</i>
Mammella	12 (10.2)	11 (14.5)
Colon retto ano	12 (10.2)	7 (9.2)
Tiroide	10 (8.5)	9 (11.8)
Corpo uterino	8 (6.8)	3 (3.9)
Cervello e SNC	8 (6.8)	-
Melanoma	8 (6.8)	8 (10.5)
Prostata	8 (6.8)	7 (9.2)
Polmoni e bronchi	7 (5.9)	4 (5.3)
Cute ed annessi	6 (5.1)	5 (6.6)
Rene ed altri organi urinari	5 (4.2)	5 (6.6)
Vescica	5 (4.2)	3 (4.0)
Altro	5 (4.2)	-
Testa e collo	4 (3.4)	1 (1.3)
Ovaio	3 (2.5)	3 (4.0)

Mieloma multiplo	3 (2.5)	3 (4.0)
Neoplasie ematologiche	3 (2.5)	2 (2.6)
Stomaco	3 (2.5)	-
Cervice uterina	1 (0.8)	-
Lingua	1 (0.8)	-
Fegato	1 (0.8)	-
Colecisti	1 (0.8)	1 (1.3)
Pancreas	1 (0.8)	1 (1.3)
Laringe	1 (0.8)	1 (1.3)
Testicolo	1 (0.8)	1 (1.3)
Bocca	1 (0.8)	1 (1.3)

Tab.10: neoplasie associate a FEO/PGL (colonna 1); neoplasie maligne associate a FEO/PGL (colonna 2).

Ottantaquattro dei 118 pazienti con altra neoplasia sono stati sottoposti ad analisi genetica: 67 analisi negativa (79.8%), 6 *SDHD* (7.14%), 4 *TMEN127* (4.8%), 3 *MAX* (3.6%), 2 *SDHB* (2.4%), 1 *SDHC* (1.19%) ed 1 *SDHA* (1.19%).

Considerando invece il gruppo dei 76 pazienti con neoplasia maligna, 50 sono stati sottoposti ad analisi genetica: 43 analisi negativa (86.0%), 3 *SDHD* (6.0%), 2 *TMEN127* (4.0%) e 2 *MAX* (4.0%).

Considerando i pazienti con neoplasia associata per i quali era disponibile la data di diagnosi della seconda neoplasia, la maggior parte l'aveva sviluppata prima o contemporaneamente alla comparsa di FEO/PGL (70/104, 67.3%). Abbiamo ottenuto lo stesso risultato anche considerando solo i pazienti con neoplasia maligna associata (47/70, 67.1%).

Confrontando i 487 pazienti con lesioni di natura simpatica (476 FEO/PGL + 11 FEO/PGL associato ad HNPGL) con 165 pazienti affetti solo ha HNPGL (Tab.11), sono emerse differenze statisticamente significative in termini di sesso ($p=0.003$), anni alla diagnosi ($p=0.011$), malignità della lesione cromaffine ($p=0.028$), familiarità per neoplasie ($p<0.001$), forme

sporadiche ($p < 0.001$), cluster 1 ($p < 0.001$), cluster 2 ($p = 0.002$), associazione tra genetica positiva e familiarità ($p < 0.001$). Dall'analisi è emerso infatti che i pazienti affetti da FEO o PGL di torace/addome rispetto a coloro i quali avevano sviluppato un HNPG, erano più frequentemente maschi, avevano un'età maggiore al momento della diagnosi di lesione cromaffine, avevano presentato più frequentemente metastasi a distanza, erano risultati negativi all'analisi genetica in percentuale maggiore ed appartenevano, quando mutati, prevalentemente al Cluster 2. Al contrario i pazienti affetti da HNPG erano stati prevalentemente classificati nel Cluster 1 ed avevano più frequentemente una storia familiare positiva per neoplasie. Inoltre, l'associazione tra familiarità per neoplasie e genetica positiva era risultata maggiormente presente in questo gruppo di pazienti.

	<i>FEO/PGL torace/addome</i>	<i>HNPGL</i>	<i>p</i>
<i>n</i>	487	165	
<i>Sex = m (%)</i>	234 (48.0)	57 (34.5)	0.003
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL (mean (SD))</i>	49.63 (15.71)	46.00 (15.79)	0.011
<i>0-49 anni</i>	211 (44.4)	98 (59.8)	
<i>50-59 anni</i>	127 (26.7)	28 (17.1)	
<i>60-79 anni</i>	131 (27.6)	38 (23.2)	
<i>80+ anni</i>	6 (1.3)	0 (0.0)	
<i>FEO/PGL metastatico (%)</i>	36 (8.3)	5 (3.1)	0.028
<i>Familiarità per neoplasie (%)</i>	149 (30.8)	77 (46.7)	<0.001
<i>Forme sporadiche (%)</i>	249 (79.8)	79 (51.3)	<0.001
<i>SDHA (%)</i>	2 (0.6)	1 (0.6)	1.000
<i>SDHB (%)</i>	19 (6.1)	14 (9.1)	0.252
<i>SDHC (%)</i>	1 (0.3)	6 (3.9)	0.006
<i>SDHD (%)</i>	19 (6.1)	52 (33.8)	<0.001
<i>SDHAF2 (%)</i>	0 (0.0)	1 (0.6)	0.330
<i>MAX (%)</i>	12 (3.8)	0 (0.0)	0.011
<i>TMEM127 (%)</i>	9 (2.9)	0 (0.0)	0.033
<i>PHD2 (%)</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
<i>cluster1 (%)</i>	42 (13.5)	75 (48.7)	<0.001
<i>cluster2 (%)</i>	21 (6.7)	0 (0.0)	0.002
<i>Neoplasie associate (media (SD))</i>	0.18 (0.39)	0.17 (0.38)	0.664
<i>Neoplasia associata dopo FEO/PGL (media (SD))</i>	0.05 (0.22)	0.05 (0.23)	0.873
<i>Anni dalla diagnosi di FEO/PGL (media (SD))</i>	7.58 (10.31)	6.92 (9.26)	0.775
<i>Neoplasia associata + familiarità (%)</i>	39 (8.0)	14 (8.5)	0.988
<i>Genetica positiva e familiarità (%)</i>	25 (5.2)	26 (15.8)	<0.001
<i>Neoplasia associate maligna (%)</i>	58 (69.0)	16 (59.3)	0.481

Tab.11: confronto tra pazienti affetti da FEO/PGL di torace/addome e pazienti con HNPGL.

All'analisi univariata è stato valutato l'effetto dei singoli fattori sullo sviluppo di neoplasie associate (Tab.12) e neoplasie associate maligne (Tab.13). L'analisi è stata effettuata considerando il diverso tempo di esposizione (mesi di follow up). Sono emerse differenze statisticamente significative tra soggetti che hanno sviluppato una neoplasia associata (n 118), e coloro i quali hanno presentato solo la patologia cromaffine. Infatti i pazienti che hanno presentato neoplasie associate sono risultati avere un'età maggiore al momento della

diagnosi di FEO/PGL (HR=3.362, 95% CI [2.421; 4.669], p<0.001) ed una maggior familiarità positiva per neoplasie (HR 1.523, 95% CI [1.050; 2.210], p=0.027). Dall'analisi inoltre i pazienti con neoplasia associata sono risultati coloro i quali meno frequentemente avevano sviluppato metastasi a distanza da patologia cromaffine (HR 0.200, 95% CI [0.050; 0.802], p=0.023). Per quanto riguarda l'analisi genetica, l'assenza di mutazioni a carico dei geni di suscettibilità è risultata associata allo sviluppo di altre neoplasie (HR 0.222, 95% CI [0.117; 0.419], p<0.001). Inoltre la sottoanalisi effettuata considerando la suddivisione in Cluster, ha evidenziato un'associazione negativa tra seconde neoplasie ed appartenenza al Cluster 1 (HR 0.231, 95% CI [0.114; 0.465], p<0.001).

	<i>HR</i>	<i>95%IC</i>		<i>p</i>
<i>Sex M:F</i>	0.819	0.562	1.194	0.3
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL*</i>	3.362	2.421	4.669	< 0.001
<i>Fasce di età:</i>				
<i>50-59 anni:0-49 anni</i>	2.686	1.640	4.400	< 0.001
<i>60-79 anni:0-49 anni</i>	4.736	2.979	7.529	< 0.001
<i>80+ anni:0-49 anni</i>	12.004	2.828	50.951	< 0.001
<i>FEO/PGL metastatico si:no</i>	0.200	0.050	0.802	0.023
<i>Localizzazione HNPGL:FEO/PGL</i>	0.693	0.448	1.072	0.099
<i>Familiarità per neoplasie si:no</i>	1.523	1.050	2.210	0.027
<i>Analisi genetica mutati:wt</i>	0.222	0.117	0.419	< 0.001
<i>cluster1 positivo:negativo</i>	0.231	0.114	0.465	< 0.001
<i>cluster2 positivo:negativo</i>	0.651	0.258	1.642	0.363
<i>Genetica positiva + familiarità si:no</i>	0.627	0.304	1.296	0.208
<i>Fumo si:no</i>	1.289	0.825	2.012	0.264
<i>Alcool si:no</i>	0.883	0.280	2.782	0.832
<i>Esposizione a sostanze tossiche si:no</i>	1.001	0.367	2.728	0.999

*HR calcolato su una differenza di 24 anni

Tab.12: effetto dei singoli fattori sullo sviluppo di neoplasie associate nei pazienti affetti da FEO/PGL.

Considerando solo i soggetti che hanno sviluppato una neoplasia associata maligna (n 76) e coloro i quali hanno presentato solo la patologia cromaffine, sono emerse differenze statisticamente significative. Infatti una maggior età alla diagnosi di patologia cromaffine è

risultata associata allo sviluppo di altra neoplasia maligna (HR 4.751, 95% CI [3.071; 7.349], p<0.001). Relativamente all'analisi genetica anche in questo gruppo di pazienti una genetica negativa (HR 0.105, 95% CI [0.032; 0.339], p<0.001) e l'assenza di mutazioni a carico dei geni di suscettibilità appartenenti al Cluster 1 (HR 0.131, 95% CI [0.040; 0.427], p<0.001) sono risultati associati allo sviluppo di seconde neoplasie maligne.

	HR	95%IC		p
<i>Sex M:F</i>	0.964	0.605	1.538	0.879
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL*</i>	4.751	3.071	7.349	< 0.001
<i>Fasce di età:</i>				
<i>50-59 anni:0-49 anni</i>	5.102	2.580	10.091	< 0.001
<i>60-79 anni:0-49 anni</i>	8.098	4.179	15.691	< 0.001
<i>80+ anni:0-49 anni</i>	26.182	5.754	119.144	< 0.001
<i>FEO/PGL metastatico si:no</i>	0.337	0.082	1.378	0.13
<i>Localizzazione HNPGL:FEO/PGL</i>	0.672	0.384	1.176	0.164
<i>Familiarità per neoplasie si:no</i>	1.260	0.786	2.019	0.337
<i>Analisi genetica mutati:wt</i>	0.105	0.032	0.339	< 0.001
<i>cluster1 positivo:negativo</i>	0.131	0.040	0.427	< 0.001
<i>cluster2 positivo:negativo</i>	0.448	0.105	1.917	0.279
<i>Genetica positiva + familiarità si:no</i>	0.234	0.057	0.958	0.043
<i>Fumo si:no</i>	1.040	0.575	1.883	0.897
<i>Alcool si:no</i>	0.872	0.214	3.554	0.849
<i>Esposizione a sostanze tossiche si:no</i>	1.132	0.356	3.604	0.834

*HR calcolato su una differenza di 24 anni

Tab.13: effetto dei singoli fattori sullo sviluppo di neoplasie maligne associate nei pazienti affetti da FEO/PGL.

All'analisi multivariata, includendo tutti i 118 pazienti che hanno sviluppato una neoplasia associata (benigna o maligna) ed alcuni fattori derivati dall'analisi statistica, sono risultati statisticamente significativi una maggior età alla diagnosi di FEO/PGL (Effect 2.406, 95% CI [1.437; 4.030], p<0.001), la familiarità positiva per neoplasie (Effect 2.890, 95% CI [1.470; 5.680], p=0.002) e l'assenza di mutazioni a carico dei geni di suscettibilità (Effect 0.409, 95% CI [0.205; 0.816], p=0.011) (Tab.14).

	<i>Effect</i>	<i>95%IC</i>		<i>p</i>
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL</i>	2.406	1.437	4.030	< 0.001
<i>Sex M:F</i>	1.389	0.711	2.713	0.336
<i>Familiarità per neoplasie si:no</i>	2.890	1.470	5.680	0.002
<i>Localizzazione HNPGL:FEO/PGL</i>	1.212	0.588	2.496	0.602
<i>Genetica positiva si:no</i>	0.409	0.205	0.816	0.011

Tab.14: analisi multivariata condotta includendo i pazienti con neoplasia associata a FEO/PGL.

Considerando solo i pazienti con neoplasia associata comparsa successivamente allo sviluppo di FEO/PGL (n 34 casi incidenti), mantiene la significatività solo il risultato negativo dell'analisi genetica (Effect 0.153, 95% CI [0.040; 0.591], p=0.006) (Tab.15).

	<i>Effect</i>	<i>95%IC</i>		<i>p</i>
<i>Analisi genetica positiva si:no</i>	0.153	0.040	0.591	0.006
<i>Analisi genetica positiva + familiarità si:no</i>	1.808	0.374	8.734	0.461
<i>Fumo si:no</i>	0.898	0.328	2.460	0.834

Tab.15: analisi multivariata condotta includendo i pazienti con neoplasia associata sviluppata dopo la comparsa di FEO/PGL.

Includendo nell'analisi solo i 76 pazienti con neoplasia associata di natura maligna, sono risultati statisticamente significativi l'età maggiore alla diagnosi di FEO/PGL (Effect 4.836, 95% CI [2.493; 9.383], p<0.001) ed il risultato negativo dell'analisi genetica (Effect 0.184, 95% CI [0.054; 0.631], p=0.007) (Tab.16).

	<i>Effect</i>	<i>95%IC</i>		<i>p</i>
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL</i>	4.836	2.493	9.383	< 0.001
<i>Sex M:F</i>	1.268	0.611	2.632	0.524
<i>Analisi genetica positiva si:no</i>	0.184	0.054	0.631	0.007
<i>Fumo si:no</i>	1.347	0.528	3.432	0.533
<i>Esposizione a sostanze tossiche si:no</i>	1.221	0.149	9.992	0.852
<i>Localizzazione HNPGL: FEO/PGL</i>	1.257	0.614	2.570	0.532

Tab.16: analisi multivariata condotta includendo i pazienti con neoplasia maligna associata a FEO/PGL.

Ventitrè su 76 pazienti hanno sviluppato una neoplasia maligna dopo la comparsa di FEO/PGL (casi incidenti di seconda neoplasia maligna). In questo sottogruppo di pazienti, all'analisi

multivariata è risultata un'associazione statisticamente significativa tra la patologia neoplastica ed un'età maggiore alla diagnosi di patologia cromaffine (Effect 5.302, 95% CI [1.721; 16.329], p=0.004). Il risultato negativo dell'analisi genetica è risultato al limite della significatività (p=0.067) (Tab.17).

	<i>Effect</i>	<i>95%IC</i>		<i>p</i>
<i>Età alla diagnosi di FEO/PGL</i>	5.302	1.721	16.329	0.004
<i>Sex M:F</i>	1.767	0.575	5.433	0.321
<i>Fumo si:no</i>	1.268	0.254	6.328	0.772
<i>Analisi genetica positiva si:no</i>	0.138	0.017	1.147	0.067
<i>Localizzazione HNPGL: FEO/PGL</i>	1.133	0.336	3.816	0.841

Tab.17: analisi multivariata condotta includendo i pazienti con neoplasia maligna associata sviluppata dopo la comparsa di FEO/PGL.

Confrontando l'incidenza di neoplasie maligne nella nostra popolazione affetta da FEO/PGL (23 casi incidenti) e quella di neoplasie maligne nella popolazione generale ricavando i dati dal registro AIRTUM 2008 ¹³⁹, il tasso di incidenza standardizzato (SIR) è risultato 0.79 [0.43-1.42] nei maschi e 0.93 [0.53-1.64] nelle femmine (Tab.18). Non è quindi emerso nei due sessi un rischio aumentato di seconde neoplasie maligne rispetto alla popolazione generale.

	<i>osservati</i>	<i>attesi</i>	<i>SIR</i>	<i>95%IC</i>	
<i>Maschi</i>	11	13.91	0.79	0.43	1.42
<i>Femmine</i>	12	12.81	0.93	0.53	1.64

Tab.18: confronto tra incidenza di seconde neoplasie nella nostra popolazione e incidenza di neoplasie maligne nella popolazione generale (registro AIRTUM 2008 ¹³⁹).

Includendo anche i casi di neoplasie maligne comparse lo stesso anno del FEO/PGL (n 39), il SIR è risultato 1.37 [0.87-2.15] nei maschi e 1.56 [1.0-2.42] nelle femmine con il riscontro di un rischio aumentato nella popolazione femminile (Tab.19).

	<i>osservati</i>	<i>attesi</i>	<i>SIR</i>	<i>95%IC</i>	
<i>Maschi</i>	19	13.79	1.37	0.87	2.15
<i>Femmine</i>	20	12.80	1.56	1.00	2.42

Tab.19: confronto tra casi incidenti e sincroni di seconde neoplasie nella nostra popolazione e casi incidenti di neoplasie maligne nella popolazione generale (registro AIRTUM 2008 ¹³⁹).

Abbiamo infine confrontato l'incidenza di neoplasie maligne nella nostra popolazione (n 39, sono state incluse le neoplasie maligne diagnosticate dopo almeno due mesi dalla diagnosi di FEO/PGL) con l'incidenza di seconde neoplasie maligne nella popolazione generale (registro AIRTUM 2013 ¹⁴⁰). Il registro infatti, definisce come incidenti le neoplasie diagnosticate dopo due mesi dalla diagnosi del primo tumore. Questo lasso di tempo è definito periodo di sincronicità. In questo caso non è stato possibile, per i dati di popolazione a nostra disposizione, effettuare un confronto suddividendo la popolazione in base al sesso. Abbiamo quindi condotto il confronto considerando solo i tassi età specifici ed il SIR è risultato 0.88 [0.65-1.21] (Tab.20).

	<i>osservati</i>	<i>attesi</i>	<i>SIR</i>	<i>95%IC</i>	
	39	44.12	0.88	0.65	1.12

Tab.20: confronto tra seconde neoplasie maligne diagnosticate nella nostra popolazione e seconde neoplasie maligne nella popolazione generale (registro AIRTUM 2013 ¹⁴⁰).

3.4 Discussione

Nello studio “Feocromocitoma/paraganglioma ed altre neoplasie. Studio multicentrico retrospettivo e confronto con la popolazione generale” abbiamo voluto verificare su un’ampia casistica quali siano le neoplasie presenti in pazienti affetti da FEO/PGL e confrontarne l’incidenza con la popolazione generale sia considerando i dati sulle prime neoplasie maligne (registro AIRTUM 2008 ¹³⁹) che quelli sulle seconde neoplasie maligne (registro AIRTUM 2013 ¹⁴⁰). Negli ultimi anni infatti si è fatto sempre maggiore l’interesse verso l’identificazione di associazioni tra FEO/PGL ed altre neoplasie. I dati fino ad oggi presenti in letteratura riguardano principalmente forme familiari ed in particolar modo pazienti con mutazioni a carico dei geni della succinato deidrogenasi, responsabili delle paragangliomatosi familiari 1-5. I dati relativi ad altri geni sono esigui e questo verosimilmente è da ricondurre alla loro più recente scoperta; infatti l’altro gene per cui è stata descritta un’associazione è il gene *MAX* ²⁹ la cui scoperta è ritardata di più di 10 anni rispetto a quella dei geni *SDHx* ^{22 23 24 25 26}. Nei lavori, come anche nel nostro studio, non vengono considerate forme sindromiche per le quali sia già nota l’associazione con altre neoplasie (NF1, VHL e MEN2).

Le associazioni più frequentemente descritte in letteratura riguardano GIST, RCC ed adenomi ipofisari. Ad oggi infatti si stima che il 5-7.5% di tutti i GIST, lo 0.05-0.2% dei RCC ⁸⁰ ed una percentuale esigua degli adenomi ipofisari siano dovuti a mutazioni di *SDHx* ¹¹⁹.

Sono molte le considerazioni da fare in merito agli studi presenti in letteratura. Una prima differenza sostanziale tra i diversi studi riguarda la popolazione di partenza che viene considerata; infatti in alcuni casi gli autori hanno ricercato la presenza di mutazioni dei geni di suscettibilità in GIST, RCC e PA appartenenti a pazienti non precedentemente studiati (FEO/PGL non noto, non analisi genetica), in altri casi hanno invece descritto la presenza di secondi tumori in pazienti affetti da FEO/PGL (con genetica nota o meno) o in pazienti mutati *SDHx*. Un altro aspetto molto importante riguarda il fatto che nella maggior parte dei casi le

associazioni riportate in letteratura (FEO/PGL e seconda neoplasia o genetica positiva e seconda neoplasia) non sono supportate dall'esecuzione dell'analisi immunohistochimica sul tessuto e/o dalla valutazione della LOH. In questi casi quindi non vi è la dimostrazione che lo sviluppo della seconda neoplasia sia effettivamente determinato dalla mutazione genetica a carico di uno dei geni di suscettibilità e che non si tratti invece solamente di un'associazione casuale. In alcuni lavori gli autori hanno cercato di capire se i meccanismi attraverso i quali mutazioni dei geni *SDHx* determinano la comparsa della seconda neoplasia, siano gli stessi alla base dello sviluppo di FEO/PGL.

I dati in letteratura riguardo ad altri tumori *SDHx* mutati, non sono in realtà univoci. Infatti, a differenza di quanto atteso, nel loro lavoro Choi et al. ¹²⁹ hanno descritto una correlazione positiva tra l'espressione di SDHB ed SDHA a livello dello stroma di tumori filloidi della mammella, e quella di HIF-1alfa. Gli stessi autori nella discussione sottolineano questo risultato inatteso ipotizzando che altri meccanismi, come l'inattivazione della p53 ¹⁴¹, possano determinare la stabilizzazione di HIF-1alfa. Tsang et al. ¹⁴² invece hanno riportato un dato a supporto dell'incrementata espressione di HIF-1alfa nei GIST *SDHx* mutati. Gli autori infatti hanno dimostrato, nei GIST con mutazioni a carico di una delle subunità del complesso mitocondriale, un incremento del mRNA-210 la cui espressione è incrementata da HIF-1alfa. Risultati analoghi sono stati riscontrati anche in altri tipi tumorali, come il RCC ¹⁴³.

Interessante inoltre il caso riportato da Jiang et al. ¹⁰⁴ nel quale, nonostante una immunohistochimica positiva per SDHA sul tessuto di un GIST e di un RCC, è stata poi identificata una mutazione a carico di questo gene. L'esperienza su FEO/PGL per quanto riguarda l'affidabilità dell'analisi immunohistochimica ¹⁴⁴, fa pensare ad un risultato falsamente positivo. L'interpretazione infatti dell'esito dell'analisi non è sempre univoca e può essere di difficile interpretazione. Si può ipotizzare che sia necessario implementare la casistica di altri tipi tumorali sottoposti ad analisi immunohistochimica per SDHB/A al fine di migliorarne

l'interpretazione. Gli autori, allo scopo di chiarire il significato dei risultati ottenuti, hanno valutato la metilazione del promotore di *SDHB* riscontrando una ipometilazione. Negli ultimi anni è stato infatti dimostrato che meccanismi epigenetici sono responsabili dello sviluppo di GIST^{145 146 147} e PGL¹⁴⁸.

Considerando le associazioni più frequentemente descritte, e tra queste i casi sottoposti ad analisi immunostochimica, l'esito è risultato negativo in 403/2711 (14.8%) GIST, 57/83 (68.6%) RCC, 7/8 (87.5%) PA. Considerando invece solo i lavori che hanno utilizzato lo stesso criterio di inclusione del nostro studio, ovvero la presenza di FEO/PGL, i numeri si riducono drasticamente. Un solo lavoro descrive la presenza di un FEO associato a GIST e linfoma⁸². In questo caso non è stata effettuata l'analisi immunostochimica sul tessuto del GIST. Per quanto riguarda il carcinoma renale, solo Vanharanta et al. nel 2004¹⁰⁷ hanno descritto 3 casi di pazienti *SDHB* mutati affetti da RCC, in due casi associato a PGL. Sul tessuto dei carcinomi renali non è stata effettuata l'analisi immunostochimica per *SDHB* ma è stata dimostrata la LOH. Sono invece 32 i casi di pazienti affetti da FEO/PGL e PA riportati in letteratura^{120 121 122}¹²⁴; di questi solo 1 è stato sottoposto ad analisi immunostochimica risultata negativa¹²¹.

Utilizzando invece come punto di partenza la presenza di mutazione *SDHx*, sono 3 i casi di GIST riportati in letteratura^{83 106}. Di questi solo i due casi descritti da Niemeijer et al. nel 2015⁸³ sono stati analizzati; sono risultati negativi all'analisi immunostochimica ed è stata dimostrata la LOH. Cinquantasette pazienti *SDHx* con RCC sono stati riportati in letteratura¹⁰⁸^{109 110 83 106} (45 mai descritti in precedenza); di questi solo i 3 casi di Niemeijer et al. del 2015⁸³ sono stati sottoposti ad analisi sul tessuto risultando negativi all'immunostochimica e dimostrando la LOH. L'analisi di casistiche di pazienti con mutazioni *SDHx* ha portato all'identificazione di 11 casi di PA^{123 111 83 106}. Di questi 11 casi, solo 4 sono stati analizzati. Il caso riportato da Gill et al. nel 2014¹¹¹, il caso descritto da Dwight et al.¹²³ ed entrambi i casi di Niemeijer et al.⁸³ del 2015 sono risultati negativi all'analisi immunostochimica. Sui tessuti

di questi ultimi due PA è stata valutata anche la LOH che è stata dimostrata in un caso mentre nell'altro è stata identificata una mutazione somatica. La LOH è stata dimostrata anche sul tessuto del PA descritto da Dwight et al.¹²³.

Possiamo dire quindi che in assoluto nella maggior parte dei casi di tumori associati sottoposti ad analisi immunoistochimica (n 2711) e risultati negativi (n 403) si tratta di GIST. Percentualmente però, sono gli adenomi ipofisari i tumori nei quali è stata dimostrata una maggior associazione con mutazioni *SDHx* (7 casi negativi all'immunoistochimica sugli 8 analizzati).

Risulta inoltre sorprendente a mio avviso che, tra i tre tipi tumorali maggiormente descritti in pazienti affetti da FEO/PGL, quello maggiormente presente sia il PA (32 casi anche se solo in uno è stata effettuata l'analisi immunoistochimica che è risultata negativa). Questo lascia sorpresi se consideriamo che, anche ricercando la presenza di HNPGL e sottoponendo quindi il paziente a RMN del collo con mdc, non risulta inclusa in questo tipo di esame la valutazione della sella turcica e quindi dell'ipofisi. Una spiegazione viene dal fatto che in buona parte dei casi descritti, si trattava di adenomi secernenti e/o macroadenomi che quindi hanno verosimilmente causato delle manifestazioni cliniche tali da portare all'effettuazione di esami strumentali e laboratoristici che hanno condotto alla diagnosi di adenoma ipofisario. Un altro scenario possibile nella pratica clinica, è quello che riguarda i pazienti portatori di mutazione genetica non affetti da patologia cromaffine. Questo tipo di popolazione deriva dall'analisi genetica effettuata per la presenza di un parente di primo grado affetto da FEO/PGL nel quale sia stata dimostrata una forma familiare. In questo caso dai dati ricavati dalla letteratura emerge che è il carcinoma renale la neoplasia che viene riscontrata più frequentemente. Lo screening di questo tipo di tumore, tra i tre più frequenti, risulta senza alcun dubbio il più applicabile alla pratica clinica perché possibile in prima istanza con l'effettuazione di una ecografia addome.

Diverso è il discorso che riguarda lo screening del GIST che richiederebbe una TC addome con mdc. Questo può spiegare i numeri più esigui (3 casi di cui due con immunohistochimica negativa e LOH) in questa sottopopolazione (pazienti *SDHx*); infatti il follow up nei pazienti portatori di mutazione viene effettuato richiedendo la misurazione delle metanefrine sulle urine delle 24 ore e solo nei casi di positività, viene richiesta una indagine strumentale sull'addome.

Va detto però che, se da una parte sono solo tre i casi di carcinoma renale descritti in pazienti affetti da FEO/PGL, tutti e tre sono stati analizzati ed è stata dimostrata la LOH. Quindi il numero di casi descritti è minore rispetto ai PA ma sono stati tutti dimostrati.

Dai risultati del nostro studio emergono alcuni dati interessanti. Il follow up medio nella nostra popolazione è stato, considerando pazienti con forme sporadiche e familiari, superiore a tre anni. Il dato appare in accordo con le linee guida⁶⁶ che consigliano, anche nei pazienti nei quali non sia stata trovata alcuna mutazione patogenetica a carico dei geni di suscettibilità, di effettuare il dosaggio annuale delle metanefrine.

In linea con quanto riportato in letteratura^{10,149}, il 30% della nostra popolazione è risultato positivo all'analisi genetica. Le due neoplasie maligne più frequentemente associate a patologia cromaffine sono risultate il carcinoma mammario e tiroideo. In popolazione generale il tumore della mammella rappresenta la patologia neoplastica più frequente nella popolazione femminile (18.1%), ed il tumore della tiroide si trova al quarto posto (5.8%) per frequenza sempre nel sesso femminile. I nostri dati relativi alle neoplasie tiroidee possono essere in parte legati al fatto che questi pazienti sono seguiti prevalentemente in ambito Endocrinologico nel quale la valutazione tiroidea viene effettuata quasi di routine. A differenza di quanto atteso, la maggior parte dei pazienti con neoplasie associate (circa 80%) e neoplasie maligne associate (86%), sono risultati negativi all'analisi genetica.

Alcuni dati che emergono dal confronto tra pazienti affetti da lesioni simpatergiche e parasimpatergiche, trovano conferma nei dati di letteratura. Infatti la maggior appartenenza dei primi al Cluster 2 e dei secondi al Cluster 1, è in linea con quanto atteso considerando i geni appartenenti ai due diversi gruppi. La presenza di metastasi a distanza da lesione cromaffine è risultata maggiore tra i pazienti affetti da FEO e PGL di torace/addome. Anche questo dato non sorprende, infatti sappiamo che il sottogruppo dei PGL simpatergici è quello gravato da una maggior malignità ¹⁰. Sorprende invece la maggior età alla diagnosi dei pazienti affetti da FEO/PGL in considerazione della possibile presenza di sintomi dovuti alla secrezione di catecolamine da parte della lesione. La differenza statisticamente significativa tra lesioni di natura simpatica e lesioni parasimpatiche riguardo l'esito negativo dell'analisi genetica risulta in linea con i dati di letteratura ¹⁵⁰. Interessante il dato relativo alla maggior familiarità positiva per neoplasie nel gruppo di pazienti affetti da HNPG.

Dall'analisi univariata l'esito negativo dell'analisi genetica è risultato associato in maniera significativa allo sviluppo di una neoplasia associata (prima o dopo la comparsa di patologia cromaffine), e si è confermato anche considerando esclusivamente i pazienti che hanno sviluppato una neoplasia associata maligna. Dalla valutazione del Cluster 1, quale fattore in grado di influenzare lo sviluppo di neoplasie associate, è emerso un rischio maggiore nei pazienti con analisi negativa per i geni inclusi in questo gruppo. Questi dati risultano molto interessanti se consideriamo che la maggior attenzione negli ultimi anni è stata dedicata allo studio delle patologie neoplastiche associate in pazienti con mutazioni dei geni *SDHx*. Dal punto di vista anagrafico, una maggiore età al momento della diagnosi è risultata associata ad una maggior prevalenza di seconde neoplasie (benigne e maligne e solo maligne) sia comparse prima che dopo il FEO/PGL. Questo dato, insieme al fatto che avere una familiarità positiva per neoplasie si associ ad un maggior rischio di sviluppare altre neoplasie, non sorprende. Il maggior rischio in pazienti con FEO/PGL non metastatico si può ascrivere a mio

parere all'esiguo numero di pazienti con diffusione a distanza della malattia. All'analisi multivariata il dato relativo all'analisi genetica negativa come fattore favorente lo sviluppo di seconda neoplasia, si è mantenuto sia considerando tutte le neoplasie associate che solo il sottogruppo dei pazienti con neoplasia maligna. La conferma del risultato sull'analisi genetica rappresenta senza dubbio il dato più interessante ed allo stesso tempo inatteso che emerge dal nostro studio. Anche il dato relativo alla maggiore età alla diagnosi di FEO/PGL in coloro i quali nell'arco della loro vita hanno sviluppato un'altra neoplasia è stato confermato all'analisi multivariata sia considerando tutti i 118 pazienti con neoplasia associata che solo i casi con neoplasia maligna associata. Questo risultato, confermato in più occasioni, non determina variazioni nella gestione clinica del paziente. Infatti è attesa una maggior incidenza di neoplasie associate nei pazienti con una maggiore età.

Alla domanda se i nostri pazienti abbiano un rischio di sviluppare neoplasie maggiore rispetto a quello della popolazione generale, abbiamo provato a dare una risposta effettuando due diversi tipi di analisi. In primo luogo abbiamo confrontato i nostri dati con il registro AIRTUM 2008 ¹³⁹ relativo ai tassi di incidenza di neoplasie maligne nella popolazione generale. In un secondo momento, abbiamo invece confrontato i dati sulla nostra popolazione con quelli del registro AIRTUM 2013 ¹⁴⁰ relativi allo sviluppo di seconde neoplasie maligne nella popolazione generale. I dati del registro si riferiscono ai secondi tumori maligni diagnosticati a distanza di almeno due mesi (periodo di sincronicità) dalla diagnosi di tumore primitivo.

Dalla prima analisi, considerando anche i casi diagnosticati lo stesso anno di FEO/PGL, è risultato un rischio maggiore nella nostra popolazione femminile rispetto alla popolazione generale.

La seconda analisi a mio parere risulta più appropriata perché ci permette di confrontare tra di loro due popolazioni di pazienti neoplastici e valutare se un particolare tipo di neoplasia, nel nostro caso il FEO/PGL, più delle altre possa predisporre allo sviluppo di altri tumori

maligni.

Da questa analisi non è emerso un rischio maggiore nella nostra popolazione rispetto alla popolazione generale. Purtroppo non è stato possibile effettuare il confronto differenziando la popolazione in base al sesso per la mancanza dei dati di popolazione. Rimane quindi da capire se, effettuando un'analisi più dettagliata, il dato riguardante il sesso femminile verrà o meno confermato.

A mio parere, la principale limitazione di questo studio risulta nel fatto che nell'analisi di confronto con la popolazione generale non abbiamo potuto considerare le neoplasie benigne per la mancanza di dati di riferimento. Sarebbe necessario quindi costruire dei gruppi di controllo costituiti dalla popolazione che afferrisce presso i nostri ambulatori.

La mancanza di un confronto con la popolazione generale su questo aspetto, lascia aperta la questione riguardante lo screening per la ricerca dei PA. Tale patologia infatti, oltre a risultare dai dati della letteratura la patologia neoplastica per la quale sia stato maggiormente dimostrata una reale correlazione con la mutazione dei geni *SDHx* (7 casi negativi su 8 sottoposti ad analisi immunoistochimica), è risultata anche presente nella nostra casistica con 4 casi di adenoma ipofisario su 118 neoplasie associate. Dai dati di letteratura e dalla nostra casistica emerge che i PA presenti in pazienti affetti da FEO/PGL e/o mutati *SDHx* sono solitamente macroadenomi o microadenomi secernenti e quindi neoplasie in grado di causare un quadro clinico tale da portare all'effettuazione di indagini biochimiche e strumentali. Un altro aspetto da considerare è che, confrontando i nostri dati con quelli di incidenza di neoplasie nella popolazione generale¹³⁹, non sono state incluse nell'analisi le neoplasie maligne comparse nella nostra popolazione precedentemente allo sviluppo di FEO/PGL (casi prevalenti). Va comunque detto che la comparsa di una neoplasia maligna prima della patologia cromaffine esclude un'influenza diretta del FEO/PGL sul suo sviluppo. Il maggior rischio di sviluppare neoplasie maligne nei pazienti con analisi genetica negativa, porta ad

escludere un ruolo dei geni di suscettibilità per FEO/PGL nello sviluppo di altre neoplasie maligne. Rimane da valutare se sia l'attivazione di vie di segnalazione comuni alla base dello sviluppo di entrambe le patologie.

Questo studio presenta altre limitazioni. Trattandosi di uno studio retrospettivo non è stato possibile reperire tutti i dati dei pazienti inclusi. Inoltre, abbracciando un arco temporale molto ampio, sono stati inclusi pazienti non sottoposti ad analisi genetica, pazienti analizzati con la metodica tradizionale in Sanger ed infine pazienti analizzati con NGS (Next Generation Sequencing). Inoltre non è stata effettuata l'analisi sul tessuto dei tumori associati per valutare se, nei pazienti con mutazione genetica germinale, la mutazione di uno dei geni di suscettibilità fosse responsabile dello sviluppo del secondo tumore. Tuttavia questo rappresenta ad oggi lo studio più numeroso condotto in pazienti affetti da FEO/PGL per la valutazione di neoplasie associate.

3.5 Conclusioni

Vista la maggior incidenza di seconde neoplasie maligne associate a patologia cromaffine nella nostra popolazione di sesso femminile, questa sottopopolazione potrebbe beneficiare di un più stretto follow per la ricerca di seconde neoplasie. A differenza di quanto atteso non è indicata una differente gestione nei pazienti con analisi genetica positiva.

4. Bibliografia

1. Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, et al. Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(2):92-102.
2. Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, Vinik AI, Lloyd RV, Pacak K. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas.* 2010;39(6):775-783.
3. 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):309-340.
4. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, et al. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(2):637-644.
5. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Paoletta A, Boscaro M. Risk factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):520-526.
6. Strosberg JR. Update on the management of unusual neuroendocrine tumors: pheochromocytoma and paraganglioma, medullary thyroid cancer and adrenocortical carcinoma. *Semin Oncol.* 2013;40(1):120-133.
7. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(2):G1-g34.
8. Baguet JP, Hammer L, Mazzucco TL, et al. Circumstances of discovery of phaeochromocytoma: a retrospective study of 41 consecutive patients. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(5):681-686.
9. Kopetschke R, Slisko M, Kilisli A, et al. Frequent incidental discovery of phaeochromocytoma: data from a German cohort of 201 phaeochromocytoma. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(2):355-361.
10. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Phaeochromocytoma. *Lancet.* 2005;366(9486):665-675.
11. Solorzano CC, Lew JI, Wilhelm SM, et al. Outcomes of pheochromocytoma management in the laparoscopic era. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(10):3004-3010.
12. Mannelli M, Ianni L, Cilotti A, Conti A. Pheochromocytoma in Italy: a multicentric retrospective study. *Eur J Endocrinol.* 1999;141(6):619-624.
13. Thompson LD, Young WF, Kawashima A, Komminoth P. Malignant adrenal phaeochromocytoma. In. World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of Endocrine Organs, 3rd ed., pp. 147-150 2004.
14. Tischler AS, de Krijger RR. *Phaeochromocytoma*. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th ed. pp. 183-189 2017.
15. Kimura N, Cappella C. Extraadrenal paraganglioma. In. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th ed., pp. 190-195 2017.
16. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002;346(19):1459-1466.
17. Gimenez-Roqueplo AP, Dahia PL, Robledo M. An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res.* 2012;44(5):328-333.

18. Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell*. 1990;62(1):193-201.
19. Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*. 1990;62(3):599-608.
20. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363(6428):458-460.
21. Crossey PA, Richards FM, Foster K, et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet*. 1994;3(8):1303-1308.
22. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000;287(5454):848-851.
23. Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000;26(3):268-270.
24. Astuti D, Latif F, Dallol A, et al. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2001;69(1):49-54.
25. Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*. 2009;325(5944):1139-1142.
26. Burnichon N, Briere JJ, Libe R, et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2010;19(15):3011-3020.
27. Clark GR, Sciacovelli M, Gaude E, et al. Germline FH mutations presenting with pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10):E2046-2050.
28. Qin Y, Yao L, King EE, et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2010;42(3):229-233.
29. Comino-Mendez I, Gracia-Aznarez FJ, Schiavi F, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2011;43(7):663-667.
30. Daly AF, Castermans E, Oudijk L, et al. Pheochromocytomas and pituitary adenomas in three patients with MAX exon deletions. In: *Endocr Relat Cancer*. Vol 25. England 2018:L37-142.
31. Roszko KL, Blouch E, Blake M, et al. Case Report of a Prolactinoma in a Patient With a Novel MAX Mutation and Bilateral Pheochromocytomas. *J Endocr Soc*. 2017;1(11):1401-1407.
32. Zhuang Z, Yang C, Lorenzo F, et al. Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia. *N Engl J Med*. 2012;367(10):922-930.
33. Martucci VL, Pacak K. Pheochromocytoma and paraganglioma: diagnosis, genetics, management, and treatment. *Curr Probl Cancer*. 2014;38(1):7-41.
34. Yang C, Zhuang Z, Fliedner SM, et al. Germ-line PHD1 and PHD2 mutations detected in patients with pheochromocytoma/paraganglioma-polycythemia. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(1):93-104.
35. Fishbein L, Khare S, Wubbenhorst B, et al. Whole-exome sequencing identifies somatic ATRX mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat Commun*. 2015;6:6140.
36. Cascon A, Comino-Mendez I, Curras-Freixes M, et al. Whole-exome sequencing identifies MDH2 as a new familial paraganglioma gene. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5).
37. Gaal J, Burnichon N, Korpershoek E, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations are rare in pheochromocytomas and paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1274-1278.

38. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LC, et al. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev.* 2008;22(7):884-893.
39. Welander J, Andreasson A, Juhlin CC, et al. Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):E1352-1360.
40. Yeh IT, Lenci RE, Qin Y, et al. A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors. *Hum Genet.* 2008;124(3):279-285.
41. Qin Y, Buddavarapu K, Dahia PL. Pheochromocytomas: from genetic diversity to new paradigms. *Horm Metab Res.* 2009;41(9):664-671.
42. Wadt K, Choi J, Chung JY, et al. A cryptic BAP1 splice mutation in a family with uveal and cutaneous melanoma, and paraganglioma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(6):815-818.
43. Pacak K, Wimalawansa SJ. Pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Pract.* 2015;21(4):406-412.
44. Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med.* 2009;266(1):43-52.
45. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(4):173-178.
46. Carney JA, Sheps SG, Go VL, Gordon H. The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N Engl J Med.* 1977;296(26):1517-1518.
47. Welander J, Soderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(6):R253-276.
48. Pillai S, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Updates on the genetics and the clinical impacts on pheochromocytoma and paraganglioma in the new era. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;100:190-208.
49. Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. [Genetics of paragangliomas and pheochromocytomas]. *Med Sci (Paris).* 2012;28(6-7):625-632.
50. Letouze E, Martinelli C, Lorient C, et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell.* 2013;23(6):739-752.
51. Lopez-Jimenez E, Gomez-Lopez G, Leandro-Garcia LJ, et al. Research resource: Transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas. *Mol Endocrinol.* 2010;24(12):2382-2391.
52. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 2001;7(8):345-350.
53. Jochmanova I, Zelinka T, Widimsky J, Jr., Pacak K. HIF signaling pathway in pheochromocytoma and other neuroendocrine tumors. *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 2:S251-262.
54. Rapizzi E, Fucci R, Giannoni E, et al. Role of microenvironment on neuroblastoma SK-N-AS SDHB-silenced cell metabolism and function. *Endocrine-Related Cancer.* 2015;22(3):409-417.
55. Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxia hypothesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(6):957-968.
56. Baysal BE. Clinical and molecular progress in hereditary paraganglioma. *J Med Genet.* 2008;45(11):689-694.
57. Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(16):2170-2180.

58. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Emboj*. 2003;22(16):4082-4090.
59. Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol*. 2012;2:85.
60. Dahia PL, Ross KN, Wright ME, et al. A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet*. 2005;1(1):72-80.
61. Favier J, Briere JJ, Burnichon N, et al. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS One*. 2009;4(9):e7094.
62. Besset V, Scott RP, Ibanez CF. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39159-39166.
63. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-1284.
64. Nolting S, Grossman AB. Signaling pathways in pheochromocytomas and paragangliomas: prospects for future therapies. *Endocr Pathol*. 2012;23(1):21-33.
65. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2656-2666.
66. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1915-1942.
67. Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *Eur J Cancer*. 2012;48(11):1739-1749.
68. Eisenhofer G, Lenders JW, Linehan WM, Walther MM, Goldstein DS, Keiser HR. Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Engl J Med*. 1999;340(24):1872-1879.
69. Blake MA, Krishnamoorthy SK, Boland GW, et al. Low-density pheochromocytoma on CT: a mimicker of adrenal adenoma. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;181(6):1663-1668.
70. Tabarin A, Bardet S, Bertherat J, et al. Exploration and management of adrenal incidentalomas. French Society of Endocrinology Consensus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008;69(6):487-500.
71. Boland GW, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MM, Mueller PR. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. *AJR Am J Roentgenol*. 1998;171(1):201-204.
72. Jun JH, Ahn HJ, Lee SM, et al. Is Preoperative Biochemical Testing for Pheochromocytoma Necessary for All Adrenal Incidentalomas? *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(45):e1948.
73. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Dunnick NR. Delayed enhanced CT of lipid-poor adrenal adenomas. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;175(5):1411-1415.
74. Pena CS, Boland GW, Hahn PF, Lee MJ, Mueller PR. Characterization of indeterminate (lipid-poor) adrenal masses: use of washout characteristics at contrast-enhanced CT. *Radiology*. 2000;217(3):798-802.
75. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, et al. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology*. 2002;222(3):629-633.

76. Szolar DH, Korobkin M, Reittner P, et al. Adrenocortical carcinomas and adrenal pheochromocytomas: mass and enhancement loss evaluation at delayed contrast-enhanced CT. *Radiology*. 2005;234(2):479-485.
77. Blake MA, Kalra MK, Sweeney AT, et al. Distinguishing benign from malignant adrenal masses: multi-detector row CT protocol with 10-minute delay. *Radiology*. 2006;238(2):578-585.
78. Haider MA, Ghai S, Jhaveri K, Lockwood G. Chemical shift MR imaging of hyperattenuating (>10 HU) adrenal masses: does it still have a role? *Radiology*. 2004;231(3):711-716.
79. Heinz-Peer G, Honigschnabl S, Schneider B, Niederle B, Kaserer K, Lechner G. Characterization of adrenal masses using MR imaging with histopathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol*. 1999;173(1):15-22.
80. Mannelli M, Canu L, Ercolino T, et al. DIAGNOSIS of ENDOCRINE DISEASE: SDHx mutations: beyond pheochromocytomas and paragangliomas. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(1):R11-r17.
81. Bento C, Almeida H, Maia TM, et al. Molecular study of congenital erythrocytosis in 70 unrelated patients revealed a potential causal mutation in less than half of the cases (Where is/are the missing gene(s)?). *Eur J Haematol*. 2013;91(4):361-368.
82. Renella R, Carnevale J, Schneider KA, Hornick JL, Rana HQ, Janeway KA. Exploring the association of succinate dehydrogenase complex mutations with lymphoid malignancies. *Fam Cancer*. 2014;13(3):507-511.
83. Niemeijer ND, Papatomas TG, Korpershoek E, et al. Succinate Dehydrogenase (SDH)-Deficient Pancreatic Neuroendocrine Tumor Expands the SDH-Related Tumor Spectrum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):E1386-1393.
84. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279(5350):577-580.
85. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003;299(5607):708-710.
86. Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology*. 2006;48(1):83-96.
87. Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, et al. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet*. 2006;15(6):1015-1023.
88. Agaram NP, Wong GC, Guo T, et al. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(10):853-859.
89. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(1):314-318.
90. Boikos SA, Stratakis CA. The genetic landscape of gastrointestinal stromal tumor lacking KIT and PDGFRA mutations. *Endocrine*. 2014;47(2):401-408.
91. Zhang L, Smyrk TC, Young WF, Jr., Stratakis CA, Carney JA. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(1):53-64.
92. Pantaleo MA, Lolli C, Nannini M, et al. Good survival outcome of metastatic SDH-deficient gastrointestinal stromal tumors harboring SDHA mutations. *Genet Med*. 2015;17(5):391-395.
93. Wang YM, Gu ML, Ji F. Succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 2015;21(8):2303-2314.

94. Miettinen M, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, Osuch C, Rutkowski P, Lasota J. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(11):1712-1721.
95. McWhinney SR, Pasini B, Stratakis CA, International Carney Triad and Carney-Stratakis Syndrome C. Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. In: *N Engl J Med*. Vol 357. United States 2007:1054-1056.
96. Gill AJ, Chou A, Vilain R, et al. Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(5):636-644.
97. Gaal J, Stratakis CA, Carney JA, et al. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2011;24(1):147-151.
98. Doyle LA, Nelson D, Heinrich MC, Corless CL, Hornick JL. Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology*. 2012;61(5):801-809.
99. Italiano A, Chen CL, Sung YS, et al. SDHA loss of function mutations in a subset of young adult wild-type gastrointestinal stromal tumors. *BMC Cancer*. 2012;12:408.
100. Oudijk L, Gaal J, Korpershoek E, et al. SDHA mutations in adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2013;26(3):456-463.
101. Wagner AJ, Remillard SP, Zhang YX, Doyle LA, George S, Hornick JL. Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2013;26(2):289-294.
102. Miettinen M, Killian JK, Wang ZF, et al. Immunohistochemical loss of succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):234-240.
103. Tirumani SH, Tirumani H, Jagannathan JP, et al. MDCT features of succinate dehydrogenase (SDH)-deficient gastrointestinal stromal tumours. *Br J Radiol*. 2014;87(1043):20140476.
104. Jiang Q, Zhang Y, Zhou YH, et al. A novel germline mutation in SDHA identified in a rare case of gastrointestinal stromal tumor complicated with renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):12188-12197.
105. Mason EF, Hornick JL. Conventional Risk Stratification Fails to Predict Progression of Succinate Dehydrogenase-deficient Gastrointestinal Stromal Tumors: A Clinicopathologic Study of 76 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(12):1616-1621.
106. Andrews KA, Ascher DB, Pires DEV, et al. Tumour risks and genotype-phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet*. 2018;55(6):384-394.
107. Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, et al. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):153-159.
108. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama*. 2004;292(8):943-951.
109. Ricketts CJ, Forman JR, Rattenberry E, et al. Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in SDHB and SDHD. *Hum Mutat*. 2010;31(1):41-51.
110. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, et al. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer. *J Urol*. 2012;188(6):2063-2071.

111. Gill AJ, Hes O, Papathomas T, et al. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal carcinoma: a morphologically distinct entity: a clinicopathologic series of 36 tumors from 27 patients. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(12):1588-1602.
112. Papathomas TG, Gaal J, Corssmit EP, et al. Non-pheochromocytoma (PCC)/paraganglioma (PGL) tumors in patients with succinate dehydrogenase-related PCC-PGL syndromes: a clinicopathological and molecular analysis. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(1):1-12.
113. Williamson SR, Eble JN, Amin MB, et al. Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2015;28(1):80-94.
114. Yakirevich E, Ali SM, Mega A, et al. A Novel SDHA-deficient Renal Cell Carcinoma Revealed by Comprehensive Genomic Profiling. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(6):858-863.
115. Ozluk Y, Taheri D, Matoso A, et al. Renal carcinoma associated with a novel succinate dehydrogenase A mutation: a case report and review of literature of a rare subtype of renal carcinoma. *Hum Pathol*. 2015;46(12):1951-1955.
116. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1469-1489.
117. Rao Q, Xia QY, Cheng L, Zhou XJ. Molecular genetics and immunohistochemistry characterization of uncommon and recently described renal cell carcinomas. *Chin J Cancer Res*. 2016;28(1):29-49.
118. Iversen K. Acromegaly associated with pheochromocytoma. *Acta Med Scand*. 1952;142(1):1-5.
119. O'Toole SM, Denes J, Robledo M, Stratakis CA, Korbonits M. 15 YEARS OF PARAGANGLIOMA: The association of pituitary adenomas and pheochromocytomas or paragangliomas. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(4):T105-122.
120. Lopez-Jimenez E, de Campos JM, Kusak EM, et al. SDHC mutation in an elderly patient without familial antecedents. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(6):906-910.
121. Xekouki P, Pacak K, Almeida M, et al. Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):E357-366.
122. Xekouki P, Stratakis CA. Succinate dehydrogenase (SDHx) mutations in pituitary tumors: could this be a new role for mitochondrial complex II and/or Krebs cycle defects? *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(6):C33-40.
123. Dwight T, Mann K, Benn DE, et al. Familial SDHA mutation associated with pituitary adenoma and pheochromocytoma/paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(6):E1103-1108.
124. Xekouki P, Szarek E, Bullova P, et al. Pituitary adenoma with paraganglioma/pheochromocytoma (3PAs) and succinate dehydrogenase defects in humans and mice. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(5):E710-719.
125. Beckers A. Means, motive, and opportunity: SDH mutations are suspects in pituitary tumors. In: *J Clin Endocrinol Metab*. Vol 98. United States 2013:2274-2276.
126. Ngeow J, Mester J, Rybicki LA, Ni Y, Milas M, Eng C. Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in prospective series of individuals with Cowden and Cowden-like syndrome characterized by germline PTEN, SDH, or KLLN alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):E2063-2071.
127. Mester J, Eng C. Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *J Surg Oncol*. 2015;111(1):125-130.

128. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T, et al. Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2008;83(2):261-268.
129. Choi J, Kim DH, Jung W, Koo JS. The expression of succinate dehydrogenase in breast phyllodes tumor. *Histol Histopathol.* 2014;29(10):1343-1354.
130. Ni Y, Seballos S, Ganapathi S, et al. Germline and somatic SDHx alterations in apparently sporadic differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(2):121-130.
131. Eisenhofer G, Pacak K, Huynh TT, et al. Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(1):97-111.
132. Sane T, Schalin-Jantti C, Raade M. Is biochemical screening for pheochromocytoma in adrenal incidentalomas expressing low unenhanced attenuation on computed tomography necessary? *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):2077-2083.
133. Schalin-Jantti C, Raade M, Hamalainen E, Sane T. A 5-Year Prospective Follow-Up Study of Lipid-Rich Adrenal Incidentalomas: No Tumor Growth or Development of Hormonal Hypersecretion. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015;30(4):481-487.
134. Buitenwerf E, Korteweg T, Visser A, et al. Unenhanced CT imaging is highly sensitive to exclude pheochromocytoma: a multicenter study. *Eur J Endocrinol.* 2018.
135. Hasassri ME, Pandian TK, Bobr AA, et al. Pheochromocytoma with Synchronous Ipsilateral Adrenal Cortical Adenoma. *World J Surg.* 2017;41(12):3147-3153.
136. Bancos I, Chortis V, Lang K, et al. The natural history of adrenal incidentaloma - results from the international prospective multi-centre EURINE-ACT study. In: *Endocrine Abstract 2017*; 49 GP122.
137. Woo S, Suh CH, Kim SY, Cho JY, Kim SH. Pheochromocytoma as a frequent false-positive in adrenal washout CT: A systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol.* 2017.
138. Cropp RJ, Seslija P, Tso D, Thakur Y. Scanner and kVp dependence of measured CT numbers in the ACR CT phantom. *J Appl Clin Med Phys.* 2013;14(6):4417.
139. Crocetti E, Group AW. [Numbers of AIRTUM]. In: *Epidemiol Prev.* Vol 32. Italy2008:14.
140. Italian cancer figures, report 2013: Multiple tumours. *Epidemiol Prev.* 2013;37(4-5 Suppl 1):1-152.
141. Kuijper A, van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and its downstream targets in fibroepithelial tumors of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):R808-818.
142. Tsang VH, Dwight T, Benn DE, et al. Overexpression of miR-210 is associated with SDH-related pheochromocytomas, paragangliomas, and gastrointestinal stromal tumours. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(3):415-426.
143. McCormick RI, Blick C, Ragoussis J, et al. miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. *Br J Cancer.* 2013;108(5):1133-1142.
144. Papatomas TG, Oudijk L, Persu A, et al. SDHB/SDHA immunohistochemistry in pheochromocytomas and paragangliomas: A multicenter interobserver variation analysis using virtual microscopy: A Multinational Study of the European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENS@T). *Modern Pathology.* 2015;28(6):807-821.
145. Haller F, Moskalev EA, Faucz FR, et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(4):567-577.
146. Killian JK, Miettinen M, Walker RL, et al. Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Sci Transl Med.* 2014;6(268):268ra177.
147. Urbini M, Astolfi A, Indio V, et al. SDHC methylation in gastrointestinal stromal tumors (GIST): a case report. *BMC Med Genet.* 2015;16:87.

148. Richter S, Klink B, Nacke B, et al. Epigenetic Mutation of the Succinate Dehydrogenase C Promoter in a Patient With Two Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):359-363.
149. Gimenez-Roqueplo AP, Lehnert H, Mannelli M, et al. Pheochromocytoma, new genes and screening strategies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65(6):699-705.
150. Mannelli M, Castellano M, Schiavi F, et al. Clinically guided genetic screening in a large cohort of italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1541-1547.