

Università degli Studi di Roma “Sapienza”
Scuola di Dottorato in Scienza Mediche Sperimentali e Cliniche

Corso di Dottorato in Medicina Molecolare
XXIV° ciclo

Tesi di Dottorato:

Nuovi approcci terapeutici del carcinoma corticosurrenalico: effetto del rosiglitazone e studio del ruolo di p53 nella risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti

Candidata:
Dott.ssa Camilla Sampaoli

Relatore:
Dott. Antonio Stigliano

Indice

1. Introduzione	
1.1. Patologie tumorali della ghiandola surrenale.....	1
1.2. Carcinoma corticosurrenalico	
1.2.1. Caratteristiche ed epidemiologia.....	2
1.2.2. Diagnosi.....	6
1.2.3. Prognosi.....	8
1.3. Terapia del carcinoma corticosurrenalico	
1.3.1. Terapia chirurgica.....	9
1.3.2. Radioterapia.....	10
1.3.3. Terapia farmacologica e chemioterapia.....	12
1.3.4. Tiazolidinedioni.....	15
- Rosiglitazone.....	17
1.4. Genetica del carcinoma corticosurrenalico.....	19
1.4.1. <i>TP53</i>	25
1.4.2. <i>IGF2</i>	29
1.4.3. Connessione tra p53 e IGF-II.....	30
2. Scopo del lavoro.....	34
3. Materiali e metodi	
3.1. Colture cellulari.....	35
3.2. Sequenziamento genico.....	36
3.3. Trattamento farmacologico.....	38
3.4. Trasfezioni e trattamento con radiazioni ionizzanti.....	38
3.5. Curve di proliferazione.....	39
3.6. Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare.....	40
3.7. Saggio MTT.....	40
3.8. Saggio TUNEL.....	41
3.9. Microscopia elettronica.....	42
3.10. Misurazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno.....	42
3.11. Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	43
3.12. Immunofluorescenza.....	43
3.13. RT-PCR.....	44

3.14. Preparazione di estratti proteici nucleari e citoplasmatici.....	46
3.15. Western blotting.....	46
3.16. Analisi statistica dei dati.....	47
4. Risultati	
4.1. Nuove strategie farmacologiche: il rosiglitazone nella terapia del carcinoma corti- cosurrenalico.....	48
4.1.1. Effetto del rosiglitazone sulla proliferazione cellulare.....	48
4.1.2. Effetto del rosiglitazone sulla sintesi di DNA e sul ciclo cellulare.....	52
4.1.3. Effetto del rosiglitazone sulle proteine regolatrici del ciclo cellulare nel- la linea SW-13.....	53
4.1.4. Effetto del rosiglitazone sul processo di morte cellulare per autofagia nel- la linea H295R.....	54
4.1.5. Effetto del rosiglitazone sull'attivazione della proteina AMPK.....	57
4.1.6. Attivazione delle proteine coinvolte nelle diverse fasi del processo autofa- gico.....	57
4.1.7. Formazione di specie reattive dell'ossigeno e alterazione del poten- ziale di membrana mitocondriale.....	59
4.2. Miglioramento delle attuali strategie terapeutiche: ruolo di p53 nella risposta al- la radioterapia.....	62
4.2.1. Analisi del gene <i>TP53</i>	62
4.2.2. Effetto di p53 <i>wild type</i> sulla proliferazione cellulare e nella risposta al- le radiazioni ionizzanti.....	64
4.2.3. Effetto delle radiazioni ionizzanti sulla stabilizzazione di p53.....	67
4.2.4. Valutazione della morte cellulare.....	69
4.2.5. Effetto sull'espressione di <i>IGF2</i>	71
4.2.6. Effetto sull'attivazione di Akt.....	72
4.2.7. Effetto di p53 ^{wt} su HIF-1 α	73
5. Discussione.....	79
6. Bibliografia.....	88
7. Prodotti del Dottorato.....	103

1. Introduzione

1.1. Patologie tumorali della ghiandola surrenale

Le ghiandole surrenali, o surreni, sono degli organi pari di forma piramidale posti al di sopra del polo superiore di ciascun rene. Esse sono costituite da due parti distinte per derivazione embrionale e per funzione endocrina. La parte centrale, o midollare, è responsabile della produzione delle catecolamine: adrenalina, noradrenalina e dopamina, mentre la parte più esterna, o corticale, è suddivisa a sua volta nelle zone glomerulare, fascicolata e reticolare, deputate rispettivamente alla sintesi degli ormoni steroidei mineraloattivi e glucoattivi, e degli androgeni. Gli ormoni prodotti dai surreni rivestono una fondamentale importanza nella regolazione del metabolismo corporeo, dell'equilibrio idrosalino e della risposta allo stress, pertanto alterazioni nella funzionalità di questi organi comportano generalmente gravi conseguenze per l'intero organismo (Grumbach *et al.*, 2003; Wood e Hammer, 2011).

La maggior parte delle lesioni nodulari che interessano le ghiandole surrenali è scoperta durante indagini richieste per altri disturbi e alle quali ci si riferisce perciò con il termine di "incidentalomi". Generalmente queste masse sono asintomatiche, tuttavia una piccola porzione di esse è responsabile di patologie caratterizzate dall'aumento della secrezione ormonale. All'interno di questo gruppo ricadono i feocromocitomi, gli adenomi corticosurrenali ed i carcinomi corticosurrenali. Nei pazienti con una pregressa diagnosi oncologica, inoltre, le lesioni a livello del surrene sono rappresentate nel 75% dei casi da metastasi derivanti da altri organi (Grumbach *et al.*, 2003).

La prevalenza dei tumori del surrene complessivamente si aggira intorno all'1% e tende ad aumentare con l'età. La mancanza di una sintomatologia evidente, tuttavia, rende spesso l'identificazione di tali patologie estremamente complessa, pertanto la loro reale incidenza potrebbe essere notevolmente sottostimata (Grumbach *et al.*, 2003).

Il feocromocitoma rappresenta una forma piuttosto rara di tumore del surrene che colpisce la porzione midollare, determinando un incremento anomalo della produzione di catecolamine da parte delle cellule cromaffini. Esso può presentarsi in forma sporadica o come componente di una sindrome geneticamente trasmessa. Le forme sporadiche sono prevalentemente diagnosticate in individui di età compresa tra i 40 e i 50 anni, mentre le forme familiari sono in genere diagnosticate più precocemente. Esse sono associate a sindromi genetiche quali la neoplasia endocrina di tipo 2 (MEN2), la neurofibromatosi di tipo 1 e la

sindrome di Von Hippel-Lindau, che sono determinate da mutazioni nei geni *RET*, *NF1* e *VHL*, rispettivamente. Le caratteristiche cliniche del feocromocitoma sono altamente variabili e comprendono ipertensione arteriosa e aritmie cardiache, la cui gravità dipende dal tipo di secrezione e dalla quantità di catecolamine rilasciate dal tumore (Lenders *et al.*, 2005).

I tumori che colpiscono la parte più esterna del surrene, o corticale, possono essere di natura benigna, nel caso degli adenomi, o maligna, nel caso dei carcinomi. In entrambi i casi, alla componente prettamente oncologica è spesso associata una componente endocrina e i tumori vengono normalmente classificati come secernenti o non secernenti, in base alla loro capacità di produrre ormoni steroidei (Latronico e Chrousos, 1997). La frequenza dei tumori della corteccia surrenalica mostra una prevalenza di circa il 3% nella popolazione intorno alla quinta decade di vita e la maggior parte di essi è costituita da tumori benigni non secernenti (Grumbach *et al.*, 2003; Allolio e Fassnacht, 2006).

Gli adenomi si presentano generalmente come masse di dimensioni variabili (diametro < 4.0 cm) e spesso non sono correlati ad una sintomatologia clinica precisa. La prevalenza di questi tumori nella popolazione in età media è pari a circa il 4%, mentre supera il 10% in età senile (Grumbach *et al.*, 2003).

I tumori maligni che colpiscono la corteccia del surrene sono invece molto più rari e costituiscono lo 0,05-2% di tutti i tumori (Latronico e Chrousos, 1997). Nonostante la scarsa diffusione di questa neoplasia nella popolazione, la prognosi spesso infausta ad essa associata ha reso sempre più importante negli ultimi anni l'approfondimento dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza del carcinoma corticosurrenalico e lo studio di nuove strategie terapeutiche per contrastarne le drammatiche conseguenze.

1.2. Carcinoma corticosurrenalico

1.2.1. Caratteristiche ed epidemiologia

Il carcinoma corticosurrenalico è una neoplasia rara che colpisce la parte più esterna della ghiandola surrenale, la cui esatta eziopatogenesi non è ancora stata del tutto chiarita. La sua incidenza a livello mondiale è stimata intorno a 1-2 casi per milioni di individui per anno nella popolazione adulta, tuttavia nella popolazione infantile del Sud del Brasile è stata riscontrata un'incidenza annua circa dieci volte più elevata rispetto alle popolazioni europee e nord-americane, in concomitanza con la presenza di una specifica mutazione del gene *TP53* (R337H) (Ribeiro *et al.*, 2001; Libè *et al.*, 2007).

Il carcinoma corticosurrenalico si manifesta con una frequenza maggiore nella popolazione di sesso femminile (58,6%) rispetto a quella maschile (41,4%) e in circa il 60% dei casi ha caratteristiche secernenti. Entrambe le ghiandole surrenali sembrano essere colpite con la stessa frequenza, nonostante alcuni studi riportino una lieve prevalenza di tumori localizzati a livello del surrene sinistro (52,8%); i tumori bilaterali sono invece più rari e costituiscono il 2-10% circa dei casi (Wooten e King, 1993; Latronico e Chrousos, 1997).

La distribuzione statistica per età segue un andamento bimodale, con un primo picco in età pediatrica ed un secondo picco registrato intorno alla quarta e quinta decade di vita, tuttavia il carcinoma corticosurrenalico può svilupparsi a qualunque età (Allolio e Fassnacht, 2006). La maggior parte dei carcinomi infantili viene diagnosticata grazie al manifestarsi di sindromi endocrine dovute ad una eccessiva produzione di ormoni steroidei da parte del tumore, il cui sintomo più comune è in questo caso la virilizzazione dovuta ad una iper-secrezione di androgeni (Ribeiro *et al.*, 2000). Nei bambini, il carcinoma corticosurrenalico è inoltre spesso associato a patologie genetiche quali la sindrome di Li-Fraumeni e la sindrome di Beckwith-Wiedemann, tuttavia molti tumori pediatrici e la maggior parte dei tumori negli adulti hanno un'insorgenza sporadica (Barlaskar e Hammer, 2007).

Il carcinoma corticosurrenalico viene spesso diagnosticato incidentalmente, nel corso di indagini radiologiche richieste per altri motivi clinici, mentre le successive valutazioni diagnostiche confermeranno la natura della lesione (Grumbach *et al.*, 2003).

I tumori maligni che colpiscono la corteccia surrenale possono essere di dimensioni variabili, generalmente maggiori di 4 cm. Macroscopicamente, presentano una colorazione giallo-arancio o ocra e al loro interno è di frequente osservazione la presenza di aree emorragiche o di necrosi. Microscopicamente, le cellule tumorali sono generalmente prive di lipidi e presentano un nucleo pleomorfo, con numerose figure mitotiche (Chouairy *et al.*, 2008).

Secondo alcuni autori, la probabilità che una massa surrenalica sia maligna aumenta significativamente con la sua grandezza, pertanto le dimensioni del tumore vengono generalmente utilizzate come indice predittivo di malignità. Nonostante si ritenga che dimensioni superiori ai 5-6 cm rappresentino un elevato fattore di rischio, la grandezza e il peso del tumore non costituiscono degli indicatori di malignità specifici. È stato infatti dimostrato che in circa il 14% dei casi, tumori di dimensioni inferiori ai 5 cm di diametro sono in grado di produrre metastasi (Waichenberg *et al.*, 2000; Barlaskar e Hammer, 2007; Chouairy *et al.*, 2008).

Lo stadio del tumore viene definito sulla base della classificazione proposta da Macfarlane e Sullivan, secondo la quale è possibile distinguere quattro diversi stadi. Al primo e secondo stadio, la massa è limitata alla ghiandola surrenale; le dimensioni del tumore sono inferiori ai 5 cm di diametro allo stadio I e superiori a 5 cm allo stadio II. Il terzo stadio è caratterizzato da un tumore di dimensioni maggiori, che può, in alcuni casi, invadere i tessuti circostanti, mentre al quarto stadio di sviluppo si osservano invasione di organi e linfonodi adiacenti e metastasi in organi e tessuti anche distanti, con una frequenza piuttosto elevata nei polmoni e nel fegato (Macfarlane, 1958; Sullivan *et al.*, 1978; Latronico e Chrousos, 1997). Le caratteristiche relative a ciascuno stadio tumorale sono riassunte nella tabella 1.1.

Stadio	T, N, M *	Descrizione
I	T1, N0, M0	Tumore <5cm, confinato alla ghiandola surrenale
II	T2, N0, M0	Tumore >5cm, confinato alla ghiandola surrenale
III	T1/T2, N1, M0	Tumore confinato alla ghiandola surrenale, con invasione di linfonodi adiacenti
	T3, N0, M0	Tumore esteso oltre la ghiandola surrenale, senza invasione di organi adiacenti
IV	T3/T4, N1, M0 Qualunque T, M1	Tumore esteso oltre la ghiandola surrenale, con invasione di organi adiacenti e linfonodi locali, o tumore a qualunque stadio, con presenza di metastasi

Tabella 1.1. Caratteristiche principali di ciascuno stadio del carcinoma corticosurrenalico. Da Latronico e Chrousos (1997), modificato.

* T, tumore; N, linfonodi; M, metastasi. 0, negativo.

In base alla loro capacità di produrre ormoni steroidei, infine, i carcinomi corticosurrenali vengono distinti in non secernenti e secernenti. I tumori definiti “non secernenti” sono neoplasie con una attività secretoria, di precursori e/o di ormoni, incapace di generare una sindrome clinica manifesta e sono spesso difficili da individuare dal punto di vista clinico, in quanto ad essi sono associati sintomi generici, quali dolore addominale, perdita di peso e la presenza di una massa addominale palpabile. Il quadro clinico dei pazienti affetti da un carcinoma secernente è invece caratterizzato dall’insorgenza di alterazioni metaboliche de-

terminate da una eccessiva produzione ormonale. Le sindromi indotte da un carcinoma secernente sono la sindrome di Cushing, dovuta ad un eccesso di glucocorticoidi, la sindrome virilizzante, associata all'eccesso di androgeni, la sindrome da femminilizzazione, nel caso di tumori estrogeno-secernti, la sindrome di Conn, relativa all'eccesso di mineralcorticoidi, e quadri clinici misti di ipercortisolismo associato a virilizzazione (Latronico e Chrousos, 1997; Wajchenberg *et al.*, 2000; Allolio e Fassnacht, 2006).

Le principali patologie associate all'iper-secrezione di ormoni da parte di un tumore corticosurrenalico sono schematizzate nella figura 1.1.

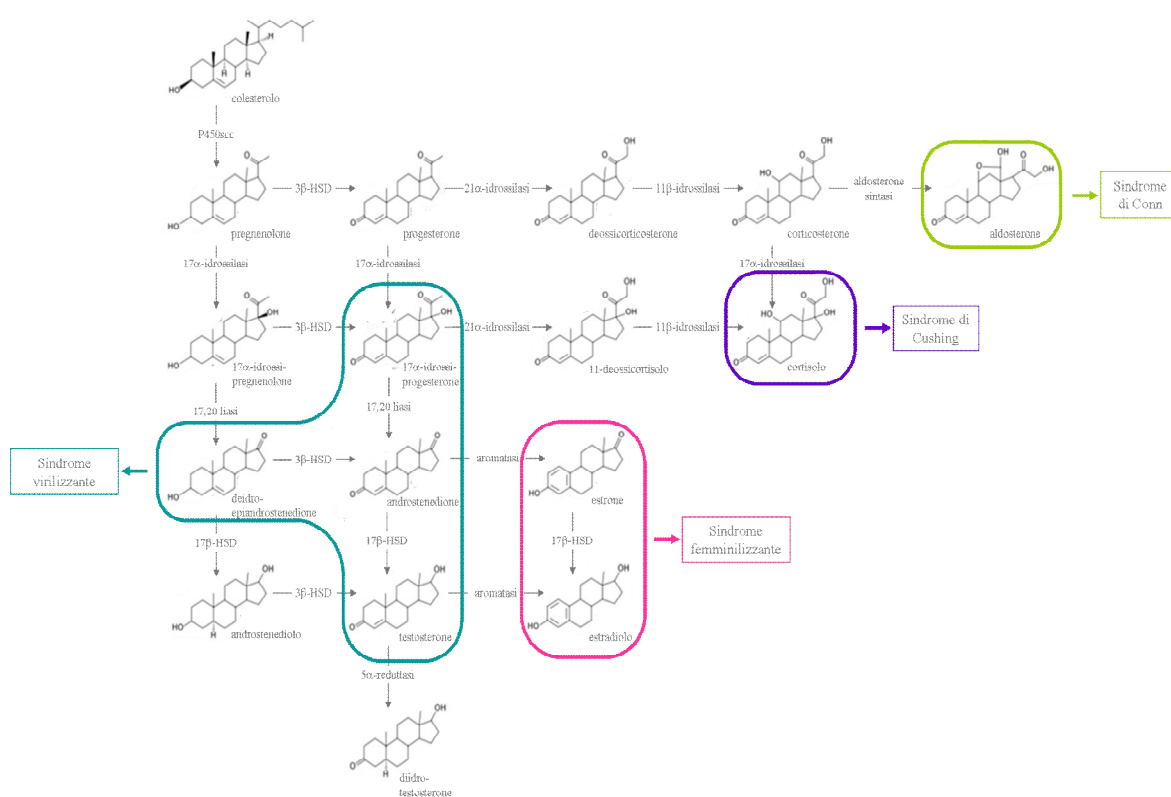


Fig. 1.1. Schema riassuntivo delle tappe per la biosintesi degli ormoni corticosurrenalici a partire dal colesterolo. Nella figura sono indicati gli ormoni maggiormente iper-secreti nei tumori secernenti e le sindromi metaboliche ad essi associate.

3β-HSD, 3β-idrossisteroidodeidrogenasi; 17β-HSD, 17β-idrossisteroidodeidrogenasi; P450scc, P450 side chain cleavage.

Sulla base delle caratteristiche funzionali del tumore, oltre alle due forme principali, ne esiste una terza, definita “pre-tossica”, ovvero incapace di indurre una sindrome obiettivamente manifesta, ma con una attività enzimatica biochimicamente rilevabile, in grado di

determinare delle modificazioni metaboliche significative, definite come condizione subclinica, o preclinica (Latronico e Chrousos, 1997). Il quadro clinico del paziente, in ogni caso, può subire cambiamenti nel corso del tempo, in relazione alla progressione del tumore.

1.2.2. Diagnosi

Il carcinoma corticosurrenalico viene spesso diagnosticato incidentalmente, infatti, soprattutto nei casi di tumori non secernenti, il quadro clinico dei pazienti non è sempre riconducibile ad un tumore del surrene. Il sospetto di un carcinoma deve tener conto di una serie di parametri clinici, biochimici e radiologici e deve essere infine confermato da analisi di citopatologia (Schteingart *et al.*, 2005).

L'analisi del profilo biochimico ed ormonale del tumore viene normalmente eseguito per determinare se esso sia secernente o meno e per valutare la severità dei sintomi ad esso associati. Nel caso dei tumori secernenti, il tipo e la quantità degli ormoni prodotti può fornire delle indicazioni relative al potenziale maligno della massa e di conseguenza influenzare il tipo di terapia da applicare. Il monitoraggio nel tempo di questi parametri, inoltre, consente di valutare l'efficacia della terapia scelta (Allolio e Fassnacht, 2006).

La diagnosi clinica delle sindromi endocrine indotte da un carcinoma corticosurrenalico viene effettuata mediante la misurazione degli steroidi plasmatici ed urinari, che risultano aumentati nel caso dei tumori secernenti. I tumori non secernenti, invece, sono caratterizzati dalla presenza di precursori inattivi degli ormoni steroidei nel plasma. Generalmente, l'aumento dei livelli di DHEA-S è considerato un indicatore di malignità della massa. L'iperglicemia viene riscontrata nel 15% circa dei pazienti con sindrome di Cushing, mentre l'ipokalemia è frequente nelle sindromi dovute ad un eccesso dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Latronico e Chrousos, 1997; Wajchenberg *et al.*, 2000).

La diagnostica per immagini rappresenta un procedimento fondamentale per l'identificazione di un carcinoma corticosurrenalico. Essa deve essere comunque associata alle indagini ormonali, in quanto da sola non è in grado di distinguere tra carcinomi e feocromocitomi (Allolio e Fassnacht, 2006).

L'identificazione della massa tumorale viene normalmente effettuata mediante tomografia computerizzata (TC) e/o risonanza magnetica nucleare (RMN), che consentono di rilevare noduli di grandezza molto ridotta, fino a 3-5 mm. La tomografia computerizzata fornisce informazioni relative alle dimensioni del tumore e consente di valutare la presenza di

calcificazione e di aree necrotiche; essa permette inoltre di determinare il livello di invasione locale. La risonanza magnetica nucleare, invece, consente di valutare l'invasione nei vasi sanguigni e risulta più accurata nel discriminare il carcinoma corticosurrenalico dal feocromocitoma. La RMN e la TC sono spesso associate a tecniche quali l'arteriografia e la venografia della vena cava, che permettono di studiare il grado di vascolarizzazione del tumore (Latronico e Chrousos, 1997).

Altre tecniche di diagnostica per immagini, quali l'ultrasonografia e la scintigrafia surrenale, hanno un'accuratezza limitata e per questo motivo non sono comunemente utilizzate, mentre recentemente è sempre più diffuso l'utilizzo della tomografia ad emissione di positroni con ^{18}F -fluorodeossiglucosio (FDG-PET) o con ^{11}C -metomidato per distinguere le masse benigne da quelle maligne (Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009).

La biopsia con ago aspirato rappresenta un ausilio importante nella diagnostica differenziale del carcinoma corticosurrenalico primitivo con le metastasi da neoplasie di altri organi. L'esecuzione della biopsia viene solitamente praticata con l'ausilio della tomografia computerizzata, ma generalmente essa è sconsigliata nel caso del sospetto di un tumore primitivo, a causa dell'elevato rischio di rottura della capsula tumorale, con conseguente diffusione del tumore nei tessuti circostanti. Attualmente, la sua indicazione è pertanto confinata alla diagnosi delle metastasi surrenaliche (Schteingart *et al.*, 2005).

L'analisi istologica del tumore risulta notevolmente complessa, a causa della eterogeneità anatomo-patologica del carcinoma corticosurrenalico e della conseguente difficoltà nell'individuazione di parametri istologici univoci. Attualmente, il sistema di classificazione maggiormente utilizzato è quello proposto da Weiss, che si basa sulla valutazione di nove criteri, a cui fa riferimento un punteggio, dalla cui sommatoria si stima il grado di malignità della neoplasia. Questi criteri sono rappresentati da: un alto grado nucleare, un elevato tasso di mitosi, presenza di figure mitotiche atipiche, presenza di eosinofilia citoplasmatica, architettura diffusa, presenza di necrosi, invasione delle strutture venose, invasione delle strutture sinusoidali e invasione della capsula (Weiss, 1984). In genere, i tumori che presentano almeno quattro di queste caratteristiche vengono classificati come carcinomi, mentre quelli con un punteggio inferiore a 3 sono considerati adenomi (Wajchenberg *et al.*, 2000), tuttavia la validità di questa valutazione è stata messa in discussione poiché, in alcuni casi, tumori cui era stato assegnato un punteggio pari a 3, e quindi considerati maligni, si sono successivamente rivelati benigni e, sebbene più raramente, tumori con un indi-

ce di Weiss pari a 2 sono risultati in grado di produrre metastasi (Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009).

Ulteriori informazioni sul grado di malignità del tumore possono essere acquisite grazie alla diagnosi con l'immunoistochimica. In particolare, il valore di positività del marcatore Ki67 permette di discriminare tra tumori benigni e maligni. Altri marcatori, quali il D11, l'inibina α , melan-A e la cromogranina A sono invece utili per stabilire l'origine surrenalica del tumore. Recentemente, inoltre, sono stati proposti nuovi indicatori di malignità per le neoplasie surrenali, in particolare l'over-espressione di IGF-II, della ciclina E, di SF-1 e delle forme mutate dell'onco-soppressore p53 (Wajchenberg *et al.*, 2000; Allolio e Fassnacht, 2006; Sbiera *et al.*, 2010).

1.2.3. Prognosi

La prognosi associata al carcinoma corticosurrenalico è altamente variabile, ma generalmente infausta, infatti la sopravvivenza media non supera i 5 anni dal momento della diagnosi (Assié *et al.*, 2007). Essa è strettamente correlata con lo stadio di differenziamento del tumore, la precocità della diagnosi e la presenza di metastasi alla diagnosi, la cui frequenza è variabile dal 30% all'85% dei casi (Stojadinovic *et al.*, 2002). L'insorgenza di metastasi è comune soprattutto nei carcinomi al IV stadio. Gli organi maggiormente colpiti sono fegato, polmoni, ossa, linfonodi locali, peritoneo, intestino, nonché altri meno comuni, quali cute e mucose. È piuttosto frequente, inoltre, lo sviluppo di metastasi nella ghiandola surrenale controlaterale al tumore primario (Wajchenberg *et al.*, 2000; Satter e Barnett, 2008).

La sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi è pari a circa il 60% dei pazienti che presentano un tumore al I e al II stadio, mentre i tassi di sopravvivenza si riducono al 24% per quelli al III stadio. Nel caso dei tumori al IV stadio, la presenza di metastasi diffuse determina un'aspettativa di vita generalmente inferiore ai 12 mesi. In quest'ultimo caso, inoltre, accade frequentemente che il tumore raggiunga dimensioni e caratteristiche tali per cui l'intervento non sia più consigliabile (Patalano *et al.*, 2009; Polat *et al.*, 2009).

Alcune caratteristiche, quali l'età del paziente, possono influenzare positivamente la prognosi, infatti i pazienti più giovani mostrano in genere tassi di sopravvivenza maggiori. Al contrario, la presenza di masse di dimensioni elevate, l'iperproduzione di alcuni ormoni, in particolare il cortisolo, e la presenza di alcune caratteristiche citologiche, quali figure mitotiche alterate e necrosi, sono comunemente associati ad una diminuzione delle aspettative

di vita (Abiven *et al.*, 2006; Allolio e Fassnacht, 2006). I principali fattori prognostici identificati per il carcinoma corticosurrenalico sono riassunti nella tabella 1.2.

Fattori prognostici nel carcinoma corticosurrenalico
Stadio del tumore
Dimensioni della massa
Parametri istologici (indice di Weiss)
Biologia del tumore (IGF-II, locus 17p13, ciclina E, Ki67, ecc.)
Rimozione completa o incompleta
Età alla diagnosi
Funzionalità del tumore (secernente o non)
Numero di figure mitotiche
Attività proliferativa del tumore

Tabella 1.2. Principali fattori prognostici identificati per il carcinoma corticosurrenalico. Da Patalano *et al.* (2009), modificato.

Le caratteristiche molecolari ed il profilo genetico della neoplasia rappresentano un potenziale strumento per la diagnosi precoce e garantirebbero una maggiore efficacia del trattamento, che dipende in larga misura dal livello di differenziamento del tumore (Libè *et al.*, 2007). Il costante monitoraggio dei pazienti, inoltre, è estremamente importante, data la spiccata tendenza di questo tipo di tumore a ripresentarsi o dare origine a metastasi, anche in seguito ad un intervento chirurgico. Il *follow up* prevede la misurazione dei *marker* ormonali in associazione alle metodiche di diagnostica per immagini, generalmente ogni 3 mesi (Allolio e Fassnacht, 2006).

1.3. Terapia del carcinoma corticosurrenalico

1.3.1. Terapia chirurgica

Il trattamento di scelta del carcinoma corticosurrenalico è rappresentato dalla rimozione chirurgica della massa. L'intervento chirurgico è particolarmente consigliato nei casi di carcinoma al primo, secondo e terzo stadio, e nei pazienti in età pediatrica. Per i carcinomi al quarto stadio, la rimozione del tumore è poco opportuna. In questo caso, essa ha lo scopo palliativo ridurre l'eccessiva secrezione ormonale e le sindromi derivanti dalla com-

pressione meccanica della neoplasia. L'asportazione delle metastasi, inoltre, sembra favorire la prognosi quando esse sono presenti in numero limitato (Patalano *et al.*, 2009).

La rimozione chirurgica del tumore primario viene generalmente attuata mediante chirurgia a cielo aperto o chirurgia laparoscopica. Quest'ultima è stata a lungo consigliata nei casi di lesioni di minori dimensioni, che non presentassero invasione dei tessuti adiacenti (Wajchenberg *et al.*, 2000; Schteingart *et al.*, 2005), tuttavia recenti studi hanno dimostrato che i pazienti sottoposti a surrenectomia laparoscopica sono soggetti ad un aumentato rischio di recidive locali e di carcinomatosi peritoneale come conseguenza della rottura della capsula tumorale, che rappresenta un evento piuttosto frequente durante questo tipo di intervento (Maluf *et al.*, 2011). Poiché la remissione a lungo termine del tumore sembra essere strettamente correlata con la completa rimozione della massa, la chirurgia a cielo aperto è pertanto attualmente consigliata quando le dimensioni del tumore superano i 10 cm e in tutti i casi dove vi sia un sospetto di malignità (Patalano *et al.*, 2009).

La rimozione delle metastasi viene generalmente effettuata mediante intervento chirurgico, quando il loro numero e dimensioni sono limitati. In alternativa, possono essere adottate terapie come la chemioembolizzazione e la termo-ablazione con radiofrequenza per metastasi del fegato, dei polmoni e dei reni che abbiano un diametro inferiore ai 4-5 cm (Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009).

1.3.2. Radioterapia

L'effetto della radioterapia nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico è oggetto di dibattito da anni. Per molto tempo, infatti, questa neoplasia è stata considerata radioresistente e diversi studi hanno evidenziato scarsi risultati in pazienti sottoposti a radioterapia dopo rimozione chirurgica del tumore (Wajchenberg *et al.*, 2000; Libè *et al.*, 2007). Altri autori, invece, hanno riportato una risposta positiva a questo tipo di trattamento nel 42% circa dei casi valutati (Allolio e Fassnacht, 2006).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'uso della radioterapia come trattamento adiuvante riduce in maniera significativa la percentuale di recidive dopo surrenectomia, evidenziandone pertanto un potenziale terapeutico significativo. In particolare, in uno studio del 2006 si è osservato che in pazienti sottoposti a terapia con radiazioni ionizzanti alla dose di 45-55 Gy per 5 settimane dopo l'intervento chirurgico, la probabilità di riduzione di recidiva della malattia era significativamente maggiore rispetto ai pazienti che non aveva usufruito della radioterapia (79% vs 12%) (Fassnacht *et al.*, 2006).

L'uso della radioterapia è stato preso in considerazione anche come trattamento palliativo nei casi di metastasi ossee associate al carcinoma corticosurrenalico. Nonostante le casistiche esistenti siano piuttosto esigue ed alcuni parametri non vengano monitorati regolarmente, l'efficacia delle radiazioni ionizzanti nel ridurre l'entità delle metastasi e dei sintomi ad esse associati è stata comunque dimostrata del 54% dei casi (Polat *et al.*, 2009).

I dati esistenti in letteratura relativamente all'efficacia della radioterapia nel carcinoma corticosurrenalico indicano che l'utilizzo di tale trattamento debba essere preso in considerazione solo dopo aver attentamente valutato il quadro clinico del singolo paziente. In particolare, l'uso della radioterapia è consigliato per i pazienti in cui, a seguito dell'intervento chirurgico, siano evidenziabili microscopici residui tumorali (R1), mentre per coloro che presentano una massa tumorale residua di dimensioni macroscopiche (R2) è consigliabile in prima istanza un secondo intervento di rimozione. La radioterapia è consigliabile anche nei casi in cui le dimensioni residue del tumore non sono note (RX) o quando il rischio di recidive è molto elevato. Infine, possono beneficiare della radioterapia come trattamento adiuvante anche pazienti con malattia avanzata e invasione degli organi vicini e pazienti con tumore al terzo stadio che presentano invasione dei linfonodi adiacenti, ma non a distanza (Polat *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda l'uso della radioterapia a seguito di un intervento chirurgico con rimozione completa (R0), non esistono delle linee guida generalizzate, tuttavia di norma questo trattamento è sconsigliato quando le dimensioni del tumore sono inferiore a 8 cm, mentre per tumori con dimensioni maggiori, che presentano invasione del circolo sanguigno (V1) e una percentuale di positività al Ki67 maggiore del 10%, la radioterapia è spesso consigliabile (tabella 1.3) (Polat *et al.*, 2009).

Stadio	T, N, M *	R0	R1	RX	R2
I, II	T1/T2	°	++	++	+, #
	T1/T2, N1	+, °	++	++	+, #
III	T3/T4, N0/N1	+	++	++	+, #
IV	T1/T4, N0/N1, M1	—	—	—	—

Tabella 1.3. Indicazioni per la radioterapia post-operatoria. Da Polat *et al.* (2009), modificato.

* T, tumore; N, linfonodi; M, metastasi. 0, negativo.

++: elevata probabilità di effetti positivi dopo radioterapia; +: possibili effetti positivi; -: radioterapia sconsigliata; °: decisione da individualizzare; #: secondo intervento consigliato.

In base alle esperienze cliniche valutate, il protocollo terapeutico basato sull'uso di radiazioni ionizzanti prevede la valutazione delle caratteristiche individuali di ciascun paziente. Il trattamento comunque dovrebbe essere iniziato il prima possibile, entro tre mesi dall'intervento chirurgico. Al momento, tuttavia, non vi è ancora accordo sulle dosi da utilizzare, infatti nei diversi studi condotti finora, la più alta dose riportata è di 60 Gy (Markoe *et al.*, 1991), sebbene altri autori raccomandino di applicare dosi più basse, comprese tra 20 e 55 Gy, per un periodo che va dalle 5 alle 6 settimane (Polat *et al.*, 2009).

L'uso della radioterapia in associazione con agenti chemioterapici, quali il mitotano, è attualmente oggetto di interesse. Alcuni in studi riportano infatti l'efficacia del trattamento combinato mitotano/radiazioni ionizzanti nell'inibire la proliferazione di linee cellulari derivanti da carcinoma corticosurrenalico (Cerquetti *et al.*, 2008; Maluf *et al.*, 2011). Nonostante uno studio del 2010, condotto su un gruppo di pazienti trattati con mitotano dopo intervento chirurgico, non abbia evidenziato differenze significative tra i pazienti che erano stati concomitantemente sottoposti a radioterapia e quelli che non avevano usufruito di questo trattamento, altri autori sostengono invece un possibile effetto positivo della radioterapia combinata ad agenti citotossici (Hermsen *et al.*, 2010; Sabolch *et al.*, 2010).

1.3.3. Terapia farmacologica e chemioterapia

La terapia farmacologica o con agenti chemioterapici viene generalmente attuata quando la completa rimozione del tumore non è possibile e nei casi di recidive. Il trattamento farmacologico raccomandato prevede l'utilizzo di un farmaco con azione specifica per le cellule del surrene, il mitotano (orto, para-diclorodifenildicloroetano, o o,p'-DDD). Esso è un composto analogo del DDT che determina un effetto citotossico diretto e specifico, determinando la degenerazione localizzata delle zone fascicolata e reticolare (Allolio e Fasnacht, 2006).

Il mitotano esercita un potente effetto adrenolitico e riduce la sintesi degli ormoni steroidei, inibendo gli enzimi della steroidogenesi, come l'11 β -idrossilasi e il p450_{scc}, che taglia la catena laterale del colesterolo (Maluf *et al.*, 2011). Tali effetti possono rivelarsi positivi nei pazienti in cui il tumore determina un'iper-secrezione ormonale, tuttavia rendono ne-

cessaria la somministrazione di ormoni, in particolare glucocorticoidi, nei pazienti con carcinomi non secernenti (Hahner e Fassnacht, 2005; Libè *et al.*, 2007).

Oltre all'effetto adrenolitico, il mitotano ha diversi effetti collaterali che si manifestano principalmente a carico del sistema gastrointestinale e del sistema nervoso centrale, ma anche sul fegato, dove si evidenzia un aumento dei livelli delle transaminasi che comunque non rende necessario, nella maggior parte dei casi, la sospensione del trattamento (Allolio *et al.*, 2004). Nonostante i potenti effetti collaterali osservati, in diversi studi è stato dimostrato che il trattamento con mitotano comporta una riduzione della neoplasia nel 25% circa dei casi (Allolio e Fassnacht, 2006; Libè *et al.*, 2007).

L'elevata probabilità di recidive a seguito dell'asportazione chirurgica del carcinoma corticosurrenalico ha suggerito inoltre la possibilità di somministrare il mitotano come terapia adiuvante. In uno studio retrospettivo, alcuni autori hanno dimostrato un prolungamento significativo della vita nei pazienti trattati con mitotano dopo surrenectomia rispetto a gruppi di controllo, suggerendo una concreta validità di questo regime terapeutico (Terzolo *et al.*, 2007).

Nonostante il mitotano rappresenti attualmente il farmaco di elezione nel trattamento del carcinoma corticosurrenalico, l'entità degli effetti collaterali ad esso associati e la sua inefficacia in molti casi continuano ad essere motivo di dibattito sulla validità del suo utilizzo (Barzon *et al.*, 1999; Bertherat *et al.*, 2007; Grubbs *et al.*, 2010).

Sebbene il meccanismo d'azione del mitotano non sia stato ancora completamente chiarito, l'esito della terapia sembra essere correlato alla capacità del tessuto neoplastico di attivare il farmaco, infatti l'azione del mitotano implica la sua trasformazione in un composto reattivo e il legame con delle macromolecole presenti a livello cellulare. I tumori che sono in grado di metabolizzare l'o,p'-DDD, perciò, risponderebbero al trattamento, al contrario di quelli che non possiedono questa capacità (Hahner e Fassnacht, 2005; Schteingart, 2007).

Il mitotano viene spesso utilizzato anche in combinazione con altri agenti chemioterapici, per potenziarne l'effetto. L'efficacia della chemioterapia nel trattamento del carcinoma corticosurrenalico è piuttosto ridotta e il suo utilizzo è limitato a pazienti con malattia locale avanzata o metastatica non trattabili con la terapia chirurgica. Il fallimento della chemioterapia sembra essere determinato dalla forte espressione del gene per la resistenza multipla ai farmaci (*MDR1*) nel carcinoma corticosurrenalico, il quale comporta la comparsa di

elevati livelli di glicoproteina P (Pgp), che agisce come una pompa di efflusso del farmaco adottato (Allolio *et al.*, 2004).

Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che il mitotano è in grado di contrastare la farmaco-resistenza indotta dalla glicoproteina P, pertanto sono stati studiati diversi protocolli terapeutici basati sull'utilizzo di diversi chemioterapici in associazione con l'o,p'-DDD (Bates *et al.*, 1991; Allolio e Fassnacht, 2006). Sulla base di questi dati è stata riportata una riduzione della neoplasia nel 25% dei casi co-trattati con mitotano.

Tra i vari chemioterapici testati, quello maggiormente utilizzato è il cisplatino, che viene somministrato da solo o in concomitanza con altri composti, quali doxorubicina, ciclofosfamide, etoposide e 5-fluorouracile. Il regime terapeutico EDP (etoposide, doxorubicina e cisplatino), in concomitanza con il mitotano, sembra essere altamente efficace nell'indurre una regressione tumorale e nel favorire la possibilità di un successivo intervento chirurgico. Gli effetti collaterali del trattamento sembrano inoltre essere piuttosto contenuti (Berruti *et al.*, 2005).

Attualmente esistono svariati protocolli terapeutici, che prevedono la somministrazione di vari agenti chemioterapici in combinazione tra loro, come ciclofosfamide, doxorubicina e cisplatino; 5-fluorouracile, doxorubicina e cisplatino (Schlumberger *et al.*, 1988); vincristina, cisplatino, teniposide e ciclofosfamide (Khan *et al.*, 2004); paclitaxel, ifosfamide e cisplatino (regime TIP) (Imataki *et al.*, 2006), streptozotocina e mitotano (Khan *et al.*, 2000), e molti altri. L'efficacia dei diversi trattamenti è altamente variabile e non sempre ben documentata, tuttavia alcuni di questi protocolli terapeutici sono attualmente utilizzati in *trial* clinici per il trattamento del carcinoma corticosurrenalico avanzato (Maluf *et al.*, 2011). Secondo la *Ann Arbor International Consensus Conference*, infatti, combinazioni di etoposide, doxorubicina, cisplatino e mitotano, o di streptozotocina e mitotano, rappresentano attualmente i trattamenti più largamente utilizzati (Schteingart *et al.*, 2005).

In alternativa a questi farmaci, sono stati condotti numerosi studi per cercare di individuare nuove sostanze efficaci per la cura delle neoplasie corticosurrenaliche, in grado di ridurre gli effetti collaterali spesso associati con la somministrazione dei chemioterapici convenzionali. In uno studio del 1991, l'effetto della suramina, un inibitore dei fattori di crescita tumorali, è stato testato su colture primarie di cellule della corticale del surrene, con risultati positivi, tuttavia studi effettuati su pazienti hanno dimostrato che la risposta al trattamento è transiente e gli effetti collaterali sono anche in questo caso estremamente gravi (Dorfinger *et al.*, 1991; Arlt *et al.*, 1994).

Al contrario, il trattamento con Gossipol, un polifenolo di origine vegetale, sembra indurre degli effetti terapeutici simili a quelli di altri chemioterapici, tuttavia gli effetti collaterali associati sono generalmente scarsi e reversibili. Inoltre, in alcuni studi è stata dimostrata un'efficacia del trattamento in circa il 17-19% dei casi (Flack *et al.*, 1993; Allolio *et al.*, 2004).

1.3.4. Tiazolidinedioni

I tiazolidinedioni, o glitazoni, rappresentano una classe di farmaci comunemente utilizzati per la cura del diabete mellito di tipo 2, grazie alla loro capacità di ridurre l'iperglicemia e l'iper-insulinemia associate all'insulino-resistenza. I principali tiazolidinedioni conosciuti sono il troglitazone, il rosiglitazone e il pioglitazone. Essi differiscono nelle catene laterali, tuttavia sono tutti in grado di legare i recettori nucleari appartenenti alla famiglia dei PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), in particolare PPAR γ (Willson *et al.*, 1996; Olefsky, 2000; Lebovitz e Banerji, 2001).

Il legame dei tiazolidinedioni con PPAR γ , che normalmente si trova nel citoplasma in forma inattiva, determina l'attivazione del recettore, consentendogli di formare un eterodimero con il recettore del retinoide X (RXR). Questo eterodimero è quindi in grado di traslocare nel nucleo e di legarsi a specifiche sequenze del DNA, dette PPREs (Peroxisome Proliferator hormone Responsive Elements), determinando l'attivazione o l'inibizione trascrizionale di geni coinvolti, ad esempio, nel differenziamento e nella proliferazione cellulare, nella risposta infiammatoria e nel metabolismo dei lipidi (figura 1.2) (Lebovitz e Banerji, 2001).

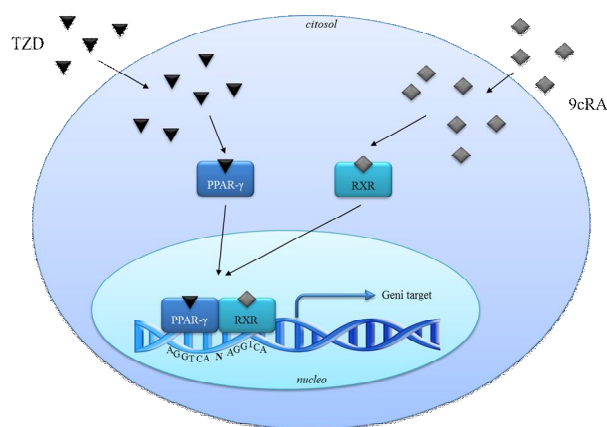


Figura 1.2. Schema del meccanismo d'azione di PPAR- γ . Il recettore si trova normalmente nel citoplasma legato a delle proteine di co-repressione; una volta attivato dal legame con i propri ligandi, esso eterodime-

rizza con il recettore del retinoide X. Il complesso PPAR- γ /RXR trasloca quindi nel nucleo, dove riconosce e si lega ad una sequenza PPRE (AGGTCA N AGGTCA), attivando o inibendo la trascrizione genica.

PPAR- γ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ; RXR, Recettore del Retinoide X; PPRE, Peroxisome Proliferator hormone Responsive Elements; TZD, tiazolidinedioni; 9cRA, acido 9-cis-retinoico.

Gli effetti dei tiazolidinedioni variano a seconda del tessuto considerato, tuttavia il principale effetto della loro somministrazione è l'aumento della sensibilità cellulare all'insulina, che risulta fondamentale per contrastare i disturbi associati alla sindrome metabolica (Olefsky, 2000; Lebovitz e Banerji, 2001). A livello del tessuto nervoso, i tiazolidinedioni sembrerebbero in grado di ridurre la predisposizione all'insorgenza di malattie neurodegenerative indotta da una riduzione della sensibilità delle cellule neuronali all'insulina (Watson e Craft, 2003; Jiang *et al.*, 2008). Inoltre, agendo a livello dei recettori PPAR, essi sono in grado di esercitare un potente effetto anti-infiammatorio, determinando l'inibizione di fattori quali l'Activator Protein 1 (AP-1) e il Nuclear Factor κ B (NF κ B) (Delerive *et al.*, 2001).

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra l'iper-insulinemia ed un maggiore rischio di sviluppare diversi tipi di tumore (Fair *et al.*, 2007; Belfiore *et al.*, 2009). La capacità dei tiazolidinedioni di aumentare l'assorbimento di insulina a livello cellulare sembrerebbe quindi correlata con un loro potenziale utilizzo come farmaci anti-tumoral (Belfiore *et al.*, 2009).

Precedenti studi hanno in effetti dimostrato che alcuni membri della classe dei tiazolidinedioni possiedono un'attività antiproliferativa diretta contro diverse linee cellulari di cancro (Kubota *et al.*, 1998; Heaney *et al.*, 2003; Ferruzzi *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Copland *et al.*, 2006; Han e Roman, 2006; Weng *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). L'inibizione della crescita è in genere legata ad un aumento nell'espressione di geni quali *CDKN1A* e *CDKN1B*, che codificano per gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti p21 e p27, e ad una diminuzione dei livelli delle cicline D1 ed E, che comporta un arresto del ciclo cellulare in fase G1 e, in molti casi, morte cellulare per apoptosi. Poiché questo fenomeno sembra interessare solamente le cellule tumorali, e non quelle normali, diversi autori hanno ipotizzato un possibile utilizzo dei tiazolidinedioni come farmaci chemioterapici (Harris e Phipps, 2002; Lu *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2006).

Rosiglitazone

Il rosiglitazone (5-((4-(2-(metil-piramidilammino)etossi)fenil)metil)-2,4-tiazolidinedione) è il membro della classe dei tiazolidinedioni che possiede la maggiore affinità di legame per PPAR γ (Lehmann *et al.*, 1995; Willson *et al.*, 1996). Rispetto agli altri glitazoni, esso manifesta un'azione più specifica ed è stato per questo utilizzato come farmaco preferenziale nella terapia di diverse patologie (Lebovitz e Banerji, 2001).

L'effetto del rosiglitazone nell'inibizione della proliferazione cellulare è stato dimostrato in diversi modelli di tumore *in vitro* ed *in vivo* (Kubota *et al.*, 1998; Heaney *et al.*, 2003; Pérez-Ortiz *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Han e Roman, 2006). Molti studi spiegano questo effetto ipotizzando un coinvolgimento delle vie di trasduzione del segnale PPAR γ -mediate, tuttavia esistono delle evidenze sperimentali che dimostrano il coinvolgimento di altre vie, indipendenti dall'attivazione di questo recettore (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004; Han e Roman, 2006).

Nel caso del carcinoma corticosurrenalico, poiché le terapie finora esistenti hanno dimostrato una validità limitata nel ridurre l'invasività e la malignità del cancro, la cui aggressività è estremamente elevata e la cui prognosi è purtroppo molto grave, la possibilità di impiegare un farmaco quale il rosiglitazone nella cura del tumore potrebbe rappresentare una prospettiva molto interessante. Attualmente esistono pochissimi studi relativi agli effetti del rosiglitazone sul carcinoma del surrene, tuttavia sembra che il farmaco sia in grado di inibire la crescita delle cellule tumorali delle linee H295R e SW-13 (Betz *et al.*, 2005; Ferruzzi *et al.*, 2005; Cantini *et al.*, 2008).

I meccanismi molecolari alla base di questo effetto non sono chiari e il coinvolgimento di PPAR γ è stato messo in discussione (Ferruzzi *et al.*, 2005), inoltre esiste la possibilità che le due vie, PPAR γ -dipendente e PPAR γ -indipendente, agiscano sinergisticamente per inibire la proliferazione del cancro.

L'attivazione di PPAR γ a seguito del legame con il rosiglitazone, sembrerebbe determinare un aumento dell'espressione di *PTEN* (Phosphatase and Tensin homologue on chromosome Ten), la cui capacità di riconvertire il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP₃) in fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP₂) impedisce l'attivazione della protein-chinasi B (PKB, o Akt) ad opera della fosfoinositolo-3-chinasi di classe I (PI3K-I) (figura 1.3). Akt è un fattore anti-apoptotico che stimola la proliferazione cellulare e risulta spesso iperattivato nelle cellule tumorali, comprese quelle di carcinoma corticosurrenalico (Fassnacht *et al.*, 2005; Han e Roman, 2006; Keshamouni *et al.*, 2007; Barlaskar *et al.*, 2009).

L'inibizione di Akt da parte del rosiglitazone comporta arresto della proliferazione cellulare e, in molti casi, morte per apoptosi. Questo meccanismo è stato il primo ad essere descritto, tuttavia diversi studi hanno dimostrato che il rosiglitazone è in grado di inibire la crescita tumorale *in vitro* anche mediante dei meccanismi PPAR γ -indipendenti, ad esempio attraverso l'attivazione dell'AMP-activated Protein Kinase α (AMPK α), l'inibizione della p70 ribosomal protein S6 Kinase (p70S6K) o l'inibizione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (figura 1.3) (Brunmair *et al.*, 2004; Han e Roman, 2006; LeBrasseur *et al.*, 2006).

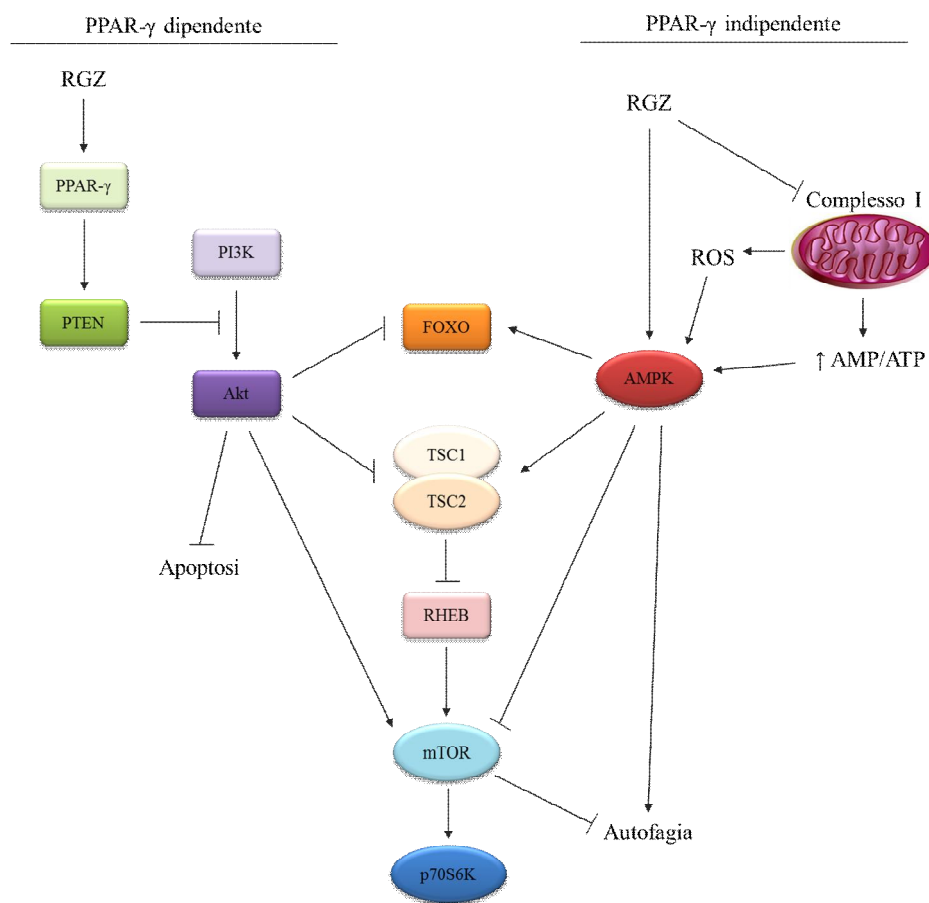


Figura 1.3. Schema delle possibili vie di traduzione del segnale stimulate dal rosiglitazone (RGZ). Il meccanismo d'azione PPAR- γ dipendente si esplica mediante il legame del rosiglitazone con questo recettore nucleare, che induce l'espressione di PTEN, impedendo l'attivazione di Akt da parte della fosfoinositolo-3-chinasi di classe I (PI3K-I) e inibendo in questo modo l'attività di mTOR. Attraverso una via indipendente da PPAR- γ , invece, il rosiglitazone stimola l'attivazione di AMPK (protein-chinasi attivata dall'AMP), reprimendo l'attivazione di mTOR e favorendo l'induzione della morte cellulare per autofagia.

A suffragio degli effetti PPAR γ -indipendenti del rosiglitazone, alcuni studi condotti su linee cellulari prive di questo recettore hanno evidenziato che esse risultano comunque inibite dal trattamento con tiazolidinedioni (Weng *et al.*, 2006), inoltre la somministrazione di GW9662 (2-cloro-5-nitrobenzilnilide), un antagonista di PPAR γ , non è in grado di sopprimere l'arresto della proliferazione cellulare indotto dal trattamento con il rosiglitazone in modelli cellulari di astrociti e di tumore del polmone (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004; Han e Roman, 2006).

Le differenze riscontrate, relative ai meccanismi molecolari che determinano l'arresto della crescita nelle cellule trattate con il rosiglitazone, potrebbero essere dovute al fatto che cellule derivanti da tessuti diversi rispondono al trattamento con l'attivazione di vie di trasduzione del segnale alternative (Betz *et al.*, 2005; Han e Roman, 2006; Weng *et al.*, 2006). Lo studio più approfondito dei bersagli molecolari del rosiglitazone e delle modalità con cui essi interagiscono tra loro potrebbe essere quindi d'aiuto per stabilire l'effettiva validità del trattamento con questo farmaco e per determinare quali altri composti possano alterarne l'azione. La conferma dell'effetto antitumorale del rosiglitazone sulle cellule del carcinoma corticosurrenalico, inoltre, rappresenterebbe un'ottima prospettiva per la cura di questa neoplasia.

1.4. Genetica del carcinoma corticosurrenalico

Attualmente, le conoscenze relative alle alterazioni genetiche coinvolte nella predisposizione al carcinoma corticosurrenalico sono piuttosto scarse, tuttavia sono stati individuati alcuni geni apparentemente coinvolti nello sviluppo di questo tumore. Le mutazioni finora identificate sono generalmente a carico di geni onco-soppressori, quali *TP53*, *CDKN1C*, *MEN1* e *CDKN2A*, o di oncogeni, tra cui *IGF2*, *RAS* e *CTNNB1* (Wajchenberg *et al.*, 2000; Latronico *et al.*, 2001; Barlaskar e Hammer, 2007; Libè *et al.*, 2007).

Alcune patologie ereditarie e sindromi tumorali sono state correlate alla tumorigenesi adrenocorticale. Esse comprendono la sindrome di Li-Fraumeni, la sindrome di Beckwith-Wiedemann, la neoplasia endocrina multipla di tipo 1, il complesso di Carney ed altre patologie meno note, come la sindrome di McCune-Albright (Barlaskar e Hammer, 2007; Libè *et al.*, 2007; Haase and Willenberg, 2009; Opocher *et al.*, 2009; Soon e Sidhu, 2009). Nell'ambito di tali sindromi, i tumori maligni della corticale surrenalica tendono a manifestarsi prevalentemente in età pediatrica, mentre i tumori associati a mutazioni sporadiche sono più frequenti nella popolazione adulta.

La tabella 1.4 schematizza le principali patologie correlate con l'insorgenza di tumori del surrene e le alterazioni geniche alla loro base.

Sindrome	Adenoma o carcinoma	Alterazioni geniche/molecolari	Caratteristiche cliniche
Li-Fraumeni	ACC	17q13.1 (<i>TP53</i>)	Suscettibilità a diversi tipi di tumore
Beckwith-Wiedemann	ACC	11q15.5 (<i>IGF2</i> , <i>H19</i> , <i>CDKN1C</i>)	Macroglossia, macrosomia, tumore di Wilms, ACC
Neoplasia endocrina multipla di tipo 1	ACA/ACC	11q13 (<i>MEN1</i>)	Iperparatiroidismo, tumori ipofisari, pancreatici e surrenali, feocromocitoma
Complesso di Carney	ACA	17q23-24 (<i>PRKAR1A</i>) 2p16	PPNAD, mixomi, tumori ipofisari e testicolari, pigmentazione a chiazze
Poliposi adenomatosa familiare	ACA/ACC	5q21-22 (<i>APC</i>)	Polipi del colon, carcinoma coloretale
McCune-Albright	ACA	20q13 (<i>GNAS 1</i>)	Pubertà precoce, iper-attività endocrina, displasia fibrosa poliostotica

Tabella 1.4. Caratteristiche molecolari e cliniche delle sindromi genetiche associate con l'insorgenza di tumori della corteccia surrenale. Da Barlaskar e Hammer (2007), modificato.

ACA, adenoma corticosurrenalico; ACC, carcinoma corticosurrenalico; PPNAD, iperplasia nodulare pigmentata primitiva.

La sindrome di Li-Fraumeni (LFS) è una patologia autosomica dominante caratterizzata da una maggiore suscettibilità allo sviluppo di neoplasie, quali tumori della mammella, dell'encefalo, del muscolo scheletrico e della corteccia surrenalica, che si manifestano prevalentemente in giovane età (Olivier *et al.*, 2003; Opocher *et al.*, 2009). L'associazione tra la sindrome di Li-Fraumeni e mutazioni germinali del gene *TP53* è stata riscontrata in più del 70% delle famiglie colpite da questa malattia; tali mutazioni sono prevalentemente mutazioni missenso localizzate nella regione genica che comprende gli esoni 5-8, che comportano una perdita dell'attività trascrizionale della proteina (Olivier *et al.*, 2003; Libè *et al.*, 2007; Opocher *et al.*, 2009).

La sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS) è una malattia genetica rara a trasmissione autosomica dominante, dovuta ad alterazioni nella regione cromosomica 11p15.5 e caratterizzata da sintomi quali macroglossia, macrosomia, visceromegalia, difetti della parete addominale ed una maggiore predisposizione allo sviluppo di neoplasie, in particolare il tu-

more di Wilms, il neuroblastoma ed il carcinoma corticosurrenalico (Barlaskar e Hammer, 2007; Haase e Willenberg, 2009). La sindrome di Beckwith-Wiedemann è caratterizzata dall'over-espressione del fattore di crescita insulino-simile (IGF-II), a causa di anomalie cromosomiche strutturali del cromosoma 11 o, più frequentemente, come conseguenza di eventi epigenetici, quali la perdita dell'*imprinting* o la disomia uniparentale. Tale fenomeno appare particolarmente importante nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico, dove *IGF-II* risulta fortemente over-espresso (Barlaskar e Hammer, 2007; Soon e Sidhu, 2009).

La neoplasia endocrina multipla di tipo 1 (MEN1) è una patologia autosomica dominante associata nel 90% dei casi a mutazioni germinali del gene *MEN1* e, più raramente, a mutazioni nei geni *CDKN2B/p15*, *CDKN1B/p27*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21* (Haase e Willenberg, 2009). Essa si manifesta principalmente con iperparatiroidismo, tumori pancreatico-duodenali e ipofisari, feocromocitoma, carcinoma corticosurrenalico e carcinoma tiroideo (Patalano *et al.*, 2009; Soon e Sidhu, 2009). La presenza di tumori del surrene è generalmente riscontrata nel 25-40% dei casi di MEN1; la maggior parte di essi è rappresentata da adenomi non secernenti associati con mutazioni germinali di *MEN1*, tuttavia la perdita di eterozigotità della regione 11q13, dove è localizzato il gene *MEN1*, è stata osservata nel 90% dei carcinomi corticosurrenalici e solo nel 20% degli adenomi. Ciò ha indotto a ipotizzare che nella regione sia presente un altro gene onco-soppressore di natura sconosciuta, potenzialmente coinvolto nello sviluppo di tumori maligni (Heppner *et al.*, 1999; Libè *et al.*, 2007; Bielinska *et al.*, 2009; Soon e Sidhu, 2009).

Il complesso di Carney (CNC) è una sindrome ad ereditarietà autosomica dominante caratterizzata da pigmentazione cutanea a chiazze, iperattività endocrina, mixomi e diversi tipi di neoplasie, che comprendono i tumori testicolari, della tiroide e della corteccia del surrene. L'esatto meccanismo fisiopatologico di questa malattia deve tuttora essere chiarito, tuttavia è nota la sua associazione con mutazioni del gene *PRKAR1A*, che codifica per la subunità regolatrice della proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA), e con alterazioni a carico del *locus* cromosomico 2p16 (Latronico e Chrousos, 1997; Patalano *et al.*, 2009; Soon e Sidhu, 2009).

La poliposi adenomatosa familiare (FAP) è una patologia autosomica dominante caratterizzata dalla formazione di una moltitudine di polipi nel colon, che può degenerare nell'insorgenza di un carcinoma coloretale. La FAP è determinata da mutazioni nel gene *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) o da perdita di eterozigotità nella regione cromosomica 5q21-q22, dove mappa questo gene. La conseguenza principale della perdita di funzione

di APC è l'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata da Wnt, con una conseguente iper-attivazione della β -catenina ed un aumento nella trascrizione dei geni *target* di quest'ultima (Libè *et al.*, 2007; Haase e Willenberg, 2009; Kim *et al.*, 2009). L'associazione tra mutazioni di APC e l'insorgenza di tumori della corteccia surrenalica è stata osservata nel 7-13% dei pazienti affetti da FAP (Libè *et al.*, 2007; Haase e Willenberg, 2009), inoltre il coinvolgimento della via mediata da Wnt nella tumorigenesi surrenalica è supportato dall'osservazione che in molti casi di tumore del surrene, di natura sia benigna che maligna, è riscontrabile un accumulo di β -catenina a livello nucleare, indicativo della sua attivazione (Tissier *et al.*, 2005; Libè *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Opocher *et al.*, 2009).

L'attivazione della β -catenina può essere dovuta, oltre a mutazioni nel gene APC, anche alla over-espressione di Wnt e alla presenza di mutazioni nel gene GSK3B. La Glycogen Synthase Kinase 3- β (GSK3- β) è infatti in grado di promuovere la degradazione proteasomica della β -catenina ed è inoltre implicata nella regolazione del ciclo cellulare; alterazioni in questo fattore potrebbero pertanto costituire un elemento predisponente per lo sviluppo del tumore (Tissier *et al.*, 2005; Libè *et al.*, 2007).

La presenza di mutazioni nel gene CTTNB1, che codifica per la β -catenina, è molto comune negli adenomi e nei tumori maligni corticosurrenalici. In particolare, mutazioni nel sito di fosforilazione bersaglio della GSK3- β sono responsabili dell'accumulo della β -catenina. L'attivazione costitutiva di questa proteina sembra essere uno dei fattori principali che conducono all'inizio della carcinogenesi corticosurrenalica e il suo accumulo a livello nucleare rappresenta un fattore predittivo indicativo di uno stadio tumorale più avanzato e di una aspettativa di vita inferiore nei pazienti affetti da carcinoma corticosurrenalico (Tissier *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009; Gaujoux *et al.*, 2011).

Contrariamente ai tumori correlati con sindromi geneticamente trasmesse, che sono tipici dell'infanzia, i carcinomi sporadici si manifestano più frequentemente in età adulta. Le alterazioni genetiche alla base della tumorigenesi in questo caso sono meno definite, tuttavia sono stati individuati alcuni fattori che favoriscono lo sviluppo di tumori con fenotipo più aggressivo. Ad oggi, sono state identificate numerose mutazioni che determinano una iper-attivazione di oncogeni, quali RAS, MYC, BCL2, PRKAR1A e CTNNB1, o l'inattivazione di geni onco-soppressori, in particolare TP53, CDKN1C, CDKN2A, RB1 e H19 (Latronico e Chrousos, 1997; Libè *et al.*, 2007).

L'over-espressione di alcuni fattori di crescita rappresenta un ulteriore elemento che favorisce la progressione dei tumori maligni che colpiscono la corteccia surrenale. Il più noto tra di essi è il fattore di crescita insulino-simile di tipo II (IGF-II), che risulta over-espresso in più del 90% dei casi di carcinoma corticosurrenalico, rispetto al tessuto sano ed agli adenomi benigni (Gicquel *et al.*, 1997; Latronico e Chrousos, 1997; Libè *et al.*, 2007; Assié *et al.*, 2010). Altri fattori, come VEGF, TGF- α (Transforming Growth Factor- α), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) e TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) sembrano essere implicati nella regolazione della crescita e della funzionalità delle cellule tumorali. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), in particolare, risulta essere fortemente over-espresso nel carcinoma corticosurrenalico e nei pazienti colpiti da questo tumore, i livelli sierici di VEGF sono maggiori rispetto ai soggetti sani; tali livelli tendono inoltre a diminuire in maniera significativa dopo la rimozione chirurgica della massa (Libè *et al.*, 2007).

Poiché l'over-espressione dei fattori di crescita rappresenta un evento piuttosto comune in diversi tipi di tumore, numerosi studi hanno cercato di identificare dei fattori specifici per la carcinogenesi corticosurrenalica. Recentemente, è stato dimostrato che il recettore dei glucocorticoidi (GR) è fortemente over-espresso nel 78-94% dei tumori maligni della corteccia surrenalica, mentre negli adenomi esso è over-espresso solo nel 2-6% dei casi. Nonostante non siano state identificate specifiche mutazioni a carico del gene *NR3C1*, che codifica per questo recettore, la valutazione dei suoi livelli di espressione sembra comunque rappresentare un utile fattore diagnostico. Inoltre, GR potrebbe rappresentare un importante bersaglio terapeutico, considerata la sua anomala attività trascrizionale nei tumori del surrene (Tacon *et al.*, 2009).

Un ulteriore fattore coinvolto nella tumorigenesi surrenalica è il fattore steroidogenico 1 (SF-1, Steroidogenic Factor-1). Esso è un recettore nucleare che regola l'espressione di molteplici geni coinvolti nello sviluppo surrenale e gonadico, nella steroidogenesi e nell'asse riproduttivo. Il gene *SF-1* risulta frequentemente amplificato ed over-espresso nei carcinomi pediatrici, mentre anomalie cromosomiche nel braccio lungo del cromosoma 9, dove mappa questo gene, sono state riscontrate nei tumori maligni degli adulti. È stato inoltre dimostrato che pazienti in cui i livelli di espressione di SF-1 risultavano più elevati mostravano una prognosi peggiore rispetto a quelli con valori nella norma, suggerendo quindi un importante valore predittivo, oltre che diagnostico, per questo fattore nell'ambito della carcinogenesi surrenalica (Almeida *et al.*, 2010; Sbiera *et al.*, 2010).

Sulla base delle nuove scoperte relative al ruolo prominente svolto dai microRNA nello sviluppo e nella progressione dei tumori, recentemente alcuni autori hanno cercato di delineare il *pattern* di espressione dei microRNA negli adenomi e nei carcinomi corticosurrenali, al fine di approfondire le conoscenze relative alle alterazioni genetiche che conducono allo sviluppo di tumori aggressivi (Singh *et al.*, 2011). Nel corso di tali studi, sono stati identificati molti microRNA che risultano espressi diversamente nei carcinomi corticosurrenali rispetto ai tumori benigni e al tessuto sano. In particolare, i microRNA miR-483-3p, miR-483-5p, miR-210, miR-503 e miR-21 sono risultati over-espressi nei carcinomi analizzati, mentre miR-195, miR-100, miR-335, miR-675, miR-497 e miR-125b sono risultati ipo-espressi (Soon *et al.*, 2009; Özata *et al.*, 2011; Patterson *et al.*, 2011; Schmitz *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011).

Il preciso ruolo di questi microRNA è in molti casi ancora sconosciuto, tuttavia alcuni di essi sembrano possedere un elevato valore diagnostico. In particolare, l'over-espressione di miR-483-5p e l'ipo-espressione di miR-335 e miR-675 rappresentano dei parametri efficaci per distinguere i tumori maligni dagli adenomi; inoltre la ridotta espressione di miR-195 e l'over-espressione di miR-503 sembrano essere correlate con una prognosi infausta ed una diminuzione della sopravvivenza nei pazienti affetti da ACC (Soon *et al.*, 2009; Özata *et al.*, 2011; Patterson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011). Poiché miR-483 risulta essere il microRNA maggiormente over-espresso nel carcinoma corticosurrenalico, numerosi studi si sono focalizzati sulla caratterizzazione di questo microRNA. *hsa-miR-483* è localizzato nella regione cromosomica 11p15.5, nell'esone 2 del gene *IGF2*. Per questo, esiste una associazione tra l'over-espressione di miR-483-3p e miR-483-5p e l'aumento dei livelli di IGF-II (Veronese *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011). Recentemente, inoltre, è stata dimostrata una stretta correlazione tra l'espressione di miR-483 e l'iperattivazione della β -catenina (Veronese *et al.*, 2011).

Lo studio dei microRNA rappresenta un tipo di approccio che mira all'identificazione di alterazioni nel *pattern* di espressione genica, che consentano una migliore caratterizzazione dei tumori corticosurrenali, al fine di favorire una diagnosi precoce e più dettagliata. In questo senso, lo studio del trascrittoma ha rappresentato il primo tentativo di distinguere i tumori maligni dagli adenomi e, nell'ambito dei carcinomi, di effettuare un'ulteriore suddivisione sulla base dell'aggressività del tumore. Gli studi effettuati fino ad ora hanno permesso di identificare alcuni geni con un elevato valore predittivo, la cui valutazione ri-

sulta di grande aiuto per la diagnosi del carcinoma corticosurrenalico e nel determinarne la prognosi (Assié *et al.*, 2010).

In particolare, i geni *DLG7* (Discs large homolog 7, *drosophila*), *PINK1* (PTEN induced putative kinase) e *BUB1B* (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta) sembrano costituire degli ottimi fattori predittivi. *DLG7* è un gene coinvolto nella sopravvivenza delle cellule staminali e nella carcinogenesi del fegato e del colon, che risulta over-espresso nel carcinoma corticosurrenalico, mentre *PINK1* codifica per una protein-chinasi attivata dall'onco-soppressore PTEN e coinvolta nel mantenimento dell'integrità mitocondriale, la cui espressione è ridotta nell'ACC. *BUB1B* è invece un gene codificante per una serin/treonin-chinasi coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare. L'analisi dei livelli di espressione di questi geni ha consentito di identificare dei marcatori diagnostici e prognostici per il carcinoma corticosurrenalico, infatti il rapporto tra l'espressione dei geni *DLG7* e *PINK1* consentirebbe di discriminare i tumori maligni dagli adenomi e rappresenta inoltre un indicatore della sopravvivenza libera da malattia nei casi di ACC, mentre il rapporto tra l'espressione di *BUB1B* e *PINK1* consentirebbe un'importante discriminazione tra tumori con una buona prognosi e tumori con prognosi infausta (de Reyniès *et al.*, 2009; Assié *et al.*, 2010).

I numerosi studi relativi alla genetica del carcinoma corticosurrenalico stanno evidenziando sempre di più l'importanza di una conoscenza approfondita delle alterazioni genetiche alla base dell'insorgenza e dello sviluppo della malattia. Nonostante manchino tuttora delle conoscenze certe e di comprovata validità nella pratica clinica, appare comunque ormai accertato che alcuni geni svolgono un ruolo fondamentale nella tumorigenesi corticosurrenalica. Tra questi, quelli maggiormente studiati e che sembrano costituire i più importanti bersagli terapeutici per la cura del carcinoma corticosurrenalico sono indubbiamente *TP53* e *IGF2* (Ragazzon *et al.*, 2011).

1.4.1. *TP53*

Il gene *TP53* è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, nella regione 17p13.1 e codifica per una proteina di 393 amino acidi, coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, nel processo di morte programmata per apoptosi e nei meccanismi di riparazione del DNA. *TP53* è costituito da 11 esoni, di cui il primo non è codificante, e codifica per almeno 9 isoforme diverse della proteina, che sono prodotte a seguito di eventi di *splicing* alternativo dell'introne 2 e/o dell'introne 9, oppure come conseguenza dell'attivazione di un

secondo promotore dislocato sull'introne 4 o di un sito di inizio di trascrizione alternativo. Tutte le isoforme di p53 sono espresse nei tessuti normali, ma in modo tessuto-specifico, indicando che la loro espressione può essere in qualche modo modulata (Römer *et al.*, 2006; Millau *et al.*, 2009).

La proteina p53 costituisce un fattore trascrizionale di enorme importanza per il mantenimento dell'equilibrio cellulare, la cui funzionalità risulta pertanto compromessa in più del 50% dei tumori. Essa presenta una struttura modulare formata da quattro domini funzionali (figura 1.4): un dominio N-terminale, (aa 1-100) che costituisce il dominio di attivazione trascrizionale di p53 e pertanto è sottoposto a continue modificazioni da parte dei fattori regolatori; un dominio di legame al DNA, o *core* (aa 101-300); un dominio di tetramerizzazione (aa 326-351) ed un dominio C-terminale (364-393), con funzione regolatoria (Millau *et al.*, 2009).

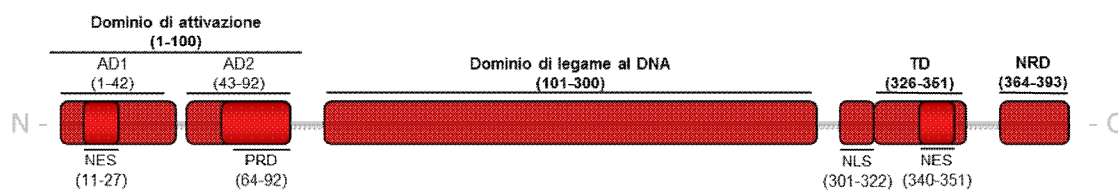


Figura 1.4. Organizzazione modulare della proteina p53. Il dominio N-terminale interagisce con le componenti del macchinario di trascrizione e comprende i domini di attivazione AD1 e AD2 e una sequenza ricca di proline (PRD). Il dominio centrale è la regione di legame al DNA. La regione C-terminale comprende il dominio di tetramerizzazione (TD) e un dominio regolatorio (NRD). Da Millau *et al.* (2009), modificata.
NES, sequenza di esporto dal nucleo; NLS, sequenza di localizzazione nucleare.

La maggior parte delle mutazioni del gene *TP53* risultano localizzate all'interno della regione che codifica per il dominio di legame al DNA della proteina (esoni 5-8); esse sono nell'80% dei casi mutazioni missenso che determinano una perdita di funzione di p53, ma in alcuni casi possono insorgere mutazioni *gain-of-function* o con fenotipo dominante negativo, che rivestono una importanza fondamentale nella progressione dei tumori aggressivi (Römer *et al.*, 2006; Brosh e Rotter, 2009; Millau *et al.*, 2009).

p53, infatti, si comporta come onco-soppressore ed è coinvolta nella regolazione di numerosi processi di fondamentale importanza per l'omeostasi cellulare. In particolare, p53 viene attivata in seguito a diversi tipi di stress e agisce attivando una serie di fattori coinvolti nei meccanismi di riparazione dei danni al DNA. Quando il danno risulta tale da non

poter essere riparato, p53 determina invece l'attivazione di altri fattori, che innescano il processo di morte cellulare per apoptosi (figura 1.5). L'espressione e l'attivazione di p53 sono finemente regolate e in condizioni normali i suoi livelli sono mantenuti bassi attraverso un meccanismo di inibizione mediato da MDM2 (Mouse Double Minute 2). Nei tumori, tale regolazione viene persa, generalmente a causa di mutazioni del gene *TP53* che ne impediscono l'attivazione o come conseguenza di una iper-attivazione di MDM2, e ciò favorisce una proliferazione cellulare incontrollata e l'accumulo di mutazioni a carico di vari geni (Piette *et al.*, 1997; Römer *et al.*, 2006; Brosh e Rotter, 2009; Millau *et al.*, 2009).

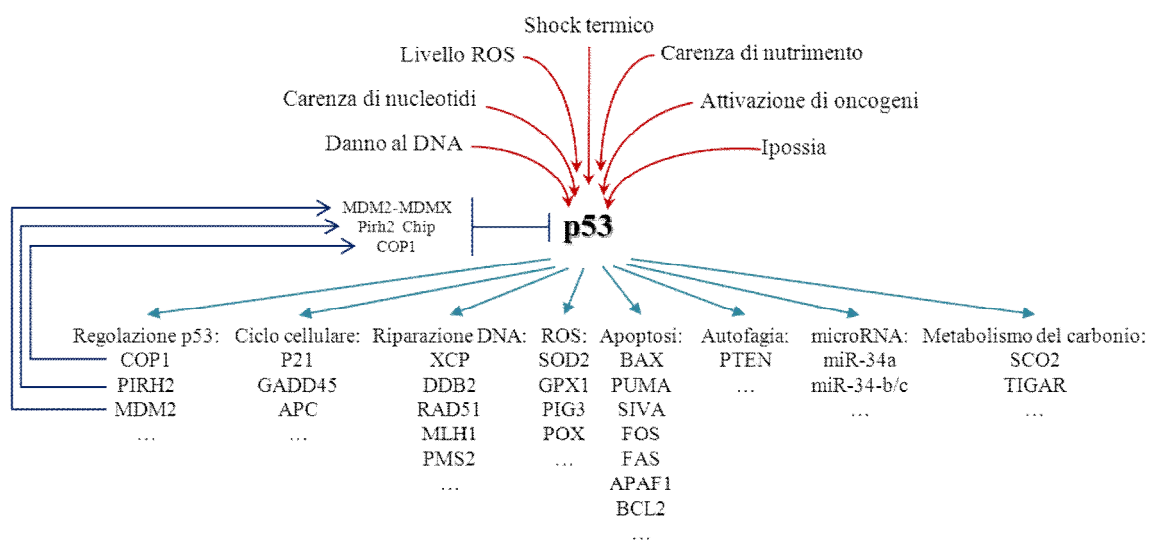


Figura 1.5. In risposta ad uno stress cellulare di varia natura, p53 viene attivata e agisce da fattore di trascrizione che modula l'espressione di diversi geni effettori coinvolti nelle principali vie di segnalazione cellulare. Da Millau *et al.* (2009), modificata.

Per quanto concerne il carcinoma corticosurrenalico, il ruolo delle mutazioni del gene *TP53* nel favorire l'insorgenza di questa patologia è stato ampiamente dimostrato nell'ambito dello studio dell'associazione tra la sindrome di Li-Fraumeni e lo sviluppo di tumori maligni della corteccia surrenale. In particolare, lo sviluppo del carcinoma corticosurrenalico sembra essere correlato con la presenza di due specifiche mutazioni di *TP53*, R175H e R337H, nei pazienti affetti dalla sindrome di Li-Fraumeni (Barlaskar e Hammer, 2007). La mutazione R337H, inoltre, rappresenta un allele a bassa penetranza che contribuisce in maniera tessuto-specifica allo sviluppo dell'ACC nei bambini, il cui studio è risultato di notevole importanza per motivare l'elevata incidenza del carcinoma corticosurrenalico nella popolazione infantile del Sud Brasile, che risulta di circa 10-15 volte mag-

giore rispetto al resto del mondo, a causa dell'ampia diffusione di questa mutazione (Ribeiro *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2001; Wasserman *et al.*, 2011).

Le mutazioni germinali del gene *TP53* sono frequentemente riscontrate nei tumori pediatrici, tuttavia mutazioni somatiche di questo gene sono state identificate nei carcinomi degli adulti con percentuali variabili dal 20% al 70%, a seconda dello studio (Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009; Wasserman *et al.*, 2011). Negli adenomi benigni del surrene, invece, difficilmente vengono rilevate mutazioni di *TP53*, indicando che la perdita di funzione di questo gene rappresenta una caratteristica peculiare dei carcinomi (Reincke *et al.*, 1994).

Recentemente, studi basati sull'analisi del trascrittoma hanno evidenziato la possibilità di classificare i carcinomi corticosurrenali in due gruppi, denominati C1A e C1B. I pazienti che presentano tumori appartenenti al gruppo C1A mostrano una prognosi peggiore, mentre quelli con tumori del gruppo C1B hanno generalmente una prognosi migliore. In questo contesto, è stato verificato che mutazioni del gene *TP53* si riscontrano esclusivamente nel gruppo C1A, con una percentuale pari al 29% dei casi, suggerendo un ruolo attivo delle mutazioni somatiche di *TP53* nello sviluppo di un carcinoma con fenotipo più aggressivo (Assié *et al.*, 2010; Ragazzon *et al.*, 2011).

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che la perdita di eterozigotà (LOH) nel *locus* 17p13, dove è localizzato il gene *TP53*, avviene in circa l'85% dei casi di carcinoma corticosurrenalico, e nello 0% dei casi di adenoma (Barlaskar e Hammer, 2007; Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009). Nella stessa regione cromosomica, inoltre, è localizzato anche un altro gene onco-soppressore, Hypermethylated In Cancer-1 (HIC-1), la cui perdita di funzione potrebbe rappresentare un ulteriore elemento predisponente per la proliferazione tumorale (Libè *et al.*, 2007).

L'importanza di p53 nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico è stata recentemente confermata anche dall'osservazione che tra i portatori di mutazioni di *TP53*, i tumori maligni della corteccia surrenale rappresentano l'11,9% di tutti i tumori, mentre nella popolazione generale, l'ACC costituisce una percentuale inferiore all'1% di tutti i tumori diagnosticati (Wasserman *et al.*, 2011). Inoltre, alcune caratteristiche tipiche del carcinoma corticosurrenalico, quali l'over-espressione della ciclina E, della β -catenina, di IGF2 e di VEGF e l'ipo-espressione di p57 e di p16, sono riconducibili ad una perdita di funzione di p53, considerata la sua grande importanza nella regolazione di questi fattori, coinvolti nei pro-

cessi cellulari di proliferazione, risposta allo stress, riparazione del DNA e morte programmata (Levine *et al.*, 2006; Minella *et al.*, 2007; Millau *et al.*, 2009).

L'approfondimento delle conoscenze relative al ruolo di p53 nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico rappresenta pertanto un importante approccio per lo studio di questa neoplasia e per l'identificazione di nuove terapie che consentano di mantenere un corretto funzionamento delle diverse vie di segnalazione intracellulari mediate da questo fattore (Wasserman *et al.*, 2011).

1.4.2. IGF2

Il fattore di crescita insulino-simile, IGF-II, rappresenta il principale marcatore del carcinoma corticosurrenalico, infatti esso risulta over-espresso in più del 90% dei tumori maligni della corteccia surrenale, ma solo raramente negli adenomi (Gicquel *et al.*, 2001; de Reyniès *et al.*, 2009).

Il gene *IGF2* è localizzato sul cromosoma 11, nella regione 11p15, dove mappano anche il geni *CDKN1C*, che codifica per l'inibitore delle chinasi ciclina-dipendente p57, e *H19*, che viene tradotto in un mRNA non codificante in grado di reprimere l'espressione di *IGF2*. *CDKN1C* e *H19* sono sottoposti ad *imprinting* paterno e la loro espressione è determinata dal solo allele materno, contrariamente a *IGF-II*, di cui viene espresso il solo allele paterno. Alterazioni genetiche o epigenetiche nella regione 11p15, che comportano l'aumento dell'espressione di *IGF-II*, e mutazioni del gene *CDKN1C* sono associate alla sindrome di Beckwith-Wiedemann (Barlaskar e Hammer, 2007; Soon e Sidhu, 2009).

Nel carcinoma corticosurrenalico, i livelli di espressione di *IGF2* risultano essere notevolmente aumentati e ciò si traduce in un aumento incontrollato della proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di una via di trasduzione del segnale mediata da IGF-IR, PI3K, Akt e mTOR (Barlaskar *et al.*, 2009; Ragazzon *et al.*, 2011). L'importanza di questa via di segnalazione intracellulare nello sviluppo e nella progressione del carcinoma corticosurrenalico è stata largamente dimostrata, anche grazie ad alcuni studi *in vitro*, nei quali è stato osservata l'attivazione costitutiva della via di IGF-II ed è stato dimostrato un ruolo autocrino di IGF-II nel favorire la proliferazione cellulare nella linea tumorale H295R (Logiè *et al.*, 1999; Barlaskar *et al.*, 2009).

L'identificazione di IGF-IR come potenziale bersaglio terapeutico per il carcinoma corticosurrenalico e lo studio della via di trasduzione del segnale da esso attivata hanno inoltre condotto all'osservazione che Akt, un fattore anti-apoptotico di fondamentale importanza

per lo sviluppo neoplastico, risulta iper-attivato nei tumori maligni che colpiscono la corteccia surrenale (Fassnacht *et al.*, 2005; Barlaskar *et al.*, 2009).

Recentemente nel carcinoma corticosurrenalico è stata dimostrata l'associazione tra l'over-espressione di IGF-II e l'iper-attivazione di mTOR e la ridotta espressione dei microRNA miR-99a e miR-100, la cui funzione appare dunque quella di inibire l'espressione di questi due fattori (Doghman *et al.*, 2010). mTOR (mammalian Target of Rapamycin) è una serin/treonin-chinasi attivata da Akt, che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza cellulare, la sintesi proteica e la trascrizione, il cui ruolo nella patogenesi corticosurrenalica è attualmente oggetto di studio, infatti la sua iper-attivazione sembra essere coinvolta nello sviluppo di tumori maligni della corteccia surrenale e della midolla (De Martino *et al.*, 2010).

Considerato il fondamentale ruolo svolto da IGF-II e dalle sue molecole effettrici nella patogenesi corticosurrenalica, lo studio dei meccanismi molecolari che provocano una iper-attivazione della via di trasduzione del segnale indotta da questo fattore di crescita rappresenta attualmente una delle principali sfide per la comprensione dei fattori che conducono all'inizio della tumorigenesi corticosurrenalica. L'inibizione di questa *pathway*, inoltre, costituisce uno degli obiettivi terapeutici di maggiore importanza per la cura del carcinoma corticosurrenalico (Barlaskar *et al.*, 2009; De Martino *et al.*, 2010).

1.4.3. Connessione tra p53 e IGF-II

Negli ultimi anni, le vie di trasduzione del segnale mediate da p53, IGF-II/Akt e mTOR sono state largamente studiate in diversi modelli. Numerose proteine coinvolte appaiono fondamentali per la comunicazione e la coordinazione di queste vie, che regolano l'integrazione di diversi segnali, quali la disponibilità di nutrienti e di fattori di crescita e la presenza di stress intra- ed extra-cellulari, e controllano la crescita, la proliferazione e la morte cellulare. Data la grande importanza di questi processi nel campo oncologico, la conoscenza dell'interconnessione tra i diversi mediatori di queste vie di trasduzione del segnale appare fondamentale per comprendere alcuni dei meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi (Levine *et al.*, 2006).

IGF-II svolge un ruolo di enorme importanza nella crescita cellulare, per questo risulta spesso over-espresso nei tumori. Attraverso il legame con il proprio recettore, IGF-IR, IGF-II è in grado di attivare numerosi effettori intracellulari, di cui il principale è Akt. Akt (o PKB, protein-chinasi B) è un fattore anti-apoptotico che viene attivato mediante fosfori-

lazione da PI3K (fosfoinositide-3-chinasi di classe I) ed è in grado a sua volta di fosforilare e attivare mTOR, il quale interagisce con diverse proteine, formando i complessi mTORC1 e mTORC2, che regolano importanti processi cellulari, favorendo la proliferazione ed il metabolismo cellulare (Bononi *et al.*, 2011; Steelman *et al.*, 2011).

Il complesso mTORC1 interagisce con la proteina Raptor, determinando la fosforilazione e l'attivazione di fattori quali S6K1 (proteina chinasi 1 p70-S6) e 4EBP1 (proteina di legame del fattore eucariotico di inizio della traduzione 4E), che regolano la trascrizione dell'mRNA, stimolando la sintesi di numerose proteine oncogene, quali c-Myc, HIF1 α (hypoxia-inducible factor-1 α), VEGF, ciclina D e IGF-II. mTORC2 si costituisce invece in seguito all'interazione di mTOR con la proteina Rictor e regola numerose funzioni del citoscheletro, agendo inoltre come attivatore di Akt, attraverso un meccanismo di *feedback* positivo (De Martino *et al.*, 2010).

Akt e mTOR rappresentano pertanto dei mediatori fondamentali per la trasmissione del segnale indotto dai fattori di crescita e sono in grado a loro volta di stimolarne la produzione. L'iper-attivazione di questa via di trasduzione del segnale è stata riscontrata in numerosi tipi di tumore ed è dovuta in molti casi alla perdita di funzione di importanti fattori oncosoppressori, tra i quali p53.

p53 è in grado di inibire la via di segnalazione di IGF-II a diversi livelli. Essa è infatti in grado di attivare proteine inibitrici di Akt e mTOR, quali PTEN, AMPK e TSC2, ed è inoltre in grado di esercitare un effetto inibitorio direttamente sulla sintesi di IGF-II, attraverso un'interazione con il promotore P3 di *IGF2*, che ne reprime la trascrizione (Zhang *et al.*, 1996). Attraverso la regolazione trascrizionale delle DNA-metiltransferasi (Dnmt), inoltre, p53 svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento del corretto *pattern* di metilazione della regione 11p15.5, consentendo l'espressione di *H19* e la conseguente repressione trascrizionale di *IGF2* (Park *et al.*, 2005).

La figura 1.6 schematizza alcune delle principali interazioni tra la via di IGF-II/Akt/mTOR e p53. Considerato l'importante ruolo svolto da questi fattori nella progressione neoplastica del carcinoma corticosurrenalico, appare evidente che lo studio di queste vie di segnalazione potrebbe rappresentare un utile punto di partenza per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di questo tumore, oltre che per l'individuazione dei principali bersagli terapeutici per la cura di questa neoplasia.

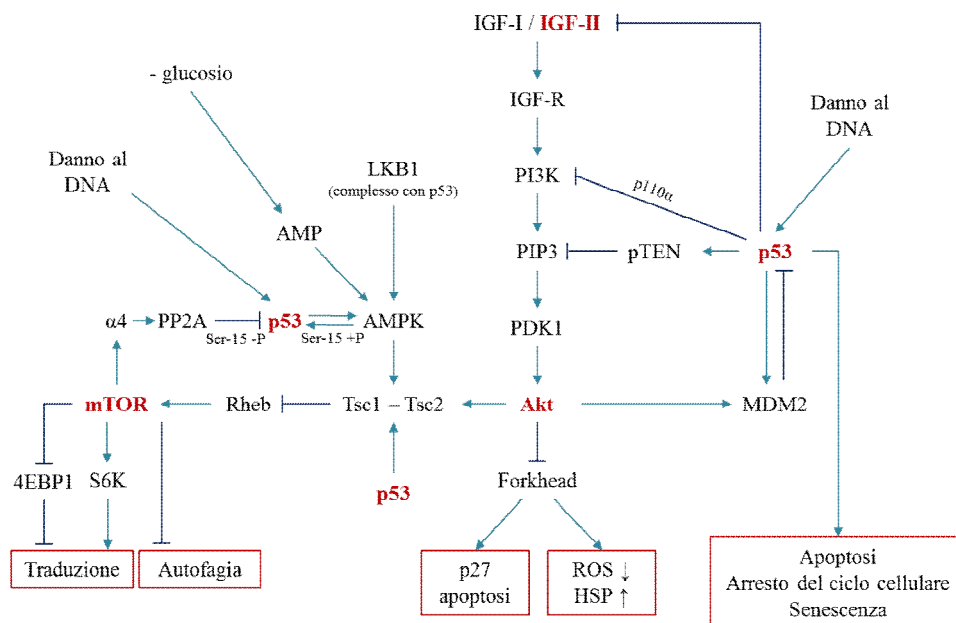


Figura 1.6. Interconnessione tra le vie di segnalazione mediate da p53 e da IGF-2/Akt/mTOR. L'attivazione di p53, IGF-R e mTOR è influenzata da diversi stimoli, quali le variazioni metaboliche, gli ormoni, le citochine e le interleuchine. Ognuna di queste vie di segnalazione attiva delle proteine fondamentali (p53-MDM2; IGF-2-Akt; TSC1-TSC2-mTOR), che determinano degli esiti differenti a livello di importanti processi cellulari. Ognuna di queste proteine è controllata da altri fattori, che ne regolano l'attività (PTEN, TSC2, AMPK, LKB1, IGFBP3). Da Levine *et al.* (2006), modificato.

L'effetto autocrino e paracrino dei fattori di crescita sulla proliferazione cellulare nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico rappresenta un argomento di grande interesse nell'ambito dello studio di questa neoplasia. Oltre ad IGF-II, un altro fattore di grande importanza è rappresentato da VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare), i cui livelli risultano notevolmente aumentati nei tumori maligni della corteccia surrenalica, mentre tendono a diminuire dopo la rimozione chirurgica della massa (Libè *et al.*, 2007).

VEGF è un fattore pro-angiogenico, la cui espressione è stimolata dall'attivazione della via di Akt ed mTOR. Uno dei principali attivatori trascrizionali di *VEGF* è inoltre rappresentato da HIF-1, un fattore di trascrizione che viene attivato durante l'ipossia, una condizione che si riscontra frequentemente nei tumori solidi (Lee *et al.*, 2004; Weidemann e Johnson, 2008).

HIF-1 è costituito da una subunità β , costitutivamente espressa, ed una subunità α , che in condizioni di normale ossigenazione viene rapidamente degradata a livello citoplasmatico mediante l'interazione con la ubiquitina-ligasi VHL. In condizioni di ipossia, HIF-1 α viene

invece stabilizzato ed è in grado di traslocare nel nucleo, dove attiva la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta allo stress e nella proliferazione cellulare, tra i quali *VEGF*. Recentemente, l'iper-attivazione di HIF-1 α è stata riscontrata in diversi tipi di tumore, dove questa proteina svolge una importanti funzione nel favorire la crescita cellulare e l'angiogenesi (Lee *et al.*, 2004; Weidemann e Johnson, 2008).

L'attivazione di HIF-1 α può essere provocata, oltre che dalla carenza di ossigeno, anche dalla perdita nella regolazione di alcuni fattori che ne stimolano o ne reprimono la sintesi, tra i quali spiccano IGF-II e p53.

IGF-II è in grado di indurre l'espressione di HIF-1 α attraverso un meccanismo che coinvolge l'attivazione della via PI3K/Akt/mTOR, stimolando in questo modo la trascrizione di *VEGF*. Attraverso un meccanismo di *feedback* positivo, inoltre, HIF-1 α stimola a sua volta l'espressione di *IGF2*, favorendo la crescita cellulare (Feldser *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2002). L'utilizzo di inibitori di PI3K e mTOR in diversi modelli cellulari tumorali è in grado di bloccare l'attivazione di HIF-1 α , indicando che questo fattore rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico anti-tumorale (Zhong *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Semenza, 2003).

L'attivazione di HIF-1 α può essere inibita da p53, attraverso la repressione trascrizionale di *IGF2* esercitata da p53. Inoltre, p53 è in grado di inibire direttamente l'attività di HIF-1 α attraverso un meccanismo di competizione per p300, una proteina necessaria per l'attivazione di entrambi i fattori (Fels e Koumenis, 2005). Inoltre, recentemente è stato dimostrato che p53 stimola l'espressione di alcuni microRNA, come miR-107, coinvolti nell'inibizione di HIF-1 (Yamakuchi *et al.*, 2010).

HIF-1 α appare dunque un fattore fondamentale per la regolazione di importanti processi cellulari alterati nei tumori, quali la proliferazione e l'angiogenesi, che risulta interconnesso con diverse vie di segnalazione intracellulare, mediate da IGF-II, p53 e VEGF. Considerata la grande importanza rivestita da questi fattori nello sviluppo del carcinoma corticosurrenalico, appare verosimile che HIF-1 α svolga un ruolo nel favorire la progressione di questo tumore. Lo studio di HIF-1 α come potenziale marcatore diagnostico e bersaglio terapeutico potrebbe dunque apportare nuove conoscenze utili per la cura del carcinoma corticosurrenalico.

2. Scopo del lavoro

Il carcinoma corticosurrenalico è una rara forma di neoplasia endocrina, la cui prognosi è variabile, dipendentemente dallo stadio del tumore e dal tempo della diagnosi, ma generalmente infausta. La sopravvivenza media non supera i cinque anni dal momento della diagnosi, anche a causa della tendenza di questo tumore di produrre recidive e metastasi, la cui frequenza varia dal 30 all'85% (Assié *et al.*, 2007; Stojadinovich *et al.*, 2002). L'esatta eziopatogenesi dell'ACC non è ancora stata del tutto chiarita, tuttavia alcuni importanti fattori di rischio sono rappresentati dalla perdita di funzione di p53 e dall'over-espressione di *IGF2* e *VEGF* (Barlaskar e Hammer, 2007; Libè *et al.*, 2007; Ragazzon *et al.*, 2011).

Attualmente, l'unico tipo di terapia che sembra dare dei risultati concreti è rappresentato dalla rimozione chirurgica del tumore, tuttavia anche in questo caso la sopravvivenza raramente supera i cinque anni e la frequenza di recidive è estremamente elevata. Altri tipi di trattamento, che prevedono la somministrazione di agenti chemioterapici o di farmaci ad azione adrenolitica, come il mitotano, non risultano particolarmente efficaci nel ridurre le dimensioni o l'aggressività del tumore, inoltre il loro utilizzo è fortemente limitato dai loro gravi effetti collaterali (Allolio e Fassnacht, 2006; Libè *et al.*, 2007).

La radioterapia, al contrario, determina degli effetti collaterali di minore entità, tuttavia la sua validità terapeutica è oggetto di discussione, a causa dell'elevata variabilità di risposta osservata in più gruppi di pazienti (Fassnacht *et al.*, 2006; Patalano *et al.*, 2009).

Considerata la gravità del carcinoma corticosurrenalico e la mancanza di un regime terapeutico efficace, appare dunque di fondamentale importanza l'identificazione di nuove strategie per la cura di questa neoplasia. Il miglioramento delle terapie attualmente in uso, inoltre, costituisce un altro importante obiettivo, che richiede l'approfondimento delle conoscenze relative alla sequenza di eventi che portano allo sviluppo e alla proliferazione del cancro (Patalano *et al.*, 2009).

Lo scopo di questo lavoro è dunque quello di migliorare le attuali conoscenze relative alle possibili opzioni terapeutiche del carcinoma corticosurrenalico. Tale obiettivo è stato perseguito attraverso due diversi tipi di approccio: da un lato, la valutazione degli effetti anti-neoplastici del rosiglitazone, un farmaco insulino-sensibilizzante, in due linee cellulari derivanti da ACC, al fine di determinarne l'efficacia terapeutica; dall'altro, la valutazione del ruolo dell'onco-soppressore p53 nella risposta alla radioterapia, con l'obiettivo di dimostrarne la validità come fattore predittivo per la risposta a questo tipo di trattamento.

3. Materiali e metodi

3.1. Colture cellulari

Il lavoro è stato condotto utilizzando due modelli cellulari derivanti da carcinoma corticosurrenalico umano, H295R e SW-13, che differiscono per grado di differenziazione istologica e caratteristiche endocrine. Nel corso di alcuni esperimenti è stata utilizzata anche la linea cellulare SK-OV-3, derivante da adenocarcinoma ovarico umano. Tutte e tre le linee cellulari sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC).

La linea cellulare NCI-H295R (ATCC CRL-2128) deriva da un carcinoma della corteccia surrenale secernente di stadio II. Queste cellule possiedono la capacità di sintesi biochimica delle diverse classi di ormoni steroidei, in particolare glucocorticoidi, mineralcorticoidi ed androgeni, e risultano responsive all'ormone adrenocorticotropo ipofisario (ACTH), all'angiotensina II e agli ioni potassio. Le cellule della linea SW-13 (ATCC CCL-105), al contrario, hanno una ridotta capacità di secrezione degli ormoni steroidei e derivano da un carcinoma corticosurrenalico al IV stadio.

Le cellule della linea SK-OV-3 (ATCC HTB-77) sono resistenti al fattore di necrosi tumorale (TNF) e a diversi farmaci citotossici, quali la tossina difterica, il cisplatino e l'adriamicina. Esse non presentano quantità rilevabili della proteina p53, a causa di una parziale delezione o di un riarrangiamento in almeno un allele del gene *TP53*, che determina la degradazione dell'RNA messaggero di questo fattore (Yaginuma e Wetsphal, 1992).

Le colture cellulari sono state allestite in specifiche fiasche e mantenute in *media* precostituiti, seguendo i protocolli standard per le colture cellulari umane e le attuali normative di sterilità e sicurezza. Le cellule H295R sono state cresciute in un terreno costituito da una miscela 1:1 di DMEM:F-12, per la linea SW-13 è stato invece utilizzato il terreno Leibovitz's L-15 e per la linea SK-OV-3 il terreno ad elevata concentrazione di glucosio RPMI 1640 (Lonza). A tutti i terreni di coltura sono stati aggiunti siero fetale bovino di origine australiana al 10%, L-Glutammina 2mM, penicillina 100 U/ml e streptomycin 100 µg/ml (Lonza). Il terreno DMEM:F-12 è stato inoltre arricchito con una soluzione costituita da insulina, transferrina e selenio all'1% (ITS, Sigma-Aldrich).

Per tutta la durata delle procedure sperimentali, il mezzo di coltura è stato sostituito almeno tre volte a settimana e le cellule sono state mantenute ad una temperatura costante di 37°C in atmosfera umidificata in appositi incubatori, che mantengono la percentuale di CO₂ nell'aria costante al 5%.

3.2. Sequenziamento genico

Il sequenziamento del gene *TP53* è stato effettuato nelle linee cellulari H295R e SW-13 a partire da DNA genomico e cDNA.

Il DNA totale è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN) a partire da 5×10^6 cellule, seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA ottenuto è stato quindi sottoposto ad amplificazione mediante PCR utilizzando i *primers* e le condizioni riportate in tabella 3.1.

Primer	Sequenza	Lunghezza amplicone	Ta	n° cicli
Esoni 5				
Senso	5'-TTATCTGTTCACTTGTGCCC-3' (17255)	285 bp	57°C	30
Antisenso	5'-ACCCTGGGCAACCAGCCCTG-3' (17539)			
Esoni 6				
Senso	5'-ACGACAGGGCTGGTTGCCCA-3' (17516)	201 bp	60°C	30
Antisenso	5'-CTCCCAGAGACCCCAGTTGC-3' (17716)			
Esoni 7				
Senso	5'-GGCCTCATCTTGGGCCTGTG-3' (18225)	171 bp	60°C	30
Antisenso	5'-CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT-3' (18395)			
Esoni 8-9				
Senso	5'-GCCTCTTGCTTCTCTTTTCC-3' (18677)	396 bp	55°C	30
Antisenso	5'-CGGCATTTTGAGTGTTAGA-3' (19072)			

Tabella 3.1. Sequenza dei *primers* e condizioni utilizzate per amplificare gli esoni dal 5 al 9 del gene *TP53* a partire dal DNA delle cellule H295R e SW-13.

Ta: temperatura di *annealing*

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il metodo del fenolo-guanidina tiocianato (TRIzol Reagent, Invitrogen). L'RNA è stato precipitato con isopropanolo al 100%, risospeso in 40 µl di acqua distillata ultra pura (UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Gibco) e quantificato con un biofotometro (Eppendorf).

Circa 1 µg di RNA è stato quindi sottoposto a digestione con 1 U di DNasi (DNase I Amplification Grade, Invitrogen) e 200 ng sono stati retro-trascritti utilizzando il kit Omniscript RT Kit (Qiagen), in un volume finale di 20 µl. Infine, 2 µl del cDNA così ottenuto

sono stati utilizzati per l'amplificazione tramite RT-PCR, utilizzando sei paia di *primers* che coprono l'intera *coding sequence* del gene *TP53*. La sequenza di tali *primers* e le condizioni utilizzate sono descritte nella tabella 3.2

Primer	Sequenza	Lunghezza amplicone	Ta	n° cicli
Esoni 2-4 Senso Antisenso	5'-GCCAGACTGCCTTCCGGGTC-3' (172) 5'-GCCGGTGTAGGAGCTGCTGG-3' (445)	274 bp	57°C	30
Esoni 4-5 Senso Antisenso	5'-CCAGCAGCTCCTACACCGGC-3' (426) 5'-GAGCAGCGCTCATGGTGGGG-3' (745)	320 bp	57°C	30
Esoni 5-7 Senso Antisenso	5'-CTGCTCAGATAGCATGGTCTG-3' (740) 5'-TTGTAGTGGATGGTGGTACAGTCA-3' (901)	162 bp	60°C	30
Esoni 6-10 Senso Antisenso	5'-TGGTGCCCTATGAGCCGCCT-3' (847) 5'-CGCTCACGCCCACGGATCTG-3' (1207)	361 bp	60°C	30
Esoni 9-11 Senso Antisenso	5'-CCAGCTCCTCTCCCCAGCCA-3' (1132) 5'-GGGGGTGGGAGGCTGTCTAGT-3' (1421)	290 bp	60°C	30

Tabella 3.2. Sequenza dei *primers* e condizioni utilizzate per amplificare la *coding sequence* del gene *TP53* delle cellule delle linee H295R e SW-13, a partire da cDNA.

Ta: temperatura di *annealing*

I prodotti delle PCR sono stati successivamente purificati utilizzando delle specifiche colonnine (MICROCON Centrifugal Filter Devices, Millipore) e ciascun frammento è stato sottoposto ad una PCR di marcatura utilizzando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems), utilizzando un solo *primer*, senso o antisense, ad una concentrazione finale di 160 nM. Il sequenziamento è stato infine effettuato con un sequenziatore automatico (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), utilizzando il gene *Pgem* come controllo.

3.3. Trattamento farmacologico

Le cellule delle linee H295R e SW-13 sono state sottoposte a trattamento con rosiglitazone (Vinci-Biochem) ad una concentrazione finale pari a 20 μ M e 10 μ M, rispettivamente. Il farmaco è stato somministrato ogni 0, 3 e 6 ore per tutta la durata degli esperimenti, a causa della sua ridotta emivita, di circa 3-4 ore, e in accordo con la letteratura esistente (Cox *et al.*, 2000). Le stesse linee cellulari sono state trattate anche con il GW9662 (Calbiochem), un inibitore specifico di PPAR γ , ad una concentrazione finale di 20 μ M per entrambe le linee.

Entrambi i farmaci sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e il GW9662 è stato somministrato un'ora prima dell'inizio del trattamento con rosiglitazone. La concentrazione finale di DMSO nel terreno di coltura non superava lo 0,03%.

Infine, le cellule della linea H295R sono state trattate anche con 3-metiladenina (3-MA, Sigma-Aldrich), un composto in grado di inibire l'autofagia, che veniva sciolta direttamente nel terreno di coltura ad una concentrazione finale di 5 mM.

3.4. Trasfezioni e trattamento con radiazioni ionizzanti

Le cellule delle linee H295R, SW-13 e SK-OV-3 sono state seminate in piastre da sei pozzetti, ad una confluenza di circa 80-90%. Dopo 24 ore, le cellule sono state trasfettate transientemente con un vettore vuoto (pBABE-neo) o con un vettore in grado di esprimere la forma *wild type* del gene *TP53* (pBABE-neo-p53), utilizzando il FuGENE HD Transfection Reagent (Roche), seguendo le istruzioni del produttore.

La mappa del plasmide pBABE-neo è riportata nella figura 3.1; il gene *TP53* si trova a valle del promotore SV40.

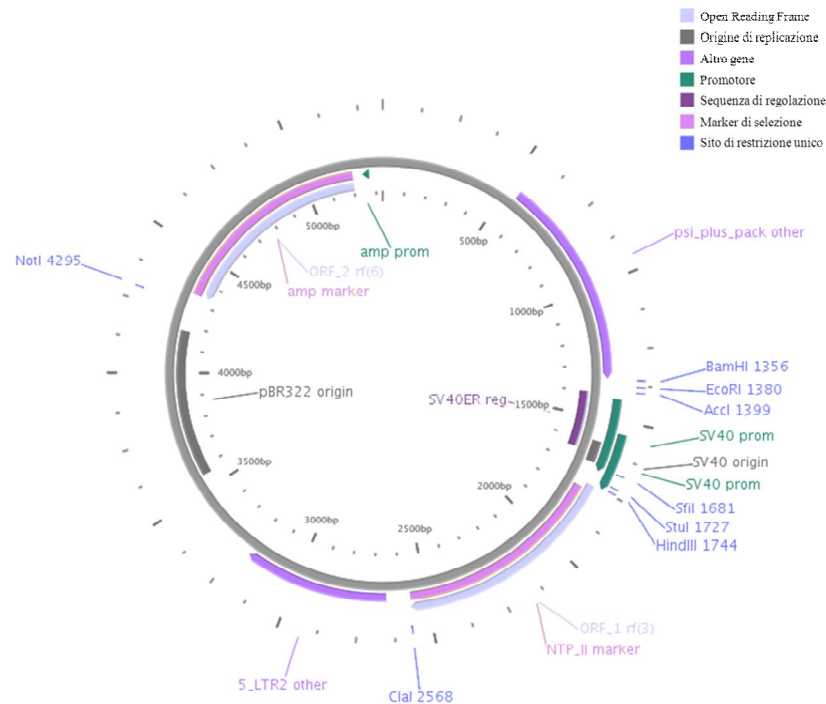


Figura 3.1. Mappa del plasmide pBABE-neo. La sequenza codificante del gene *TP53 wild type* è inserita a valle del promotore SV40. Immagine creata usando il server *Plas Mapper*.

Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state sottoposte a trattamento con una quantità di radiazioni ionizzanti pari a 6 Gy, avvalendosi di un acceleratore lineare Varian Clinac 600 c/d 6MV.

Le analisi successive sono state condotte fino a 72 ore dalla trasfezione (48 ore dall'irraggiamento).

3.5. Curve di proliferazione

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante conta cellulare, utilizzando un emocitometro (Sigma-Aldrich). La citotossicità dei diversi trattamenti è stata determinata mediante il saggio di colorazione con Trypan blue. Le cellule sono state staccate dai supporti su cui venivano cresciute, centrifugate e risospese in DPBS 1x (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza). La sospensione cellulare è stata quindi diluita in rapporto 1:1 con il colorante Trypan blue allo 0,4% (Lonza) e la percentuale di cellule positive alla colorazione è stata determinata avvalendosi dell'emocitometro.

3.6. Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

L'effetto del rosiglitazone sulla proliferazione cellulare è stato valutato nelle cellule H295R e SW-13 a 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento mediante saggio di incorporazione della Bromodeossiuridina (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU).

Le cellule sono state seminate su piastre Petri dal diametro di 100 mm e sottoposte al trattamento come precedentemente descritto. 30 minuti prima dell'analisi, la Bromodeossiuridina è stata aggiunta al terreno di coltura ad una concentrazione di 10 $\mu\text{mol/L}$. Le cellule sono state staccate, centrifugate e fissate con etanolo al 70%. I campioni sono stati successivamente incubati con HCl 4N per 20 minuti, per denaturare parzialmente il DNA; il pH acido è stato neutralizzato lavando le cellule con tampone Borax (pH 9.1) e successivamente con DPBS 1x.

Le cellule sono state permeabilizzate, mediante un'incubazione di 10 minuti in terreno completo cui era stato aggiunto FCS (Foetal Calf Serum, Calbiochem) al 20% e Tween-20 (Bio-Rad Laboratories) 0,5%, e successivamente incubate per un'ora a temperatura ambiente con un anticorpo monoclonale diretto contro la Bromodeossiuridina (mouse monoclonal antibody anti-BrdUrd, Roche), diluito in terreno completo contenente FCS 20% e Tween-20 0,06%. Dopo un lavaggio in DPBS 1x, i campioni sono stati incubati con un anticorpo secondario (FITC-conjugated F(abV) rabbit anti-mouse IgG, Dako), in DPBS 1x per un'ora.

Infine, le cellule sono state colorate con una soluzione contenente ioduro di propidio (PI), ad una concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$, e 75 KU/ml di RNasi (Invitrogen), diluiti in DPBS 1x. I campioni sono stati incubati con questa soluzione per almeno 3 ore e sono stati successivamente analizzati con un citofluorimetro FACScan, acquisendo almeno 20.000 eventi per campione.

Nel risultante citogramma, la regione superiore rappresenta le cellule positive alla colorazione con BrdU. La distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata invece calcolata sulla base del segnale emesso dallo ioduro di propidio in rapporto al numero di cellule analizzate, utilizzando il *software* MODFIT.

3.7. Saggio MTT

Le cellule delle linee H295R e SW-13 sono state sottoposte al saggio MTT per valutare la vitalità cellulare in seguito al trattamento con rosiglitazone, GW9662 o la combinazione di entrambi i farmaci.

Le cellule sono state seminate su piastre da 96 pozzetti e sottoposte ai diversi tipi di trattamento dopo 24 ore dalla semina. Dopo 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento, i campioni sono stati analizzati mediante saggio MTT (CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Roche), basato sulla capacità delle cellule proliferanti di convertire il sale di tetrazolio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ile]-2,5-difenil-tetrazolo-bromuro) in formazano (Mosmann, 1983).

Le cellule sono state incubate con una soluzione contenente il sale di tetrazolio (Dye Solution) per 4 ore al buio a 37°C e successivamente è stata aggiunta una soluzione in grado di bloccare la reazione e solubilizzare il formazano (Solubilization/Stop Solution). L'incubazione con questa soluzione è stata condotta per un'ora al buio a 37°C, successivamente l'assorbanza di ciascun campione è stata determinata utilizzando un lettore ELISA (Bio-Rad Laboratories) operante ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

3.8. Saggio TUNEL

La presenza di apoptosi nelle linee cellulari studiate è stata valutata mediante saggio TUNEL (Terminal-deoxynucleotidyl-transferase mediated biotin-dUTP Nick End Labeling), a seguito dei diversi trattamenti cui erano state sottoposte.

Ai tempi stabiliti, le cellule sono state staccate dai supporti su cui erano state poste in coltura, centrifugate e risospese in DPBS 1x. Una sospensione cellulare contenente circa 100.000 cellule per campione è stata quindi centrifugata su dei vetrini copri oggetto precedentemente rivestiti con poli-L-lisina allo 0,1%. I campioni sono stati quindi fissati con formaldeide 4% per 20 minuti a temperatura ambiente.

La morte cellulare per apoptosi è stata determinata utilizzando un apposito kit (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. I controlli positivi sono stati incubati con 300 U di DNasi (Invitrogen) per 10 minuti a temperatura ambiente.

I campioni sono stati marcati anche con il colorante nucleare Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), diluito in metanolo ad una concentrazione finale di 1 µg/ml. Dopo un'incubazione di 10 minuti a 37°C, i campioni sono stati lavati per 3 volte con DPBS 1x e osservati con un microscopio ad epifluorescenza (Zeiss).

Almeno dieci campi scelti casualmente sono stati fotografati utilizzando un filtro in grado di rilevare la fluorescenza verde, tipica delle cellule positive al TUNEL (520 nm), ed un filtro per la fluorescenza blu emessa dall'Hoechst 33342 (455 nm). La percentuale di apop-

tosì per ciascun campione è stata quindi determinata utilizzando il *software* ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versione 1.39u), comparando le cellule positive al TUNEL con le cellule totali, colorate con Hoechst 33342.

3.9. Microscopia elettronica

Le cellule delle linee H295R e SW-13 trattate con rosiglitazone e le cellule H295R trattate con 3-metiladenina sono state sottoposte ad un'analisi in microscopia elettronica per valutare gli effetti del trattamento a livello morfologico.

I campioni, seminati su piastre Petri dal diametro di 100 mm e trattati come precedentemente descritto, sono stati fissati con glutaraldeide 2,5% in DPBS, pH 7.4, ad una temperatura di +4°C. Seguendo il protocollo di Modesti *et al.* (1993), essi sono stati quindi lavati in DPBS 1x e post-fissati con una soluzione contenente tetrossido di osmio all'1,33%, per 2 ore a +4°C. Dopo numerosi lavaggi con DPBS, i campioni sono stati disidratati in una scala ascendente di acetone e trasferiti in toluene. Infine, essi sono stati posti in una resina epossidica a base di Epon 812, che è stata lasciata polimerizzare per 24 ore a 60°C in una stufa.

Utilizzando un microtomo Reichert con una lama di vetro, la resina è stata tagliata in sezioni sottili, che sono state colorate con blu di toluidina ed esaminate con un microscopio Axioscope (Zeiss). Delle sezioni ultrasottili sono state invece ottenute usando un microtomo con una lama di diamante; esse sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e analizzate con un microscopio elettronico Morgagni 268D (Philips). Tutte le osservazioni sono state ripetute 6 o 7 volte per ciascun campione.

3.10. Misurazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno

Le cellule delle linee H295R e SW-13 trattate con rosiglitazone sono state analizzate per valutare il contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), dopo 24, 48 e 72 dall'inizio del trattamento.

Le cellule in adesione sono state staccate dai supporti su cui crescevano, centrifugate e risospese in DPBS 1x. Esse sono state quindi incubate con diidroetidio (DHE, Molecular Probes) 4 µM per 45 minuti a 37°C. I campioni sono stati quindi analizzati tramite citofluorimetria, utilizzando un sistema di analisi che permette di correlare la fluorescenza emessa dal colorante, misurata all'interno delle cellule, con la quantità di specie reattive dell'ossigeno presenti nelle stesse.

3.11. Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è stato valutato nelle cellule delle linee H295R e SW-13 di controllo o trattate con il rosiglitazone, utilizzando il colorante cationico lipofilico JC-1 (5-5',6-6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilenbenzimidazol-carbocianina iodato; Molecular Probes), una sonda metacromatica capace di entrare selettivamente nei mitocondri, sensibile alle variazioni di voltaggio e pertanto in grado di cambiare reversibilmente la propria lunghezza d'onda di emissione al variare del $\Delta\psi_m$. JC-1, infatti, possiede uno spettro con due picchi di emissione, uno a 530 nm (luce verde), quando si trova in forma monomerica, e uno a 590 nm (luce arancio-rosso), in seguito alla formazione di aggregati. Nelle cellule normalmente polarizzate, JC-1 forma degli aggregati, mentre nei mitocondri ipopolarizzati, a seguito di un calo del potenziale di membrana, si trova in forma monomerica.

Le cellule sono state staccate e risospese in 500 μ l di DPBS 1x contenente JC-1 1 μ M. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, i campioni sono stati trasferiti in ghiaccio e successivamente analizzati tramite citofluorimetria, utilizzando il canale FL-1 per rilevare la fluorescenza verde emessa dai monomeri di JC-1 ed il canale FL-2 per la fluorescenza rossa tipica degli aggregati. Come controllo positivo è stato utilizzato un campione rappresentato da cellule trattate con valinomicina 10 μ M, una molecola in grado di aumentare la permeabilità della membrana mitocondriale.

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il *software* MODFIT, un programma che consente la costruzione di un grafico a quadranti, sul quale si distribuiscono le cellule normalmente polarizzate (regione I), quelle in cui il potenziale di membrana è intermedio (regione II), basso (regione III) o molto basso (regione IV).

3.12. Immunofluorescenza

Le linee cellulari H295R e SW-13 sono state sottoposte a un saggio di immunofluorescenza diretto contro la proteina LAMP-1 (Lysosomal-Associated Membrane Protein-1) dopo 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento con rosiglitazone.

Le cellule, seminate su vetrini per colture cellulari costituiti da 8 camerette di superficie pari a 0,7 cm², sono state fissate con paraformaldeide 4% per 15 minuti a temperatura ambiente, incubate con NH₄Cl 10 mM in DPBS 1x e successivamente con saponina allo 0,05% in DPBS 1x. Il *blocking* è stato effettuato con BSA (sieroalbumina bovina, Sigma-Aldrich) al 3% in DPBS 1x per 15 minuti a temperatura ambiente. I preparati sono stati

quindi incubati per un'ora a temperatura ambiente con un anticorpo diretto contro LAMP-1 (mouse anti-human LAMP-1, Calbiochem), diluito 1:40 in BSA 3%, lavati due volte con DPBS 1x e successivamente incubati per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario marcato con rodamina (polyclonal rabbit anti-mouse TRITC, Dako), diluito 1:2000 in BSA 3%.

L'immunofluorescenza diretta contro la proteina HIF-1 α è stata invece condotta sulle cellule delle linee H295R e SW-13 non trasfettate oppure trasfettate con i vettori pBABE-neo e pBABE-neo-p53 e sottoposte a trattamento con radiazioni ionizzanti. Le cellule in questo caso sono state cresciute su vetrini rivestiti di poli-L-lisina posti all'interno di piastre da sei pozzetti e sottoposte a trattamento.

Ai tempi stabiliti, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lavate due volte con DPBS 1x, fissate con formaldeide 4% per 20 minuti a temperatura ambiente e permeabilizzate con TRITON X-100 (Sigma-Aldrich) 0,1% in sodio citrato 0,1%. Lo smorzamento della fluorescenza è stato effettuato mediante incubazione delle cellule con cloruro di ammonio (NH₄Cl) 10mM in DPBS 1x per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi incubati per un'ora con BSA 3% in FBS 5% in DPBS 1x, per bloccare i siti di legame aspecifici, e successivamente con l'anticorpo primario diretto contro HIF-1 α (Cell Signaling Technology), diluito 1:100 in BSA 3%, per un'ora a temperatura ambiente. Dopo alcuni lavaggi con DPBS 1x, è stata effettuata un'incubazione per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluito 1:4000 in BSA 3%.

I campioni sono stati quindi colorati con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) per 10 minuti a 37°C e, dopo alcuni lavaggi con DPBS 1x, i vetrini sono stati montati utilizzando una soluzione di glicerolo al 90% in DPBS 1x.

Le osservazioni sono state condotte avvalendosi di un microscopio a fluorescenza (Zeiss), ad un ingrandimento 40x o 100x.

3.13. RT-PCR

L'RNA delle cellule H295R, SW-13 e SK-OV-3 trasfettate con i vettori pBABE-neo e pBABE-neo-p53 e irraggiate è stato estratto e retro-trascritto come precedentemente descritto. L'analisi dell'espressione dei geni *TP53*, *BCL2*, *IGF2*, *HIF-1 α* e *VEGF* è stata effettuata mediante RT-PCR a partire da 2 μ l di cDNA in un volume finale di 50 μ l di misce-

la di reazione, contenente 1,25 U di Taq polimerasi (Applied Biosystems). I *primers* e le condizioni di reazione sono riportati nella tabella 3.3.

Come sistema di normalizzazione della reazione di amplificazione è stato utilizzato il gene *GAPDH* per tutte le linee cellulari.

Primer	Sequenza	Lunghezza amplicone	Ta	n° cicli
TP53 Senso Antisenso	5'-GCCAGACTGCCTTCCGGGTC-3' (172) 5'-GCCGGTGTAGGAGCTGCTGG-3' (445)	274 bp	57°C	30
BCL2 Senso Antisenso	5'-ATGACTGAGTACCTGAACCG-3' (1022) 5'-CCAAACTGAGCAGAGTCTTC-3' (1163)	142 bp	54°C	30
IGF2 Senso Antisenso	5'-GTTTGCACACGCAGCA-3' (698) 5'-AAGCACCAGCATCGACTT-3' (788)	91 bp	64°C	25
HIF-1α Senso Antisenso	5'-TGCAGAAATGCTCAGAGAAAGCGAA-3' (2542) 5'-GCTGCATGATCGTCTGGCTGCT-3' (2641)	100 bp	63°C	27
VEGF-A Senso Antisenso	5'-GAGCCGGGCAGGAGGAAGGA-3' (1736) 5'-TGGCGGCAGCGTGGTTTCTG-3' (1839)	104 bp	63°C	27
GAPDH Senso Antisenso	5'-TCTTTTTCGTCGCCAGCCGA-3' (64) 5'-ACCAGGCGCCCAATACGACC-3' (155)	92 bp	63°C	25

Tabella 3.2. Sequenza dei *primers* e condizioni utilizzate per valutare l'espressione dei geni *TP53*, *BCL2*, *IGF2*, *HIF-1 α* e *VEGF-A* nelle cellule delle linee H295R, SW-13 e SK-OV-3, a partire da cDNA.

Ta: temperatura di *annealing*

Al termine della reazione di amplificazione, i campioni sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen), contenente bromuro di etidio allo 0,04% (Sigma-Aldrich). La visualizzazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata

avvalendosi di un trans-illuminatore Dolphin-Chemi (Wealtec) e l'analisi dell'intensità del segnale emesso da ciascun frammento è stata eseguita utilizzando il *software* ImageJ.

3.14. Preparazione di estratti proteici nucleari e citoplasmatici

Per l'analisi dell'espressione della proteina HIF-1 α nelle cellule delle linee H295R e SW-13 è stato utilizzato un kit che consente la separazione della frazione proteica nucleare da quella citoplasmatica (Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, MBL International). Circa 2x10⁶ cellule sono state utilizzate per l'estrazione delle proteine, seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Gli estratti proteici nucleari e citoplasmatici sono stati quantificati tramite saggio Bradford (Bio-Rad Laboratories), mediante lettura dell'assorbanza a 595 nm. La concentrazione di ciascun campione è stata ricavata interpolando i valori ottenuti su una retta di taratura costruita in base alla lettura di alcuni standard a concentrazione nota di BSA (1,25; 2,5; 5; 10; 20 μ g/ml). Per ciascuna porzione cellulare, 50 μ g di proteine sono stati quindi utilizzati per la successiva analisi di Western blotting.

3.15. Western blotting

Le cellule delle linee H295R, SW-13 e SK-OV-3 sono state sottoposte ad analisi tramite Western blotting in seguito ai diversi tipi di trattamento. Le proteine totali sono state estratte mediante lisi cellulare, sonicazione in ghiaccio e centrifugazione a 14000 rpm per 30 minuti. La concentrazione di ciascun campione è stata determinata mediante il saggio colorimetrico di Bradford.

Le proteine (50 μ g) sono state separate su base dimensionale tramite SDS PAGE su un gel di poliacrilammide al 10% e successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories). La saturazione della membrana è stata effettuata mediante un'incubazione con latte al 5% (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Laboratories) in DPBS 1x contenente Tween-20 allo 0,1%, per un'ora a temperatura ambiente.

L'incubazione con l'anticorpo primario è stata condotta *overnight* ad una temperatura di +4°C, utilizzando i seguenti anticorpi: PPAR γ 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), ciclina E 1:500 (BD Biosciences), cdk2 1:800 (BD Biosciences), Rb(p-Ser780) 1:500 (Santa Cruz Biotechnology), anti pan-citocheratina 1:100 (Sigma-Aldrich), AMPK- α (p-Thr172) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), beclina-1 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), p53(DO-1) 1:500 (Santa Cruz Biotechnology), Akt(p-Ser473) 1:400 (Santa Cruz Biotechnology), Akt

1,2,3 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), HIF-1 α 1:500 (Cell Signaling Technology), istone H1 1:500 (BD Biosciences), β -actina 1:1000 (Sigma-Aldrich) e vinculina 1:1000 (Sigma-Aldrich).

La visualizzazione degli antigeni è stata effettuata utilizzando un reagente chemiluminescente potenziato (ECL, Enhanced ChemiLuminescence, Pierce), dopo un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario (goat anti-mouse o goat anti-rabbit secondary antibody, Sigma-Aldrich).

3.16. Analisi statistica dei dati

Tutti i valori ottenuti rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato. I risultati sono presentati come il valore medio $\pm$ D.S. (deviazione standard).

I campioni di controllo e trattati sono stati comparati utilizzando il test di analisi della varianza (ANOVA); inoltre, un confronto tra i singoli trattamenti è stato eseguito usando il test del *t* di Student. In ogni analisi, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

I dati relativi all'apoptosi e all'espressione di geni target sono stati analizzati utilizzando il *software* ImageJ (versione 1.39u). Infine, tutti i risultati sono stati elaborati usando i *software* Assistat (versione 7.6b) e Microsoft Excel.

4. Risultati

4.1. Nuove strategie farmacologiche: il rosiglitazone nella terapia del carcinoma corticosurrenalico

4.1.1. Effetto del rosiglitazone sulla proliferazione cellulare

L'effetto del rosiglitazone (RGZ) sulla proliferazione cellulare è stato valutato nelle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico H295R e SW-13, trattate con dosi del farmaco di 20 μ M e 10 μ M, rispettivamente.

La capacità del rosiglitazone di inibire la proliferazione cellulare è evidente a partire da 48 h dell'inizio del trattamento (-40% nella linea H295R e -31% nella linea SW-13, rispetto alle cellule di controllo; $p < 0,01$) e aumenta fino a 72 h, quando l'inibizione della proliferazione supera il 50% in entrambe le linee cellulari ($p < 0,01$) (figura 1).

Poiché il rosiglitazone è un ligando selettivo di PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ), le cellule sono state trattate anche con un inibitore specifico di questa proteina, il GW9662, ad una concentrazione di 20 μ M.

La somministrazione di GW9662 concomitantemente al trattamento con rosiglitazone, tuttavia, è in grado di ripristinare solo parzialmente la capacità proliferativa delle cellule H295R, infatti a 72 h dall'inizio del trattamento è stata osservata un'inibizione della proliferazione del 55% nelle cellule trattate con rosiglitazone e un'inibizione pari a -34% nei campioni trattati con GW9662 e rosiglitazone in combinazione (figura 1.A). Come mostrato in figura 1.C, l'effetto del trattamento con i due farmaci non è dovuto ad un aumento della tossicità, come dimostrato mediante saggio di esclusione del Trypan blue.

Nelle cellule della linea SW-13, la somministrazione di GW9662 20 μ M non determina un cambiamento nell'inibizione della proliferazione cellulare indotta dal rosiglitazone. I campioni trattati con rosiglitazone e GW9662 in combinazione, infatti, risultano inibiti della stessa percentuale di quelli trattati con il solo rosiglitazone (-51% rispetto ai controlli dopo 72 h) (figura 1.B), suggerendo che il rosiglitazone eserciti il proprio effetto anti-proliferativo attraverso un meccanismo indipendente da PPAR- γ , poiché anche in questo caso il trattamento con GW9662 non interferisce con la proliferazione e la vitalità cellulare (figure 1.B e 1.D).

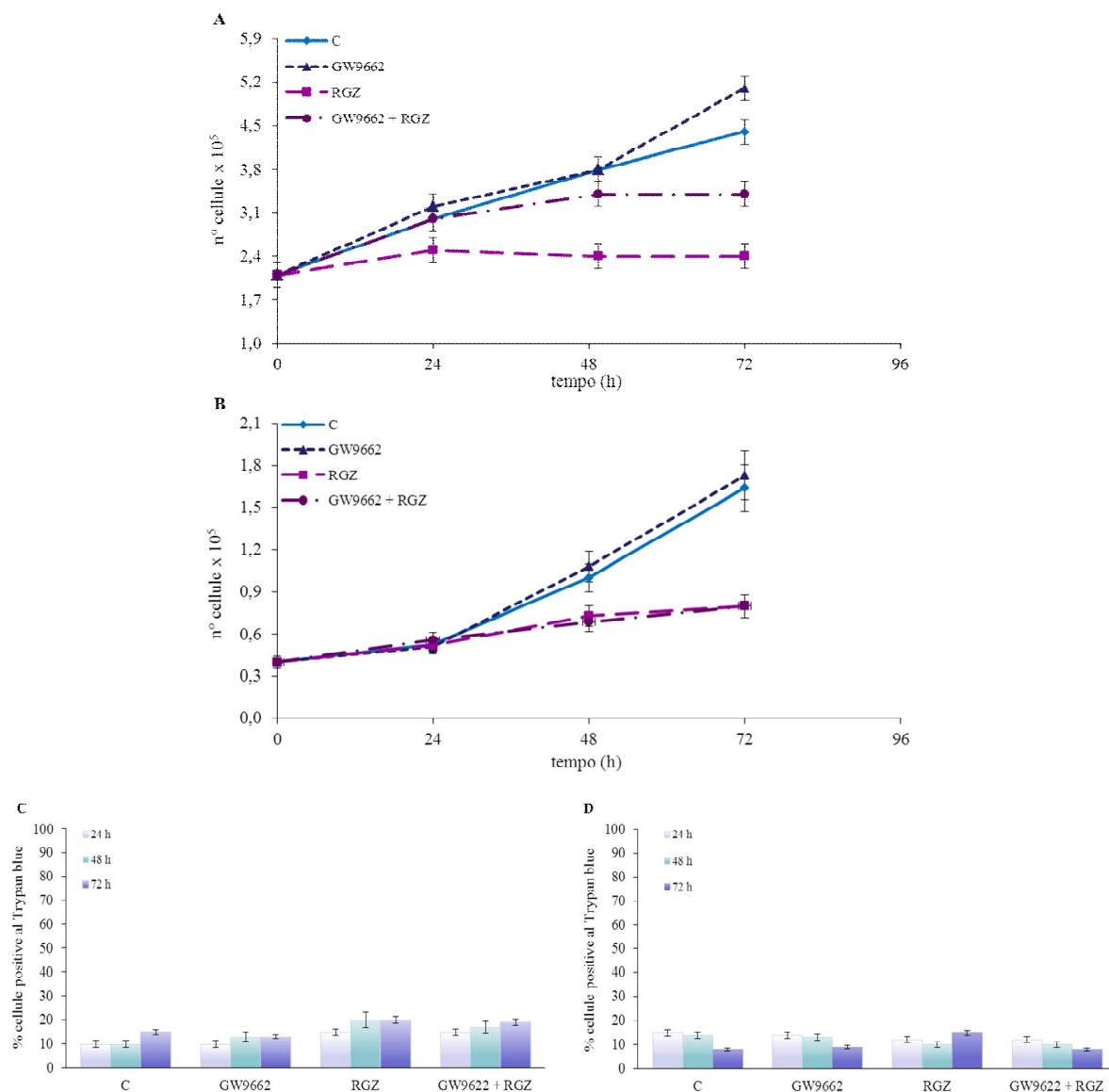


Figura 1. Il rosiglitazone induce inibizione della proliferazione cellulare nelle linee H295R (A) e SW-13 (B), a partire da 48 h dall'inizio del trattamento (-40% nella linea H295R e -31% nella linea SW-13). L'effetto del farmaco è ridotto in presenza di GW9662 20µM nelle cellule H295R (A), mentre nella linea SW-13 (B) non vi sono differenze significative tra il trattamento con il rosiglitazone da solo e la combinazione dei due farmaci (RGZ + GW9662). La proliferazione cellulare è stata determinata mediante conta cellulare, utilizzando il saggio di esclusione del Trypan blue per escludere la presenza di necrosi in seguito ai diversi trattamenti (C, H295R e D, SW-13).

I dati riportati rappresentano la media ± D.S. di almeno 3 esperimenti condotti in duplicato.

L'effetto del trattamento con rosiglitazone e GW9662 nelle linee H295R e SW-13 è stato valutato anche mediante saggio MTT. Tale analisi ha confermato i dati precedentemente ottenuti mediante conta cellulare, indicando che nella linea H295R il trattamento con rosi-

glitazone è in grado di ridurre la vitalità cellulare e che tale effetto è diminuito, ma non completamente annullato, dalla somministrazione di GW9662 20 μ M (figura 2.A). Nella linea SW-13, come atteso, non sono invece evidenziabili differenze tra i campioni trattati con rosiglitazone e GW9662 in combinazione rispetto a quelli trattati con il solo rosiglitazone (figura 2.B).

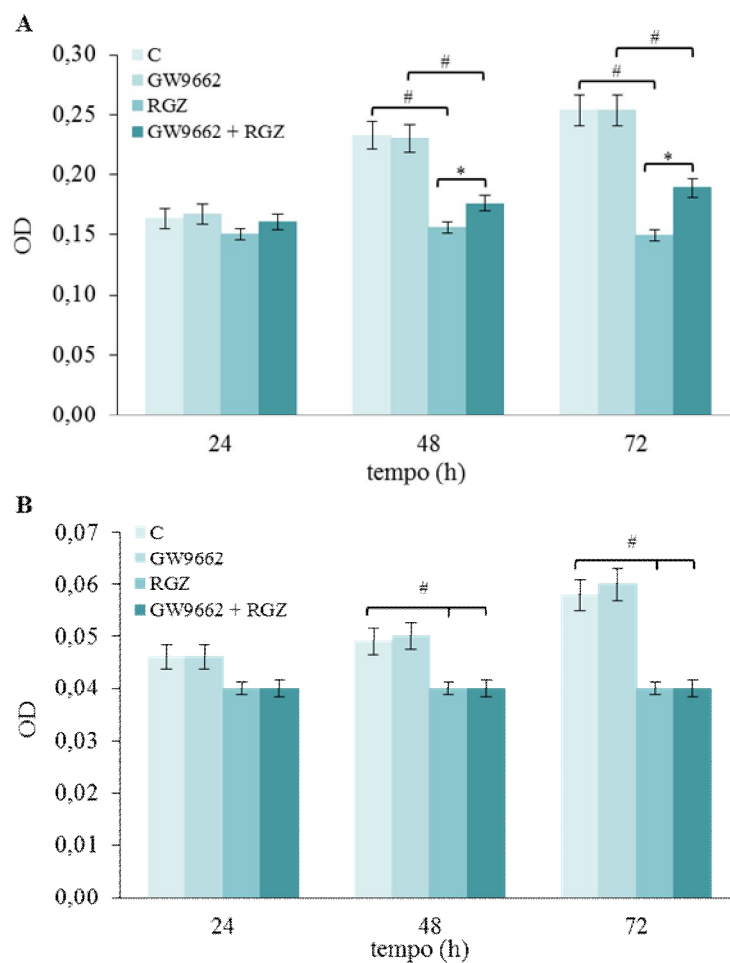


Figura 2. Istogrammi relativi al saggio MTT condotto sulle cellule delle linee H295R (A) e SW-13 (B) sottoposte al trattamento con rosiglitazone, GW9662 o entrambi, dopo 24, 48 e 72 h dall'inizio del trattamento. La somministrazione di GW9662 concomitantemente al trattamento con rosiglitazone è in grado di ridurre l'effetto del farmaco sulla vitalità cellulare nella linea H295R, mentre non determina alcun cambiamento nella linea SW-13, indicando che in queste cellule l'azione del rosiglitazone è indipendente dal recettore nucleare PPAR- γ .

I dati riportati rappresentano la media $\pm$ D.S. di almeno 3 esperimenti condotti in duplicato. (*, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$)

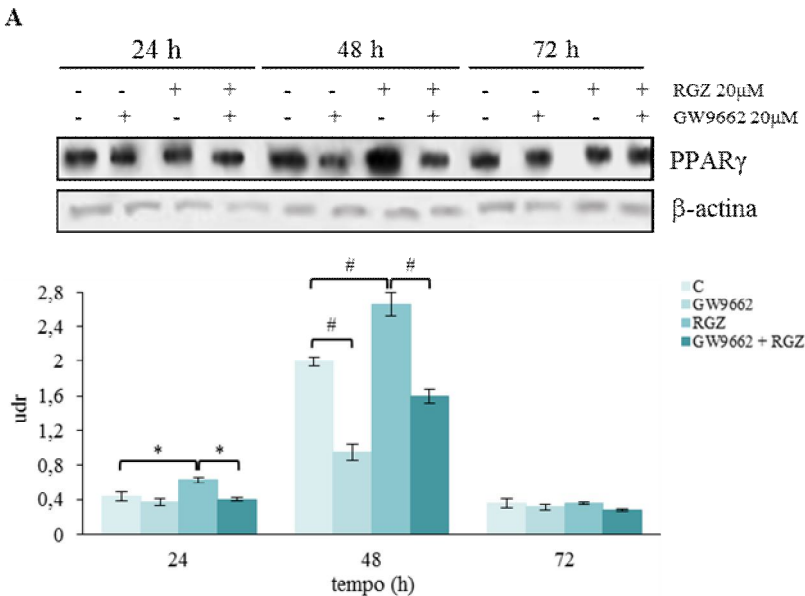
Questi risultati indicano che il rosiglitazone è in grado di inibire la proliferazione nelle due linee cellulari derivanti da carcinoma corticosurrenalico H295R e SW-13. Nella linea H295R, l'azione del farmaco sembra essere in parte mediata dal recettore nucleare PPAR- γ e in parte indipendente da esso. Nelle cellule della linea SW-13, al contrario, l'effetto del rosiglitazone appare completamente indipendente da PPAR- γ .

I livelli di espressione di PPAR- γ sono stati valutati mediante Western blotting, utilizzando un anticorpo specifico diretto contro questa proteina. L'analisi densitometrica ha permesso di osservare che il rosiglitazone è in grado di indurre l'espressione di PPAR- γ in entrambe le linee cellulari.

Nelle cellule della linea H295R, i livelli di PPAR- γ aumentano di 1,45 volte a 24 h dall'inizio del trattamento ($p < 0,05$) nelle cellule trattate con rosiglitazone rispetto ai controlli. Tale aumento è pari a 1,33 volte a 48 h ($p < 0,01$) e tende a ridursi a 72 h (figura 3.A).

Nella linea SW-13, il trattamento con rosiglitazone induce un aumento nei livelli di espressione di PPAR- γ rispetto ai controlli pari a 1,46 volte ($p < 0,01$) a 24 e 48 ore dall'inizio del trattamento (figura 3.B). anche in questo caso, l'effetto su PPAR- γ tende a diminuire dopo 72 h.

In entrambe le linee cellulari, inoltre, la somministrazione di GW9662 è in grado di inibire l'espressione di PPAR- γ , sia da sola, sia in combinazione con il rosiglitazone (figure 3.A e 3.B).



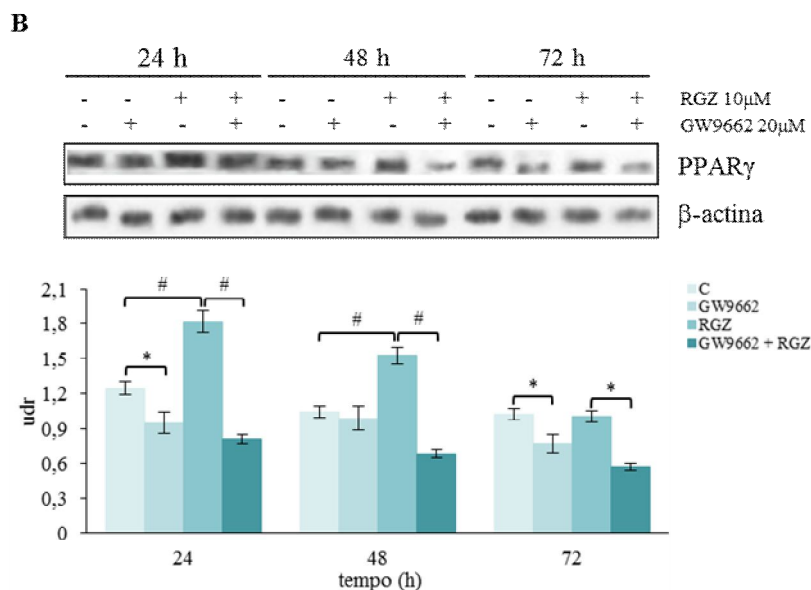


Figura 3. I livelli di espressione di PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) sono stati valutati nelle cellule delle linee H295R (A) e SW-13 (B) in seguito al trattamento con rosiglitazone, GW9662 20 μ M o entrambi, fino a 72 h. Gli estratti proteici totali sono stati sottoposti a Western blotting e l'intensità delle bande è stata quantificata utilizzando il *software* ImageJ, usando la β -actina come normalizzatore. Le immagini mostrate sono rappresentative di almeno 3 esperimenti. (*, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$)

Questi risultati suggeriscono pertanto che il meccanismo d'azione del rosiglitazone sia altamente cellulo-specifico e che delle vie di trasduzione del segnale indipendenti da PPAR- γ possano mediare l'effetto del farmaco sulla proliferazione cellulare.

4.1.2. Effetto del rosiglitazone sulla sintesi di DNA e sul ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare nelle linee H295R e SW-13 è stata condotta mediante saggio di incorporazione della Bromodeossiuridina (BrdU).

Nelle cellule H295R, l'effetto del rosiglitazone sulla sintesi del DNA inizia a manifestarsi a partire da 48 h dall'inizio del trattamento (12% di cellule positive alla BrdU nei trattati vs 24% nei controlli) e aumenta fino a 72 h (10%) (figura 4.A).

Al contrario, nella linea SW-13 la capacità delle cellule di incorporare la BrdU appare completamente inibita a partire da 24 h nei campioni trattati con il rosiglitazone (6%) rispetto ai controlli (28%) e tale effetto aumenta nel tempo (5% a 48 h e 1% a 72 h dall'inizio del trattamento) (figura 4.B).

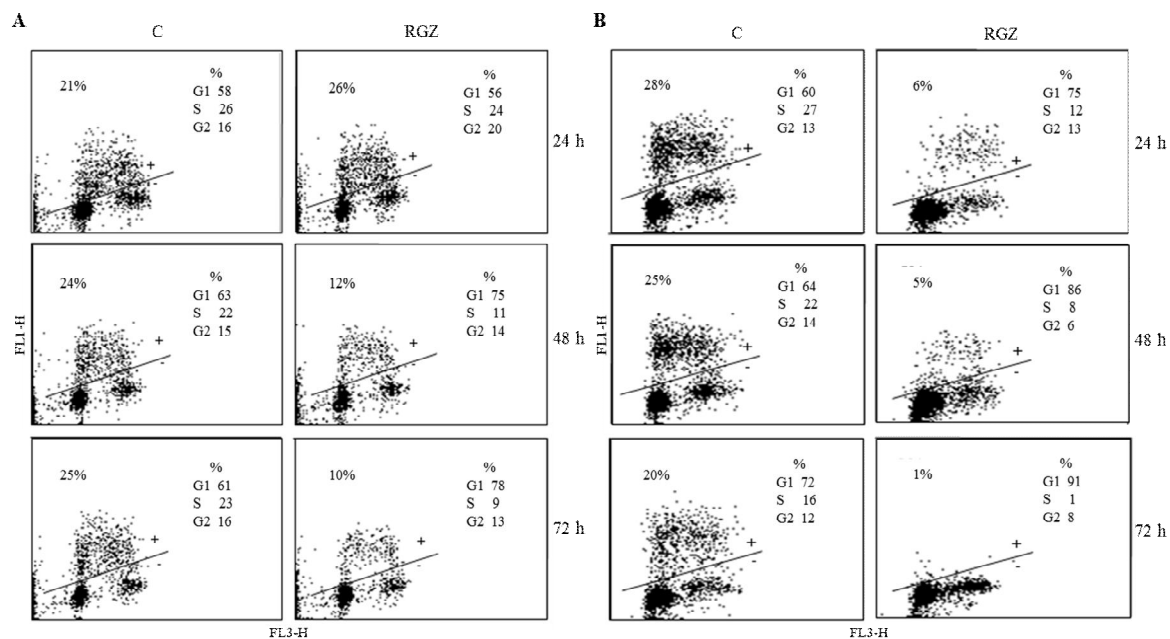


Figura 4. Il rosiglitazone induce una diminuzione nella sintesi di DNA nelle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico H295R (A) e SW-13 (B). Le cellule sono state incubate per 30 minuti con Bromodeossiridina (BrdU) e successivamente analizzate mediante citofluorimetria biparametrica. In alto a sinistra è riportata la percentuale di cellule positive alla BrdU, mentre in alto a destra è indicata la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Nella linea SW-13 (B), il rosiglitazone induce un arresto del ciclo cellulare nella fase G1, particolarmente evidente a 72 h dall'inizio del trattamento. I citogrammi riportati sono rappresentativi di 3 esperimenti condotti in duplicato.

L'inibizione della sintesi di DNA osservata in seguito al trattamento con rosiglitazone è coerente con una diminuzione delle cellule nella fase S del ciclo cellulare in entrambe le linee considerate. Tale effetto è determinato da un accumulo delle cellule nella fase G1 del ciclo cellulare, che appare particolarmente evidente nella linea SW-13, dove si osserva un blocco del ciclo cellulare nella fase G1 nel 91% delle cellule trattate con rosiglitazone a 72 h dall'inizio del trattamento (figura 4.B).

4.1.3. Effetto del rosiglitazone sulle proteine regolatrici del ciclo cellulare nella linea SW-13

Poiché il rosiglitazone è in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella linea SW-13, con un significativo accumulo delle cellule nella fase G1, abbiamo analizzato l'effetto del farmaco sull'espressione di alcune delle principali proteine che regolano la transizione tra la fase G1 e la fase S (*checkpoint* G1/S).

L'analisi per Western blotting condotta su cellule della linea SW-13 sottoposte a trattamento con rosiglitazone 10 μ M ha evidenziato che il farmaco è in grado di inibire significativamente l'espressione della ciclina E e della chinasi ad essa associata, cdk2 (figura 5).

Nel corso della stessa analisi, sono stati inoltre valutati i livelli di attivazione della proteina del retinoblastoma (Rb), uno dei principali *target* di cdk2, mediante la valutazione dei livelli di fosforilazione della Serina-780 di questa proteina. Come atteso, il trattamento con rosiglitazone riduce i livelli di proteina Rb fosforilata, confermando quindi una diminuzione dell'attività del complesso ciclina E-cdk2 (figura 5).

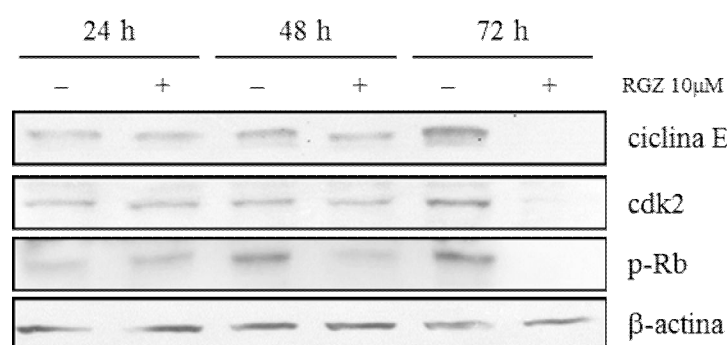


Figura 5. Il rosiglitazone induce una riduzione nei livelli di espressione delle proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S nella linea SW-13. La somministrazione di RGZ 10 μ M in queste cellule determina un abbassamento nei livelli di ciclina E e cdk2, ed una diminuzione nei livelli di fosforilazione in Serina 780 della proteina Rb.

L'intensità delle bande è stata quantificata utilizzando il *software* ImageJ, utilizzando la β -actina come normalizzatore. I risultati mostrati sono rappresentativi di almeno 3 esperimenti.

4.1.4. Effetto del rosiglitazone sul processo di morte cellulare per autofagia nella linea H295R

L'effetto del rosiglitazone sulla morfologia cellulare è stato valutato mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase. Dopo 24 ore dall'inizio del trattamento con rosiglitazone, è stata osservata la comparsa di numerosi vacuoli nel citoplasma delle cellule H295R, il cui numero e volume tendevano ad aumentare nel tempo, infatti a 48 h circa il 65% delle cellule risultavano vacuolizzate (dati non mostrati).

Le cellule sono state quindi analizzate al microscopio elettronico a trasmissione per valutare se la formazione di vacuoli in seguito alla somministrazione di rosiglitazone fosse dovuta alla presenza di autofagia. Come mostrato nella figura 6, nei campioni trattati con il

rosiglitazone è stata rilevata la presenza di vacuoli circondati da una doppia membrana, al cui interno si trovavano degli organelli citoplasmatici quasi intatti. Tale morfologia cellulare è riconducibile al processo di morte cellulare per autofagia ed è stata riscontrata solo nelle cellule sottoposte al trattamento farmacologico, ma non nei controlli.

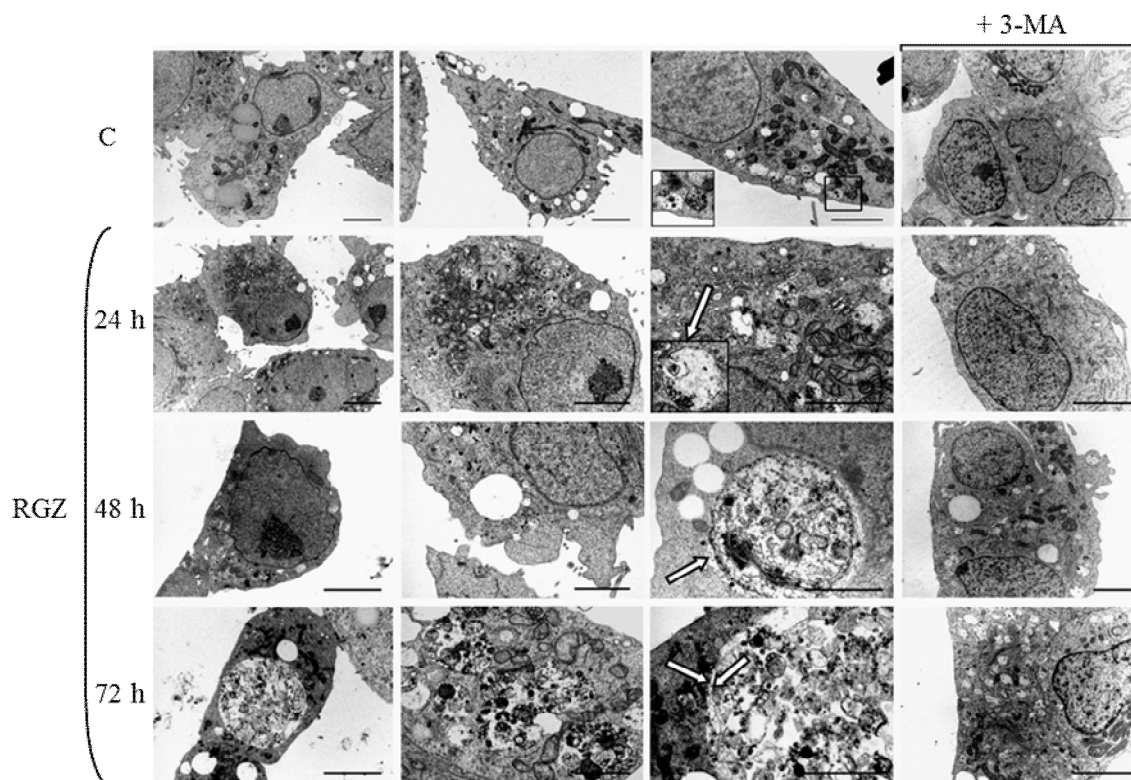


Figura 6. L'analisi ultrastrutturale delle cellule H295R sottoposte al trattamento con rosiglitazone 20μM ha evidenziato la presenza di cambiamenti morfologici riconducibili al processo di morte cellulare per autofagia. L'ingrandimento del processo di vacuolizzazione è mostrato nei riquadri all'interno dei pannelli, mentre le frecce indicano la membrana degli autofagosomi presenti nel citoplasma. Per confermare la specificità del rosiglitazone relativamente all'induzione del processo autofagico, le cellule sono state trattate anche con 3-MA (3-metiladenina), una sostanza in grado di inibire l'autofagia prima della formazione dell'autofagosoma. Nell'ultima colonna della figura è mostrata l'assenza di vacuoli autofagici nel citoplasma delle cellule trattate con 3-MA.

Le immagini sono rappresentative di almeno 7 osservazioni per campione.

L'analisi ultrastrutturale nelle cellule SW-13 ha evidenziato che in questa linea cellulare l'inibizione della proliferazione indotta dal trattamento con rosiglitazone non è seguita da morte cellulare per autofagia, infatti non sono state riscontrate differenze morfologiche tra

i campioni trattati e quelli di controllo, inoltre non è stata osservata la presenza di vacuoli nel citoplasma di queste cellule (dati non mostrati).

L'osservazione delle cellule al microscopio elettronico ha permesso inoltre di determinare l'assenza di morte cellulare per apoptosi in entrambe le linee cellulari studiate, infatti nei campioni trattati non è stato possibile osservare la presenza di condensazione della cromatina né di frammentazione nucleare, che rappresentano delle caratteristiche tipiche del processo apoptotico. Tale dato è stato successivamente confermato mediante saggio TUNEL, attraverso il quale è stato possibile determinare che la percentuale di cellule apoptotiche nei controlli e nei campioni trattati con rosiglitazone era del tutto paragonabile in entrambe le linee cellulari (dati non mostrati).

Poiché la presenza di un citoscheletro intatto è necessaria durante il processo di morte cellulare per autofagia (Bursch *et al.*, 2000), inoltre, i livelli di espressione delle citocheratine sono stati valutati nelle cellule della linea H295R sottoposte al trattamento con rosiglitazone 20 μ M.

L'analisi di Western blotting, condotta su queste cellule utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere i peptidi 1 (69 kDa), 4 (59 kDa) e 5 (58 kDa), ha dimostrato che il trattamento con rosiglitazone non determina alcun cambiamento nel *pattern* di espressione delle citocheratine (figura 7).

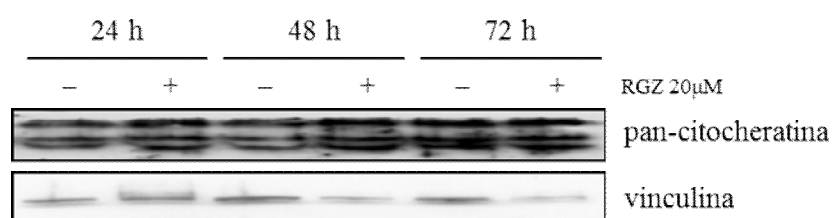


Figura 7. L'effetto del rosiglitazone sul citoscheletro è stata valutata mediante l'analisi per Western blotting della modulazione dei filamenti intermedi nella linea H295R dopo 24, 48 e 72 h dall'inizio del trattamento. L'anticorpo anti-pan-citocheratina riconosce i peptidi 1 (69 kDa), 4 (59 kDa) e 5 (58 kDa) e la quantità di citocheratine totali è stata calcolata come il rapporto tra le intensità delle bande relative ai tre epitopi e la vinculina.

L'immagine è rappresentativa di almeno tre esperimenti indipendenti.

Questi dati confermano quanto precedentemente osservato, infatti durante il processo autofagico i microtubuli ed i filamenti intermedi sono preservati, per permettere la formazio-

ne dei vacuoli autofagici e consentire il trasporto degli organelli citoplasmatici fino al loro sito di degradazione.

4.1.5. Effetto del rosiglitazone sull'attivazione della proteina AMPK

L'autofagia è un processo che può essere indotto da molteplici stimoli e che attraversa diverse fasi, regolate da svariati fattori, tra cui la protein chinasi attivata dall'AMP ciclico (AMPK), una proteina coinvolta nell'induzione dell'autofagia, sia direttamente, sia attraverso l'inibizione delle vie di sopravvivenza cellulare. Poiché il rosiglitazone è in grado di indurre la fosforilazione della subunità catalitica (subunità α) di AMPK (LeBrasseur *et al.*, 2006), l'effetto del farmaco su questa chinasi è stato valutato nelle cellule della linea H295R.

L'analisi di Western blotting in questa linea cellulare ha evidenziato un aumento della forma fosforilata di AMPK α di 1,5 volte nei campioni trattati con rosiglitazone rispetto ai controlli ($p < 0,01$), che si mantiene per tutta la durata dell'esperimento, confermando la capacità del farmaco di attivare questa proteina (figura 8).

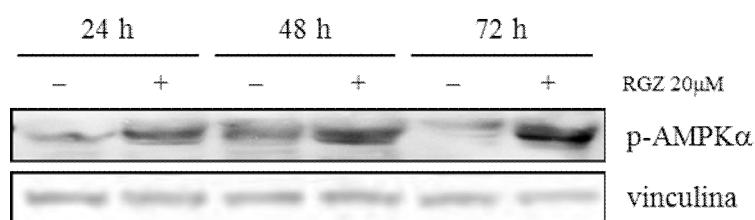


Figura 8. L'effetto del rosiglitazone sull'attivazione di AMPK è stato valutato nella linea cellulare H295R mediante analisi per Western blotting, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere la subunità catalitica $\alpha 1$ della proteina nella sua forma fosforilata. L'aumento dell'intensità delle bande nei campioni trattati con rosiglitazone 20 μ M indica che il farmaco è in grado di attivare AMPK.

I risultati mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti.

4.1.6. Attivazione delle proteine coinvolte nelle diverse fasi del processo autofagico

Poiché il rosiglitazone appare in grado di indurre morte cellulare per autofagia nelle cellule della linea H295R, abbiamo valutato l'effetto del farmaco su due importanti fattori coinvolti in diverse fasi del processo autofagico, beclina-1 e LAMP-1 (Lysosome-Associated Membrane Protein-1).

La beclina-1 è una proteina citoplasmatica necessaria per la formazione dell'autofagosoma, i cui livelli aumentano durante le prime fasi dell'autofagia. L'analisi tramite Western blotting ha dimostrato che i livelli di beclina-1 aumentano nelle cellule della linea H295R sottoposte al trattamento con rosiglitazone (figura 9). Tale aumento è massimo a 48 h dall'inizio del trattamento, mentre tende a ridursi dopo 72 h.

Nella linea SW-13, invece, non è stata riscontrata alcuna modulazione nell'espressione della beclina-1 a seguito del trattamento con rosiglitazone, indicando che in queste cellule il farmaco non ha effetti sulle proteine coinvolte nel processo autofagico (dati non mostrati).

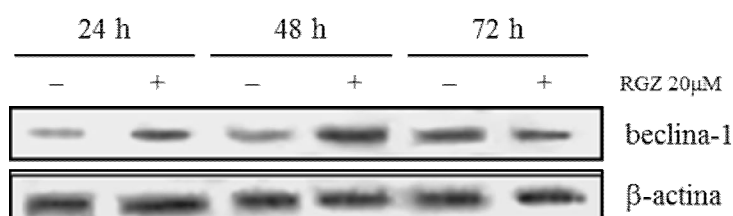


Figura 9. L'effetto del rosiglitazone sulla proteina beclina-1 è stato valutato nelle cellule della linea H295R a 24, 48 e 72 h dall'inizio del trattamento, utilizzando la β -actina come normalizzatore. L'aumento dei livelli di beclina-1 nei campioni trattati indica che in queste cellule è in corso un processo di morte per autofagia, poiché questa proteina è coinvolta nella formazione dell'autofagosoma.

L'immagine è rappresentativa di almeno tre esperimenti indipendenti.

Lo stato di LAMP-1 è stato valutato mediante immunofluorescenza nelle cellule trattate con il rosiglitazone, poiché questa glicoproteina è coinvolta nel processo di fusione dell'autofagosoma con i lisosomi, che costituisce una delle fasi terminali dell'autofagia. Nelle cellule della linea H295R, è stato evidenziato un aumento del segnale relativo alla proteina LAMP-1, che forma degli aggregati nel citoplasma, evidenti a partire da 48 h dall'inizio del trattamento con rosiglitazone (figura 10).

Questi risultati indicano pertanto che il trattamento farmacologico induce morte cellulare per autofagia e stimola la degradazione degli organelli citoplasmatici determinando un aumento nel numero e nelle dimensioni dei lisosomi.

Come atteso, inoltre, nelle cellule della linea SW-13, dove non vi è evidenza di morte per autofagia, la localizzazione di LAMP-1 non risulta alterata dal trattamento con rosiglitazone (dati non mostrati).

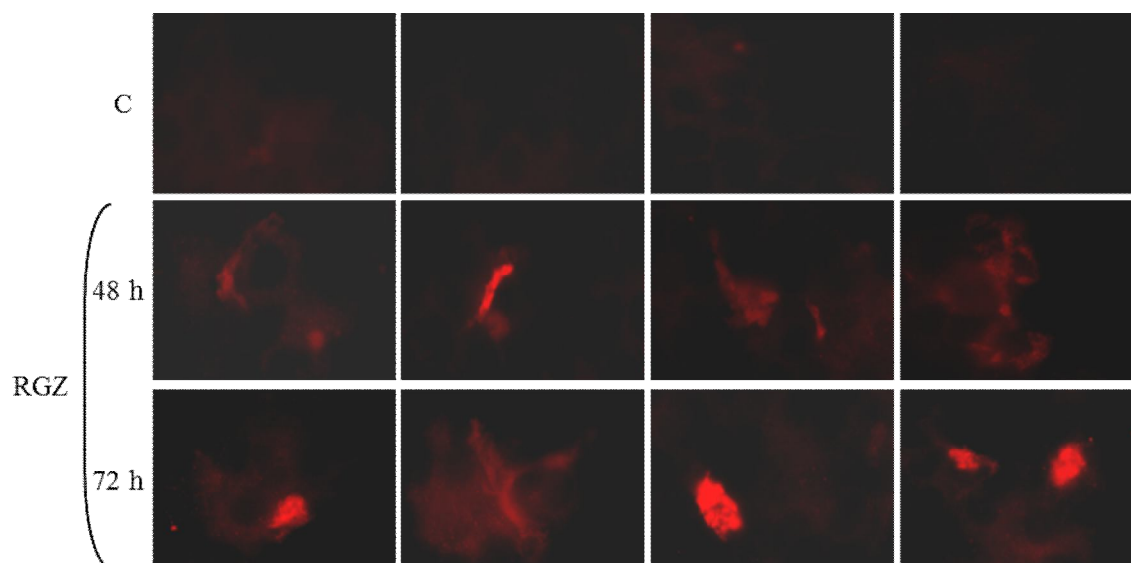


Figura 10. L'effetto del rosiglitazone sulla proteina LAMP-1 (Lysosome-Associated Membrane Protein-1) è stato valutato mediante immunofluorescenza nelle cellule della linea H295R. Le immagini mostrano un aumento del segnale di LAMP-1 in seguito al trattamento con il farmaco, indicandone l'aggregazione all'interno di strutture citoplasmatiche, gli autofagolisosomi, caratteristiche del processo autofagico. Le cellule sono state osservate con un microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento di 100x. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti in duplicato.

4.1.7. Formazione di specie reattive dell'ossigeno e alterazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il processo di autofagia può essere indotto dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che determinano la degradazione dei mitocondri e dei perossisomi danneggiati attraverso questo meccanismo di morte cellulare programmata (Scherz-Shouval e Elazar, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Poiché l'analisi ultrastrutturale delle cellule H295R sottoposte al trattamento con rosiglitazone 20 μ M ha evidenziato la presenza di mitofagia, ovvero la degradazione dei mitocondri attraverso il processo autofagico, l'effetto del farmaco sulla produzione di ROS è stato valutato in questa linea cellulare.

Come mostrato nella figura 11, il trattamento con rosiglitazone induce un significativo aumento delle specie reattive dell'ossigeno, che si evidenzia a partire da 24 h dall'inizio del trattamento (28%) e aumenta nel tempo (56% a 48 h e 58% a 72 h).

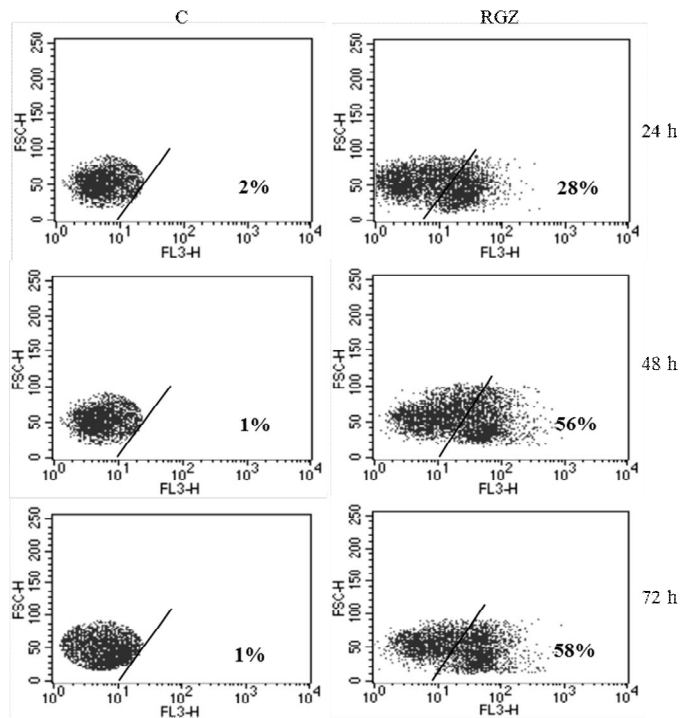


Figura 11. L'analisi citofluorimetrica del contenuto di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule della linea H295R indica che il rosiglitazone induce un aumento dello stress ossidativo a partire da 24 h dall'inizio del trattamento, che si mantiene fino alla fine dell'esperimento.

La figura è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti. La percentuale indicata in ogni pannello indica la proporzione di cellule positive ai ROS.

L'effetto del rosiglitazone sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno è stata valutata anche nelle cellule SW-13, tuttavia non sono state rilevate differenze significative nella quantità di ROS nei campioni di controllo e trattati con il rosiglitazone (8% e 6% a 72 h dall'inizio del trattamento, rispettivamente) (dati non mostrati). Questi risultati, pertanto, indicano che l'inibizione della proliferazione cellulare indotta dal rosiglitazone nelle cellule della linea SW-13 non è imputabile al processo di morte cellulare per autofagia né ad un aumento nella produzione di ROS.

Per delineare in modo più preciso il meccanismo d'azione del rosiglitazone sulle cellule della linea H295R, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica utilizzando la sonda lipofila JC-1, che è in grado di indicare variazioni nel potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) attraverso il cambiamento del proprio spettro di emissione (Paglin *et al.*, 2005). Poiché l'effetto del rosiglitazone sulla produzione di ROS si manifesta a partire da 24 h, le cellule H295R sottoposte al trattamento farmacologico sono state analizzate dopo 24 e 48 h dall'inizio del trattamento.

La figura 12 rappresenta il diagramma di dispersione a punti (DotPlot) relativo alla misurazione del potenziale di membrana mitocondriale basata sulle variazioni nello spettro di emissione di JC-1.

Nei campioni di controllo, che presentano mitocondri normalmente polarizzati, JC-1 è presente in forma sia monomerica che aggregata, pertanto entrambi gli spettri di emissione (verde e arancio-rosso) sono rilevabili (quadrante 1). Al contrario, nei campioni trattati con rosiglitazone, la forma monomerica di JC-1 aumenta significativamente, determinando un aumento della fluorescenza verde (45% a 24 h e 55% a 48 h; quadrante 4) rispetto ai controlli (3% a 24 h e 9% a 48 h) ($p < 0,01$) ed indicando che in queste cellule è avvenuta una notevole depolarizzazione della membrana mitocondriale.

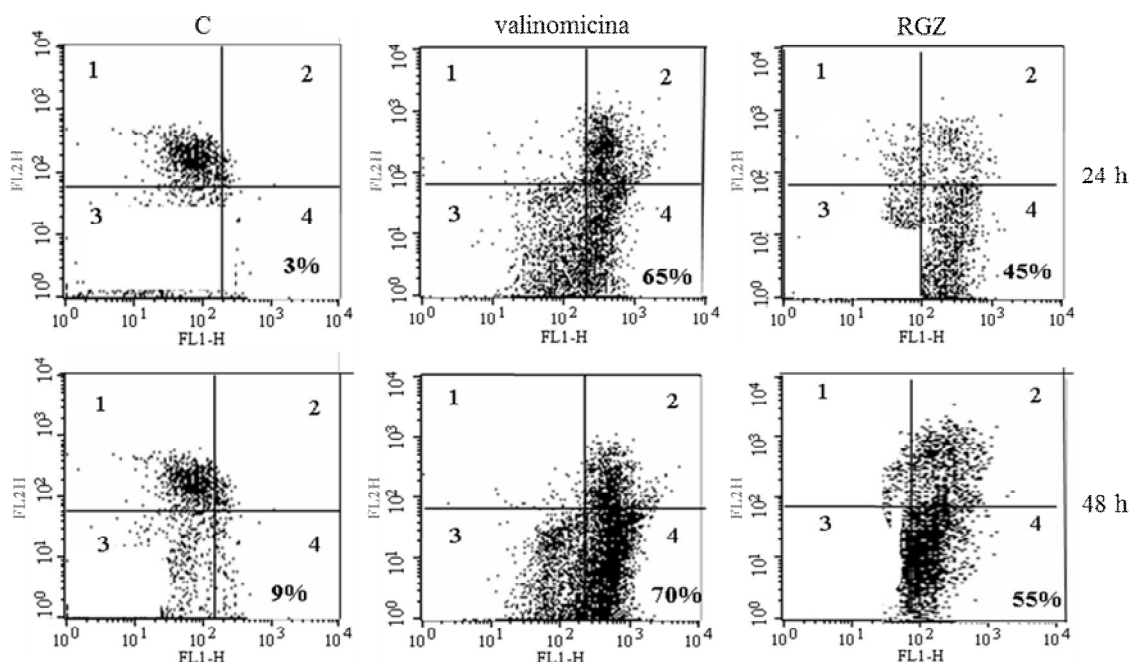


Figura 12. Le cellule della linea H295R trattate con rosiglitazone 20 μ M sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica dopo colorazione con la sonda JC-1, per valutare l'effetto del farmaco sul potenziale di membrana mitocondriale (ψ_m). Il segnale emesso dai mitocondri normalmente polarizzati è rappresentato nel quadrante 1 (fluorescenza verde e arancio-rossa), mentre la percentuale riportata nel quadrante 4 si riferisce alla porzione di cellule che emettono la sola fluorescenza verde, tipica dei mitocondri completamente depolarizzati. Tale percentuale aumenta significativamente nei campioni sottoposti al trattamento con rosiglitazone rispetto ai controlli.

Le immagini sono state elaborate utilizzando il *software* MODFIT e sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. La depolarizzazione indotta dal trattamento con valinomicina è stata utilizzata come controllo positivo per verificare la sensibilità di JC-1.

4.2. Miglioramento delle attuali strategie terapeutiche: ruolo di p53 nella risposta alla radioterapia

4.2.1. Analisi del gene *TP53*

Il gene onco-soppressore *TP53* risulta mutato in più del 50% dei tumori umani, compreso il carcinoma corticosurrenalico, dove alterazioni a carico di questo gene sono riscontrate nei pazienti affetti dalla sindrome di Li-Fraumeni e nel 25-70% dei tumori sporadici degli adulti (Libè *et al.*, 2007; Patalano *et al.*, 2009).

Lo stato del gene *TP53* è stato valutato nelle linee cellulari H295R e SW-13, derivanti da carcinoma corticosurrenalico umano. In passato, infatti, il nostro gruppo aveva identificato una importante delezione nel gene *TP53*, che interessa gli esoni 8 e 9, nella linea cellulare H295R (Cerquetti *et al.*, 2008). Tale delezione è invece assente nella linea SW-13, come verificato mediante sequenziamento genico e PCR (figura 13).



Figura 13. Il gene *TP53* presenta una importante delezione che interessa gli esoni 8 e 9 nelle cellule della linea H295R. La PCR effettuata a partire dal DNA di queste cellule, utilizzando coppie di *primers* intronici che appaiano fra gli esoni 7 e 8 (senso) e fra gli esoni 9 e 10 (antisenso), ha evidenziato l'assenza di questa regione nella linea H295R, che è invece presente nella linea SW-13. L'esone 5 del gene *TP53* è stato amplificato per verificare l'integrità del gene in seguito all'estrazione del DNA. L'immagine è rappresentativa di almeno tre esperimenti.

Per valutare l'effetto della delezione identificata nella linea H295R sulla produzione dell'mRNA di *TP53*, è stata effettuata l'analisi della *coding sequence* del gene. Il sequenziamento genico ha dimostrato che l'mRNA di *TP53* trascritto da queste cellule è più corto del normale, infatti l'esone 7 è immediatamente seguito dall'esone 10, indicando che la perdita degli esoni 8 e 9 altera la sequenza, ma non la stabilità, dell'mRNA del gene (figura 14.A, in alto). In accordo con tale risultato, l'RT-PCR condotta su queste cellule utilizzando dei *primers* fiancheggianti la regione degli esoni 8 e 9 ha evidenziato la presenza di un amplicone più corto del normale, che manca di 211 paia di basi (figura 14.B).

La perdita degli esoni 8 e 9 rappresenta una mutazione *frameshift* che determina un cambiamento nella sequenza aminoacidica di p53 a partire dal codone 261. Lo spostamento del codice di lettura, inoltre, provoca l'inserimento di un codone di stop prematuro in posizione 274 (figura 14.C, in alto). La proteina tradotta a partire da questo mRNA è pertanto una proteina trunca, il cui peso molecolare è di circa 44 kDa (figura 14.D).

Il sequenziamento della *coding sequence* di *TP53* nella linea cellulare SW-13 ha evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme nell'esone 6 (*r.577c>u*) (figura 14.A, in basso), che determina una sostituzione aminoacidica in posizione 193 (istidina > tirosina) (figura 14.C, in basso). Inoltre, in queste cellule è stata riscontrata la presenza di un polimorfismo in posizione 72 (*r.215c>g*) (figura 14.A, in basso), che provoca la sostituzione di una prolina con una arginina (figura 14.C, in basso). La proteina p53 in queste cellule ha un peso molecolare normale (figura 14.D) ed è over-espressa rispetto ad altre linee cellulari che esprimono la forma *wild type* di p53 (dati non mostrati).

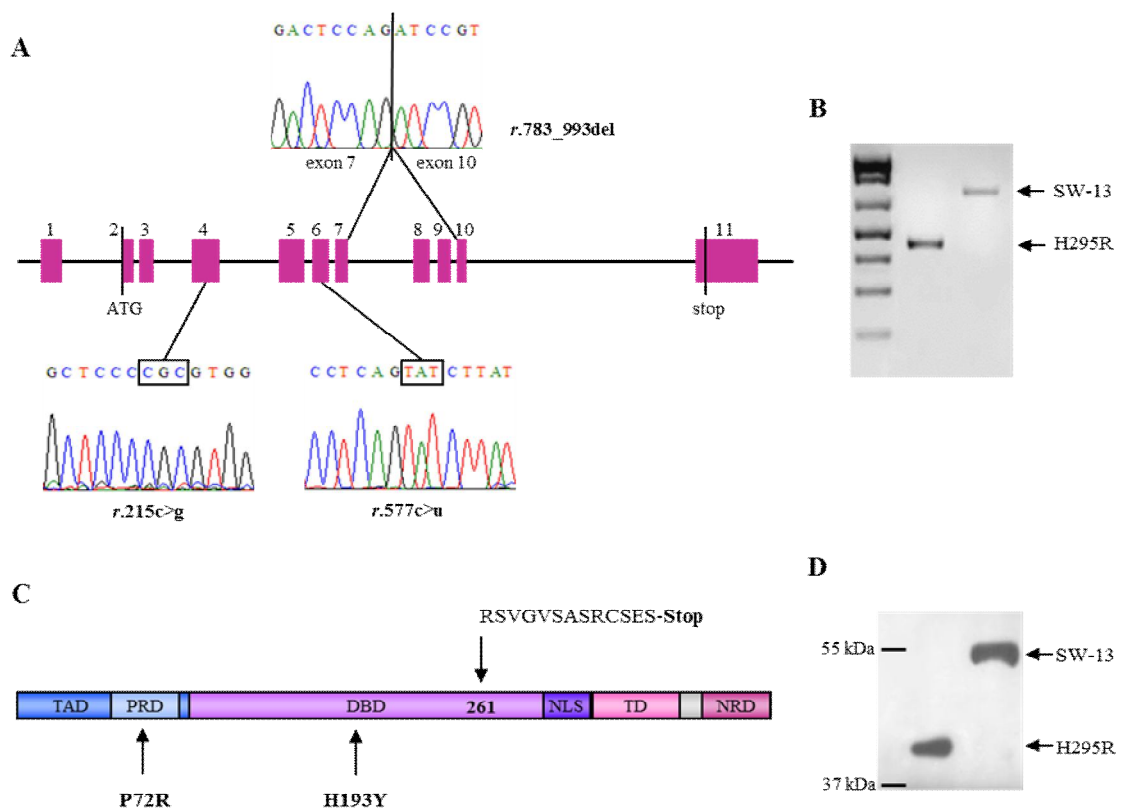


Figura 14. Il sequenziamento genico della sequenza codificante del gene *TP53* nelle cellule H295R e SW-13 ha evidenziato la presenza di una importante delezione nella linea H295R (A, in alto), che interessa 211 paia di basi. Nella linea SW-13 (A, in basso) è stata riscontrata la presenza di un polimorfismo nell'esone 4 (*r.215c>g*) e di una mutazione puntiforme nell'esone 6 (*r.577c>u*). L'RT-PCR condotta su queste linee cel-

lulari ha evidenziato la presenza di un prodotto più corto nella linea H295R, a causa della perdita degli esoni 8 e 9 del gene (B; *marker* 1Kb plus).

Sulla base dei risultati del sequenziamento genico è stata predetta la sequenza aminoacidica della proteina p53. Nella linea H295R, la delezione degli esoni 8 e 9 provoca uno slittamento del codice di lettura a partire dall'aminoacido 261, con la formazione di un codone di stop prematuro in posizione 274 (C, in alto). La proteina tradotta manca pertanto del dominio C-terminale e risulta più corta del normale, infatti il suo peso molecolare è di circa 44 kDa (D). Nella linea cellulare SW-13, la mutazione puntiforme riscontrata determina la sostituzione di un'istidina con una tirosina in posizione 193, nel sito di legame al DNA di p53 (C, in basso).

4.2.2. Effetto di p53 *wild type* sulla proliferazione cellulare e nella risposta alle radiazioni ionizzanti

Per determinare l'effetto delle mutazioni di *TP53* identificate nelle linee cellulari H295R e SW-13 sulla proliferazione cellulare, le cellule sono state trasfettate transientemente con il vettore pBABE-neo-p53, esprime la forma *wild type* del gene (WT). L'effetto sulla proliferazione è stato valutato a 24, 48 e 72 h dalla trasfezione, utilizzando come controllo cellule trasfettate con il vettore vuoto pBABE-neo (mock). L'effetto del ripristino di p53^{wt} è stato valutato anche in risposta all'irraggiamento, poiché entrambe le linee cellulari risultano resistenti al trattamento con radiazioni ionizzanti ad una dose di 6 Gy (Cerquetti *et al.*, 2008; Cerquetti *et al.*, 2010).

La stessa analisi è stata condotta anche sulla linea cellulare radioresistente SK-OV-3, che è stata utilizzata come controllo poiché queste cellule non esprimono la proteina p53 (Yaginuma e Westphal, 1992).

Nella linea cellulare H295R (figura 15.A), non è stato osservato un effetto significativo sulla proliferazione cellulare nei campioni esprimenti la forma *wild type* di p53 rispetto a quelli trasfettati con il vettore vuoto (-9% dopo 72 h), indicando che p53 da sola non è in grado di indurre un arresto della proliferazione in queste cellule. Inoltre, il trattamento con radiazioni ionizzanti non determina un'inibizione della proliferazione cellulare nei campioni trasfettati con il vettore vuoto (-4% dopo 72 dalla trasfezione). Al contrario, nei campioni in cui è stata over-espressa la forma *wild type* di *TP53*, l'effetto dell'irraggiamento sulla proliferazione cellulare risulta evidente a partire da 48 h dalla trasfezione (-18% rispetto ai campioni irraggiati trasfettati con il vettore vuoto; $p < 0,05$) e aumenta a 72 h (-25%; $p < 0,01$).

Nella linea cellulare SW-13 (figura 15.B) sono stati ottenuti dei risultati analoghi, infatti le cellule trasfettate con il vettore vuoto o con il vettore esprime p53^{wt} mostrano un tas-

so di proliferazione simile. Inoltre, anche in questo caso i campioni trasfettati con il vettore vuoto non risentono del trattamento con radiazioni ionizzanti. Quando in queste cellule è over-espressa la forma *wild type* di *TP53*, invece, si osserva un forte effetto sulla proliferazione cellulare (-28%; $p < 0,05$), che si evidenzia a partire da 48 h dalla trasfezione (24 h dall'irraggiamento) e che aumenta nel tempo, infatti dopo 48 h dall'irraggiamento le cellule trasfettate con pBABE-neo-p53 risultano inibite del 31% rispetto a quelle trasfettate con il vettore vuoto ($p < 0,01$).

Nelle cellule della linea SK-OV-3 (figura 15.C), l'effetto del ripristino di p53 sulla proliferazione cellulare è leggermente più forte rispetto alle linee H295R e SW-13, tuttavia l'inibizione della crescita non supera il 17% dopo 72 h dalla trasfezione. Al contrario, l'effetto delle radiazioni ionizzanti in queste cellule è piuttosto marcato ed è rilevabile a partire da 24 h dal trattamento (-27% nei campioni trasfettati con il vettore vuoto rispetto al controllo non irraggiato; $p < 0,05$). Tale effetto aumenta nel tempo, infatti dopo 48 h dall'irraggiamento le cellule risultano inibite del 35% ($p < 0,01$). Anche in questo caso, tuttavia, le cellule trasfettate con il vettore pBABE-neo-p53 risultano maggiormente inibite in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti (-20% rispetto ai campioni irraggiati trasfettati con il vettore vuoto dopo 24 h dal trattamento; $p < 0,01$) e tale effetto persiste fino alla fine dell'esperimento (-28%; $p < 0,01$).

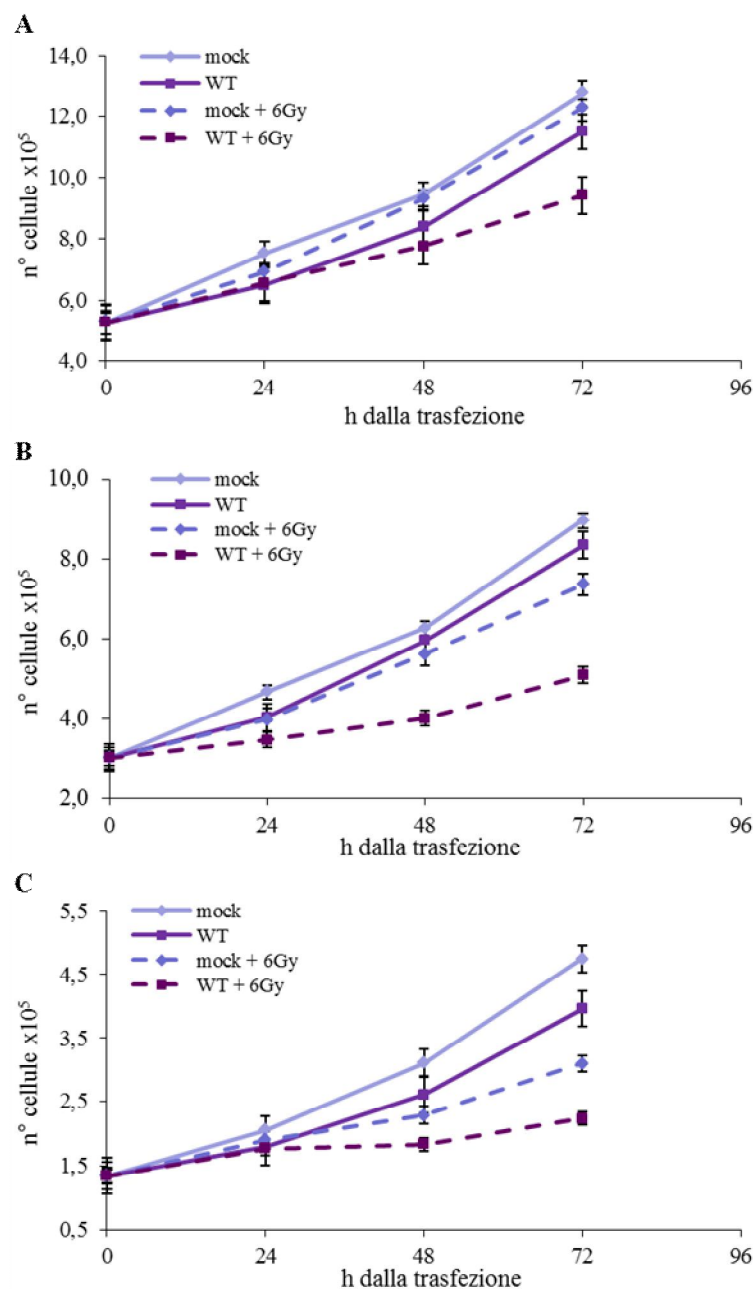


Figura 15. La proliferazione cellulare è stata valutata nelle cellule delle linee H295R (A), SW-13 (B) e SK-OV-3 (C) trasfettate con un vettore vuoto (mock) o con un vettore esprimente la forma *wild type* del gene *TP53* (WT), dopo 24, 48 e 72 h dalla trasfezione. Le stesse cellule sono state sottoposte anche al trattamento con radiazioni ionizzanti ad una dose di 6 Gy, dopo 24 ore dalla trasfezione con uno dei due vettori. Il ripristino della funzione di p53 non determina un effetto significativo sulla crescita cellulare, mentre la presenza di una p53 funzionale appare fondamentale nell'indurre un arresto della proliferazione in risposta all'irraggiamento. In tutte e tre le linee cellulari, l'effetto del trattamento si manifesta a partire da 48 h dalla trasfezione e aumenta a 72 h.

I risultati mostrati rappresentano la media $\pm$ D.S. di almeno tre esperimenti condotti in duplicato.

Questi risultati indicano che il ripristino dell'espressione di *TP53* nelle cellule delle linee H295R e SW-13 non è sufficiente per determinare un effetto significativo sulla proliferazione cellulare; tuttavia, la presenza della forma *wild type* di p53 appare fondamentale per la risposta alle radiazioni ionizzanti in queste cellule, infatti nei campioni trasfettati con il vettore vuoto l'effetto dell'irraggiamento è minimo, mentre le cellule esprimenti p53^{wt} risultano significativamente inibite in seguito al trattamento.

Nelle cellule SK-OV-3, l'effetto delle radiazioni ionizzanti è più forte rispetto alle altre linee cellulari, anche nei campioni trasfettati con il vettore vuoto, indicando che queste cellule sono più sensibili all'irraggiamento rispetto alle linee di carcinoma corticosurrenalico. Nonostante ciò, l'inibizione della proliferazione maggiore si osserva anche in questo caso nei campioni che esprimono la forma *wild type* di p53, indicando che questa proteina è coinvolta nella risposta alle radiazioni ionizzanti anche nelle cellule della linea SK-OV-3.

4.2.3. Effetto delle radiazioni ionizzanti sulla stabilizzazione di p53

I livelli di espressione di p53 sono stati valutati mediante RT-PCR e Western blotting dopo 72 h dalla trasfezione con il vettore vuoto (mock) o con il vettore pBABE-neo-p53 (WT) (48 h dall'irraggiamento) nelle cellule delle linee H295R, SW-13 e SK-OV-3, poiché l'effetto sulla proliferazione cellulare è risultato più forte a questo tempo per tutte e tre le linee.

L'RT-PCR ha confermato che il gene *TP53* è over-espresso in tutti i campioni trasfettati con il vettore pBABE-neo-p53, irraggiati e non. L'mRNA di *TP53* è espresso 5 volte di più rispetto ai campioni trasfettati con il vettore vuoto nelle cellule H295R (figura 16.A) e 3 volte di più nella linea SW-13 (figura 16.C). Nelle cellule SK-OV-3, invece, l'mRNA di *TP53* non è rilevabile nei campioni trasfettati con il vettore vuoto (figura 16.E), in accordo con quanto descritto da Yaginuma e Westphal (1992).

In tutte e tre le linee cellulari analizzate, comunque, i livelli di mRNA di *TP53* non risultano influenzati dal trattamento con radiazioni ionizzanti. Al contrario, i livelli della proteina p53 risultano significativamente maggiori nei campioni trasfettati con il vettore pBABE-neo-p53 sottoposti ad irraggiamento, rispetto ai non irraggiati. Nella linea cellulare H295R, infatti, i livelli di p53^{wt} aumentano di circa 3 volte in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti, mentre i livelli della proteina p53 mutata (p53^{Δ8-9}) non sono influenzati dall'irraggiamento (figura 16.B). Nella linea SW-13, è stato osservato un aumento dei livelli di p53 di 1,3 volte nei campioni trasfettati con pBABE-neo-p53 irraggiati rispetto a

quelli esprimenti la forma *wild type* di p53 non sottoposti al trattamento (figura 16.D). Nelle cellule della linea SK-OV-3, analogamente, i livelli di p53 risultano aumentati di 1,5 volte nei campioni irraggiati rispetto ai non trattati (figura 16.F).

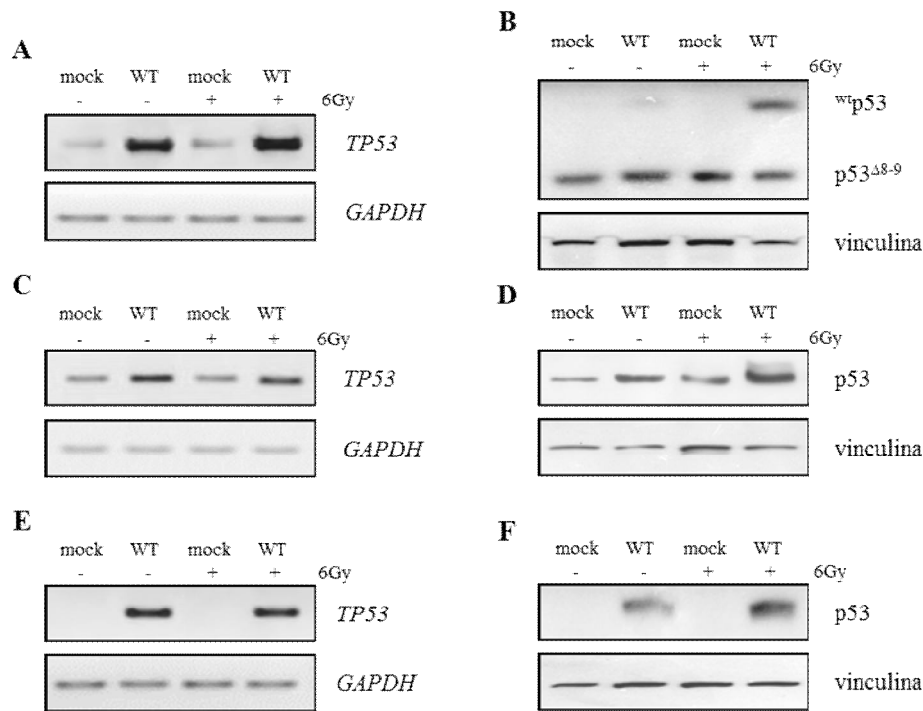


Figura 16. I livelli di espressione del gene *TP53* e della proteina p53 sono stati valutati mediante RT-PCR e Western blotting nelle cellule delle linee H295R (A,B), SW-13 (C,D) e SK-OV-3 (E,F) trasfettate con un vettore vuoto (mock) o esprimente p53^{wt} (WT), irraggiate e non. L'mRNA di *TP53* aumenta significativamente nei campioni trasfettati con il vettore pBABE-neo-p53, tuttavia non risulta modulato dal trattamento con radiazioni ionizzanti (A,C,E). Al contrario, i livelli della proteina p53 aumentano significativamente a seguito dell'irraggiamento, indicandone la stabilizzazione (B,D,F).

Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti indipendenti.

L'aumento dei livelli della proteina p53 osservato nei campioni sottoposti al trattamento con radiazioni ionizzanti non è dovuto ad un aumento nell'espressione di *TP53*, poiché i livelli di mRNA non appaiono influenzati dall'irraggiamento. Poiché l'attivazione di p53 in seguito ad uno stress genotossico determina la stabilizzazione della proteina ed il suo accumulo a livello citoplasmatico e nucleare (Millau *et al.*, 2009), l'aumento dei livelli di p53 rilevato in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti può essere interpretato come indicativo di un'attivazione della proteina e ciò spiegherebbe l'effetto sulla proliferazione cellulare osservato solo nei campioni sottoposti ad irraggiamento.

4.2.4. Valutazione della morte cellulare

Poiché p53 è un noto onco-soppressore, in grado di stimolare il processo apoptotico in risposta ad uno stress genotossico (Millau *et al.*, 2009), la presenza di apoptosi è stata valutata mediante saggio TUNEL nelle linee cellulari H295R, SW-13 e SK-OV-3 trasfettate con il vettore vuoto (mock) o con il vettore esprimente p53^{wt} (WT), irraggiate e non.

Come atteso, nei campioni non sottoposti al trattamento con radiazioni ionizzanti non è stato possibile rilevare la presenza di cellule apoptotiche, indipendentemente dallo stato di p53 (dati non mostrati). Analogamente, nei campioni trasfettati con il vettore vuoto e irraggiati la percentuale di apoptosi è risultata molto bassa; al contrario, le cellule esprimenti la forma *wild type* di p53 sono risultate positive alla colorazione con il TUNEL in seguito all'irraggiamento in tutte e tre le linee cellulari (figura 17.A), indicando che la presenza della proteina funzionale è necessaria per l'induzione della morte cellulare per apoptosi in risposta alla radioterapia.

La presenza di apoptosi è rilevabile a partire da 48 h dalla trasfezione con il costrutto esprimente p53^{wt} e aumenta dopo 72 h dalla trasfezione (48 h dall'irraggiamento) in tutte e tre le linee cellulari (figura 17.A,B). La percentuale di cellule apoptotiche nella linea H295R aumenta significativamente nelle cellule trasfettate con il vettore pBABE-neo-p53 rispetto ai campioni trasfettati con il vettore vuoto (di 3 volte a 48 h e di 4 volte a 72 h dalla trasfezione; $p < 0,05$) (figura 17.B). Analogamente, nella linea cellulare meno differenziata, SW-13, è stato osservato un aumento dell'apoptosi di 2 volte a 48 h dalla trasfezione ($p < 0,05$) e di 4 volte a 72 h ($p < 0,01$) nelle cellule irraggiate esprimenti p53^{wt} rispetto al controllo (figura 17.B).

Nella linea cellulare SK-OV-3, infine, il trattamento con una dose di radiazioni ionizzanti pari a 6Gy non appare in grado di indurre morte cellulare nei campioni trasfettati con il vettore vuoto, nonostante l'effetto precedentemente osservato sulla proliferazione cellulare, mentre nelle cellule esprimenti p53^{wt}, l'apoptosi aumenta di 2 volte a 48 h e di 3,5 volte a 72 h dalla trasfezione ($p < 0,05$) (figura 17.B).

Diversi studi hanno dimostrato che p53 è in grado di inibire l'espressione del gene anti-apoptotico *BCL2* in risposta ad uno stress genotossico (Haldar *et al.*, 1994; Miyashita *et al.*, 1994; Hemann e Lowe, 2006). Per questo motivo, sono stati condotti degli esperimenti di RT-PCR per valutare eventuali cambiamenti nei livelli di mRNA di *BCL2* in seguito all'irraggiamento nelle cellule trasfettate con il vettore vuoto (mock) o con il vettore pBABE-neo-p53.

In tutte e tre le linee cellulari considerate, è stata osservata una diminuzione nei livelli di espressione di *BCL2* nei campioni irraggiati solo quando era presente la forma *wild type* di p53, mentre l'mRNA del gene rimaneva costante nelle cellule trasfettate con il vettore vuoto. Compatibilmente con i risultati del saggio TUNEL, l'espressione di *BCL2* diminuisce a partire da 48 h dalla trasfezione con il vettore esprimente p53^{wt} e appare ulteriormente ridotta dopo 72 h (figura 17.C,D,E).

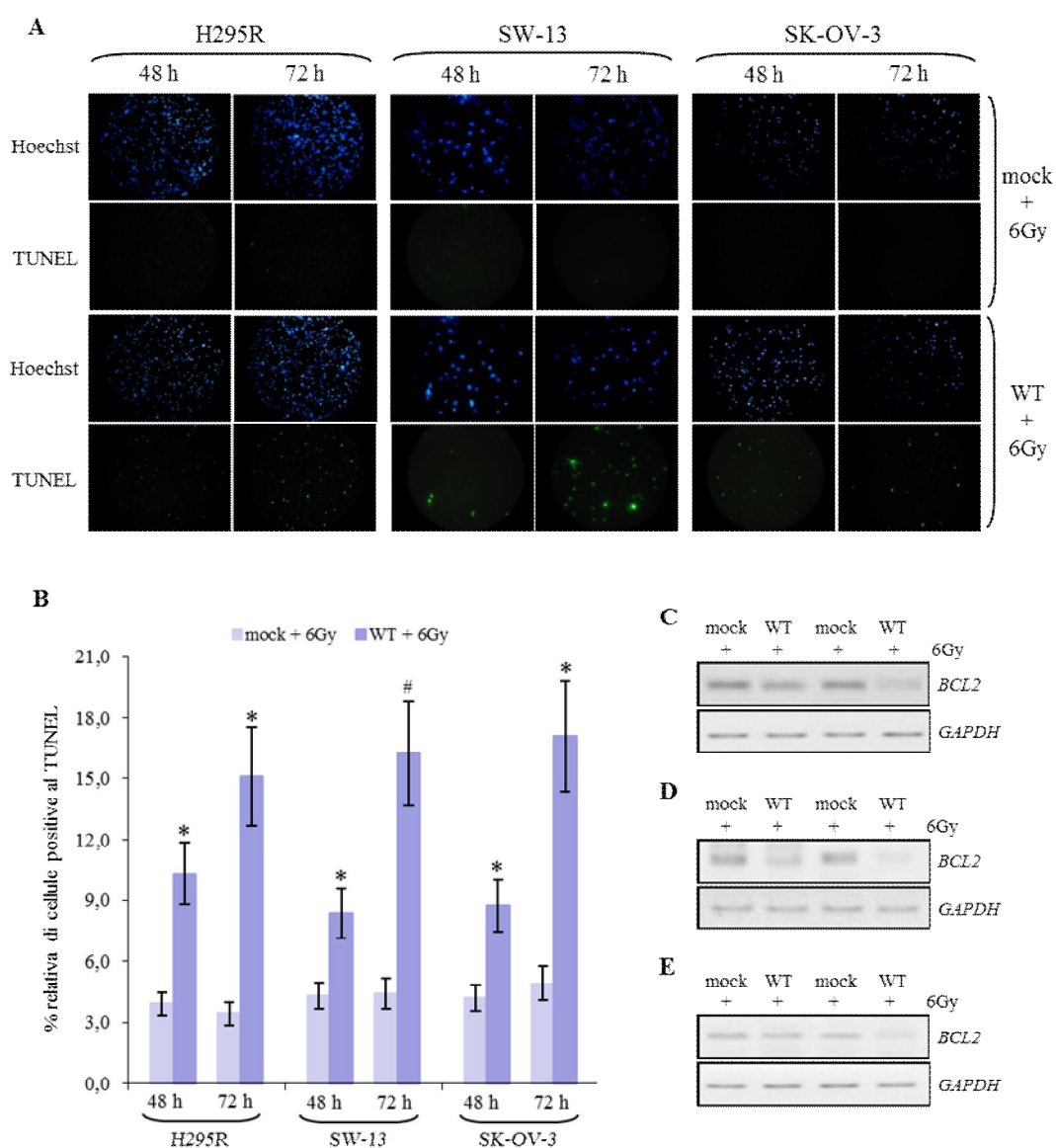


Figura 17. Le cellule delle linee H295R, SW-13 e SK-OV-3 trasfettate con i vettori pBABE-neo (mock) o pBABE-neo-p53 (WT) e sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti alla dose di 6 Gy sono state analizzate mediante saggio TUNEL per valutare la presenza di apoptosi (A) (n=6). La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata comparando le cellule positive al TUNEL (nuclei verdi) con le cellule totali, colo-

rate con Hoechst 33342 (nuclei blu). In tutte e tre le linee considerate, la percentuale di apoptosi aumenta significativamente nelle cellule esprimenti p53^{wt}, rispetto a quelle trasfettate con il vettore vuoto (B). Tale effetto è visibile a partire da 48 h dalla trasfezione e aumenta nel tempo (A,B). L'effetto del ripristino di p53 sull'espressione del gene anti-apoptotico *BCL2* è stata valutata nelle cellule H295R (C), SW-13 (D) e SK-OV-3 (E) mediante RT-PCR. In tutte e tre le linee considerate, è stata osservata una significativa diminuzione nei livelli di mRNA di *BCL2* in seguito all'irraggiamento nei campioni esprimenti la forma *wild type* di p53 e tale effetto aumenta nel tempo.

Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti. (*, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$)

Questi risultati confermano quindi che la presenza della forma *wild type* di p53 è necessaria per l'induzione dell'apoptosi e l'inibizione di *BCL2* in risposta all'irraggiamento nelle linee cellulari H295R e SW-13. I risultati relativi alla morte cellulare e all'espressione di *BCL2* nei campioni trasfettati con il vettore vuoto, inoltre, sono comparabili con quelli ottenuti nella linea SK-OV-3, indicando che i mutanti di p53 espressi nelle cellule H295R e SW-13 costituiscono delle forme non funzionali della proteina, che non vengono influenzate dal trattamento con le radiazioni ionizzanti.

4.2.5. Effetto sull'espressione di *IGF2*

IGF-II costituisce il principale *marker* di malignità nei tumori della corteccia surrenale (Gicquel *et al.*, 2001; de Reyniès *et al.*, 2009) e la sua espressione è altamente regolata da p53 (Zhang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2005). Poiché nelle linee cellulari derivanti da carcinoma corticosurrenalico, H295R e SW-13, p53^{wt} risulta in grado di inibire la proliferazione cellulare e indurre apoptosi in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti, l'effetto dell'attivazione di p53 sull'espressione di *IGF2* è stato valutato in queste cellule.

L'analisi di RT-PCR ha dimostrato che nella linea cellulare H295R il trattamento con radiazioni ionizzanti non determina una variazione dei livelli di mRNA di *IGF2* nei campioni trasfettati con il vettore vuoto. Al contrario, nelle cellule esprimenti la forma *wild type* di *TP53*, l'espressione di *IGF2* si riduce a partire da 48 h dalla trasfezione (24 h dall'irraggiamento) e diminuisce ulteriormente a 72 h dalla trasfezione (-42%; $p < 0,01$) (figura 18.A).

Nella linea cellulare SW-13, il gene *IGF2* è espresso in misura notevolmente inferiore rispetto alla linea H295R (dati non mostrati). Nonostante ciò, anche in questo caso l'over-espressione di p53^{wt} determina una significativa diminuzione nei livelli di mRNA di *IGF2*, che risulta più forte a 72 h dalla trasfezione (-35%; $p < 0,05$). Come atteso, inoltre, il tratta-

mento con radiazioni ionizzanti non influenza l'espressione di *IGF2* nei campioni trasfettati con il vettore vuoto (figura 18.B).

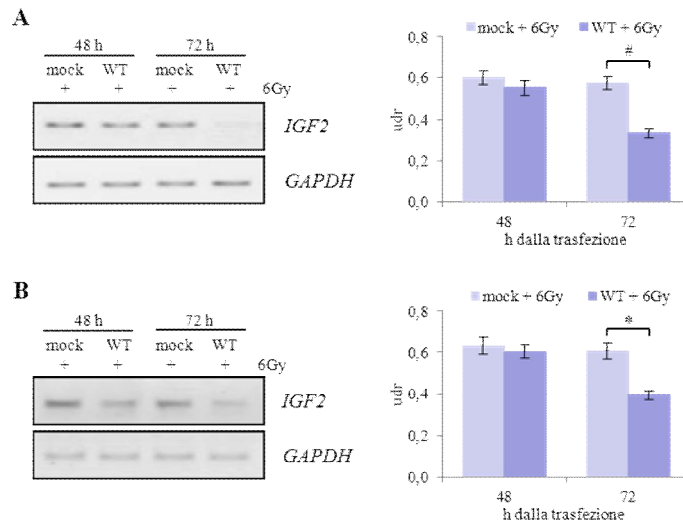


Figura 18. I livelli di espressione di *IGF2* sono stati valutati nelle cellule delle linee H295R (A) e SW-13 (B) sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti alla dose di 6 Gy dopo 48 e 72 h dalla trasfezione con il vettore vuoto (mock) o con il vettore esprime la forma *wild type* di *TP53* (WT). In entrambe le linee cellulari, l'mRNA di *IGF2* appare fortemente diminuito nei campioni in cui è stata reintrodotta $p53^{wt}$, mentre si mantiene costante nei campioni trasfettati con il vettore vuoto. L'effetto si manifesta a partire da 48 h e aumenta nel tempo.

Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti indipendenti. (*, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$)

4.2.6. Effetto sull'attivazione di Akt

La proteina Akt (o PKB, Protein Chinasi B) è un fattore anti-apoptotico che risulta frequentemente iper-attivato nei tumori e rappresenta uno dei principali mediatori della via di trasduzione del segnale mediata da IGF-II. Akt risulta costitutivamente attiva nel carcinoma corticosurrenalico, probabilmente a causa dell'over-espressione di *IGF2* (Fassnacht *et al.*, 2005; Barlasakar *et al.*, 2009). Considerato l'effetto inibitorio di $p53^{wt}$ sull'espressione di *IGF2*, l'effetto del ripristino di p53 sull'attivazione di Akt in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti è stato valutato nelle linee cellulari H295R e SW-13.

I livelli della proteina Akt e della sua forma attiva, fosforilata in serina 473, sono stati valutati tramite Western blotting nei campioni trasfettati con il vettore vuoto (mock) o con il vettore pBABE-neo-p53 (WT) in seguito ad irraggiamento. In entrambe le linee cellulari, H295R (figura 19.A) e SW-13 (figura 19.B), il segnale relativo alla forma fosforilata di

Akt è apparso diminuito in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti nei campioni esprimenti p53^{wt}, rispetto ai campioni trasfettati con il vettore vuoto. Tale effetto è evidente a partire da 48 h dalla trasfezione (-16% nella linea H295R e -17% nella linea SW-13; p<0,05) ed aumenta a 72 h dalla trasfezione (-53% nella linea H295R e -51% nella linea SW-13; p<0,01), in accordo con gli effetti osservati sulla proliferazione cellulare e l'apoptosi.

Questi risultati indicano quindi che l'attivazione di p53 a seguito del trattamento con radiazioni ionizzanti è in grado di inibire Akt, attraverso un meccanismo che ne impedisce la fosforilazione e la conseguente attivazione, piuttosto che l'espressione, infatti in tutti i campioni è riscontrabile la presenza della proteina Akt, i cui livelli non vengono influenzati dall'irraggiamento né dallo stato di p53 (figura 19.A,B).

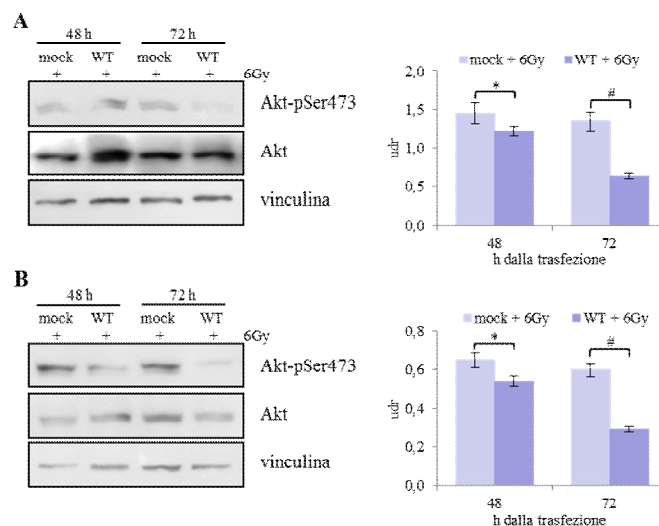


Figura 19. I livelli della proteina Akt e della sua forma attiva, Akt-pSer473, sono stati analizzati mediante Western blotting nelle cellule delle linee H295R (A) e SW-13 (B) sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti, dopo 48 e 72 h dalla trasfezione con un vettore vuoto (mock) o un vettore esprimente p53^{wt}. Akt è presente in tutti i campioni e la sua espressione non risulta alterata dall'irraggiamento, indipendentemente dallo stato di p53. Al contrario, i livelli di fosforilazione della proteina diminuiscono in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti nei campioni trasfettati con il vettore pBABE-neo-p53, indicando che p53^{wt} è in grado di impedire l'attivazione di Akt in risposta all'irraggiamento in entrambe le linee cellulari. Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti indipendenti. (*, p<0,05; #, p<0,01)

4.2.7. Effetto di p53^{wt} su HIF-1 α

I tumori maligni della corteccia surrenalica sono caratterizzati dall'over-espressione di alcuni fattori di crescita, tra cui *VEGF*, la cui espressione è stimolata dal fattore indotto

dall'ipossia, HIF-1 (Lee *et al.*, 2004; Libè *et al.*, 2007; Weidemann e Johnson, 2008). L'attivazione della subunità α di HIF-1 è stimolata dalla via di trasduzione del segnale di IGF-II e Akt, mentre è inibita da p53 (Feldser *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Fels e Koumenis, 2005; Yamakuchi *et al.*, 2010).

La regolazione di HIF-1 α nel carcinoma corticosurrenalico è tuttora sconosciuta, pertanto lo stato di questa proteina è stato valutato nelle linee cellulari H295R e SW-13. L'analisi per immunofluorescenza condotta su queste cellule ha evidenziato la presenza di HIF-1 α in entrambe le linee cellulari (figura 20.A). Inoltre, esso appare localizzato prevalentemente nel nucleo, suggerendone quindi l'attivazione, infatti in condizioni normali HIF-1 α è sottoposto ad una rapida degradazione a livello citoplasmatico, mentre durante l'ipossia esso viene attivato e trasloca nel nucleo, dove induce la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare (Lee *et al.*, 2004; Weidemann e Johnson, 2008).

L'analisi per Western blotting, condotta su estratti proteici nucleari e citoplasmatici delle linee H295R e SW-13, ha confermato la presenza di HIF-1 α nel nucleo di queste cellule, mentre il segnale a livello citoplasmatico non appare rilevabile (figura 20.B).

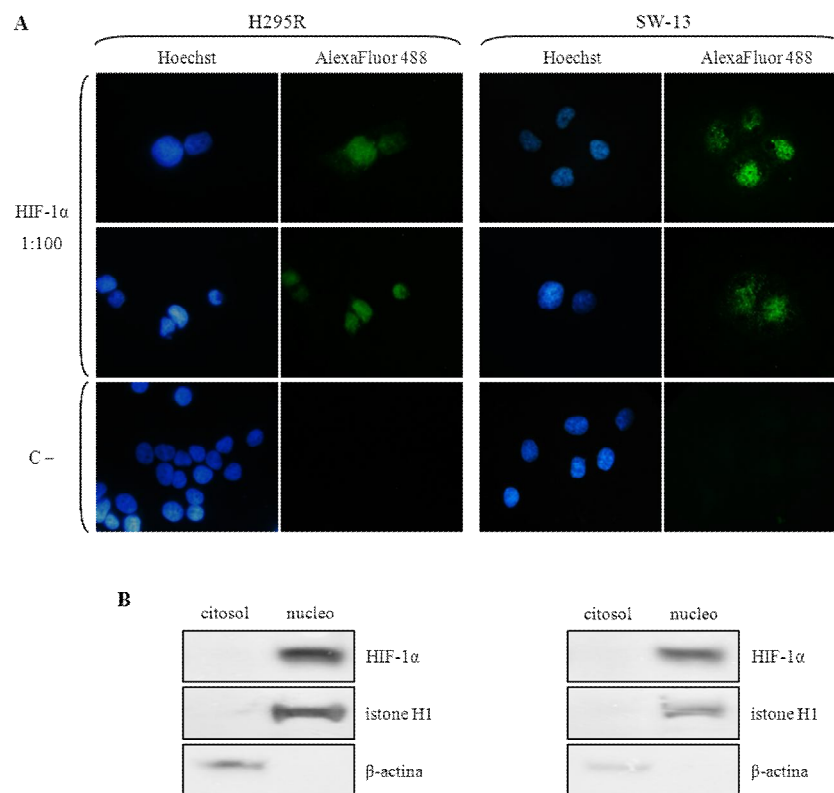


Figura 20. Analisi dello stato di HIF-1 α nelle cellule H295R e SW-13, valutato per immunofluorescenza (A) e Western blotting (B). Le immagini mostrano la presenza di un segnale per HIF-1 α in entrambe le linee cel-

lulari, localizzato prevalentemente a livello del nucleo, indicando che in queste cellule il meccanismo di regolazione di HIF-1 α è perso, consentendo l'attivazione e l'accumulo di questo fattore nel nucleo.

Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti in duplicato.

In precedenza è stato dimostrato come nelle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico il trattamento con radiazioni ionizzanti sia in grado di attivare la proteina p53^{wt}, inducendo arresto della proliferazione e morte cellulare per apoptosi. Il ripristino di p53 determina inoltre una diminuzione nei livelli di espressione di *IGF2*, uno dei principali attivatori di HIF-1 α . Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che p53 è in grado di indurre un effetto inibitorio diretto su HIF-1 α , impedendone l'attivazione (Fels e Koumenis, 2005; Yamakuchi *et al.*, 2010).

Le cellule delle linee H295R e SW-13 sono state pertanto sottoposte ad analisi per immunofluorescenza diretta contro HIF-1 α in seguito alla trasfezione con un vettore vuoto (mock) o con un vettore esprimente p53^{wt} (WT) ed al trattamento con radiazioni ionizzanti. Lo scopo di tale indagine era quello di valutare la capacità di p53^{wt} di bloccare l'attivazione di HIF-1 α , impedendone quindi la traslocazione a livello nucleare e provocandone l'accumulo a livello citoplasmatico, dove HIF-1 α viene poli-ubiquitinato e successivamente degradato a livello proteasomico.

Diversamente da quanto atteso, tuttavia, l'analisi per immunofluorescenza ha evidenziato che l'attivazione di p53^{wt} non causa un cambiamento nella localizzazione di HIF-1 α ; al contrario, è stata osservata una notevole riduzione del segnale di HIF-1 α in entrambe le linee cellulari (figura 21), suggerendo quindi che p53 sia in grado di inibire l'espressione di HIF-1 α , oltre che la sua attivazione.

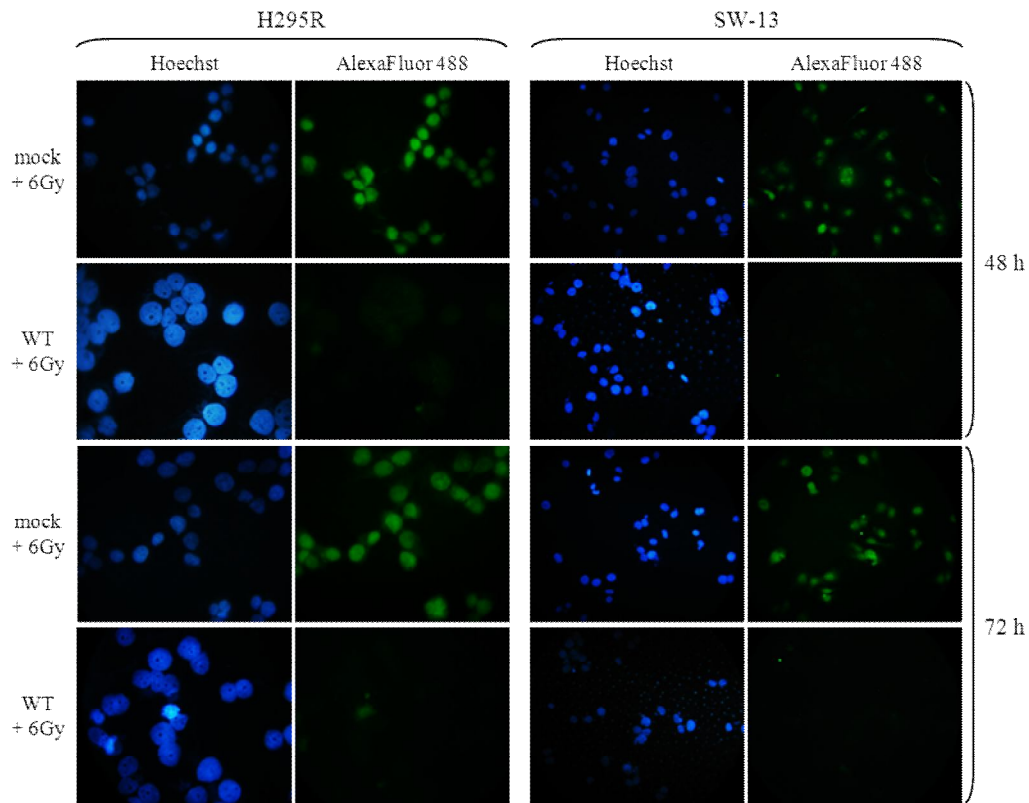


Figura 21. L'analisi per immunofluorescenza condotta sulle cellule delle linee H295R e SW-13 ha evidenziato che la trasfezione di $p53^{wt}$ (WT) ed il successivo trattamento con radiazioni ionizzanti determina una riduzione del segnale relativo ad HIF-1 α a partire da 48 h dalla trasfezione, mentre nei campioni trasfettati con il vettore vuoto (mock), HIF-1 α è fortemente espresso e risulta localizzato prevalentemente a livello nucleare.

Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti, condotti in duplicato.

A conferma di ciò, le cellule delle linee H295R e SW-13 trasfettate con i vettori pBABE-neo (mock) e pBABE-neo-p53 (WT) ed irraggiate sono state sottoposte ad analisi tramite RT-PCR, per valutare l'effetto dell'attivazione di $p53^{wt}$ sull'espressione e l'attività trascrizionale di HIF-1 α .

Nelle cellule della linea H295R (figura 22.A), la reintroduzione di $p53^{wt}$ determina una riduzione nei livelli di espressione di *HIF-1 α* in seguito all'irraggiamento, a partire da 48 h dalla trasfezione (-22%; $p < 0,05$) e tale effetto aumenta nel tempo (-63% a 72 h; $p < 0,01$). La riduzione di *HIF-1 α* è associata ad una diminuzione nei livelli di espressione di *VEGF-A*, uno dei suoi principali bersagli trascrizionali. L'effetto sull'espressione di *VEGF-A* è evidente a partire da 48 h dalla trasfezione di *TP53* (-25%; $p < 0,05$) e aumenta a 72 h dalla trasfezione (-64%; $p < 0,01$).

Nella linea cellulare SW-13 (figura 22.B), analogamente, i livelli di espressione di *HIF-1α* e *VEGF-A* appaiono diminuiti nei campioni trasfettati con il vettore esprimente la forma *wild type* di *TP53* rispetto ai campioni di controllo. L'effetto di $p53^{wt}$ su *HIF-1α* è molto forte già a partire da 48 h dalla trasfezione (-52%; $p<0,01$) e si mantiene costante fino a 72 h (-55%; $p<0,01$). Similmente, l'effetto su *VEGF-A* è evidente a partire da 48 h (-37%; $p<0,01$) e aumenta nel tempo (-43%; $p<0,01$).

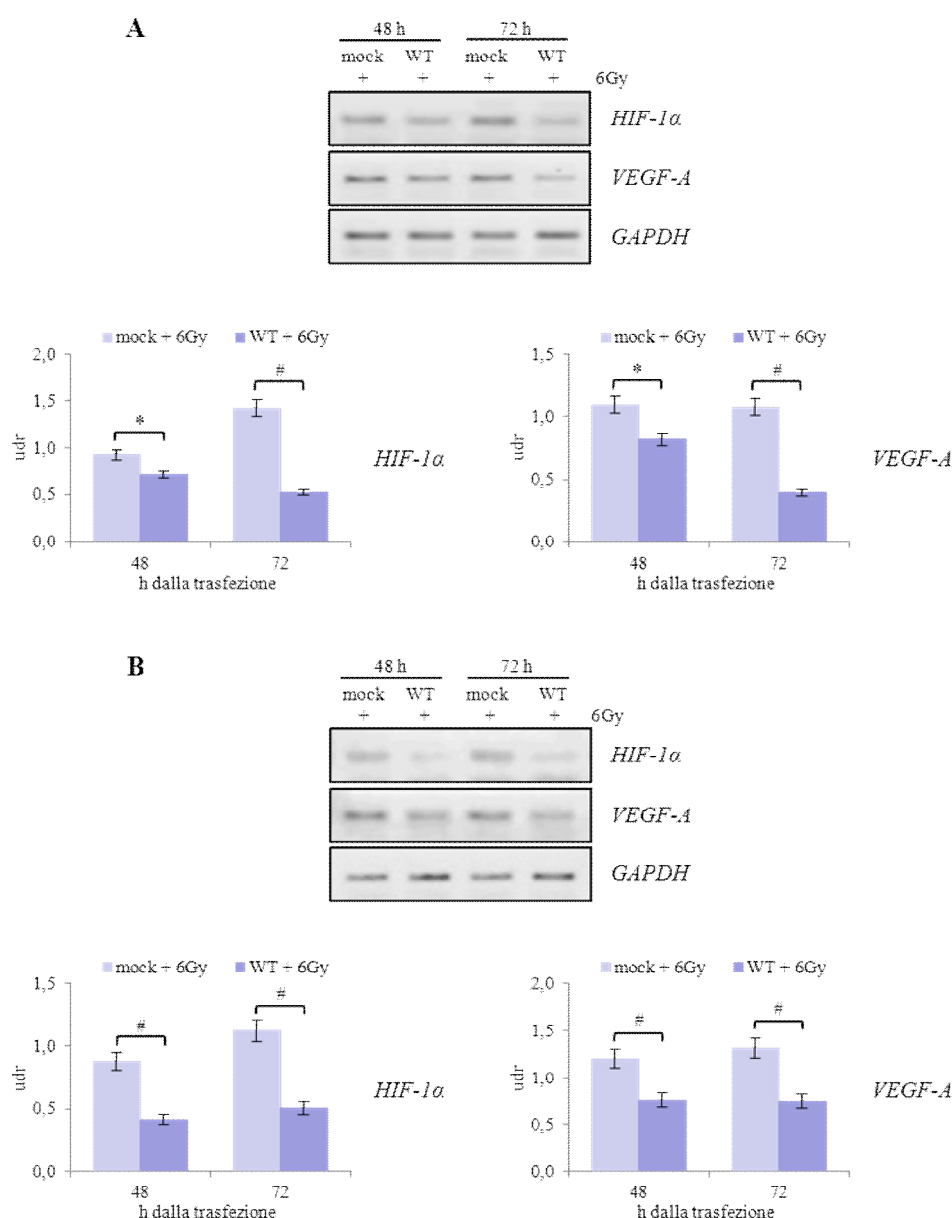


Figura 22. L'effetto di $p53^{wt}$ sull'espressione di *HIF-1α* e *VEGF-A* è stato valutato nelle cellule delle linee H295R (A) e SW-13 (B) sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti. L'analisi per RT-PCR ha dimostrato che in entrambe le linee cellulari l'attivazione di $p53$ in seguito all'irraggiamento determina una dimi-

nuzione nei livelli di espressione di *HIF-1 α* , a partire da 48 h dalla trasfezione (24 h dall'irraggiamento), e che tale effetto aumenta nel tempo. L'inibizione di *HIF-1 α* è associata ad una riduzione nei livelli di espressione di *VEGF-A*, uno dei suoi principali bersagli trascrizionali.

I dati mostrati rappresentano la media $\pm$ D.S. di almeno tre esperimenti indipendenti. (*, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$)

Questi risultati indicano pertanto che l'attivazione di p53 a seguito del trattamento con radiazioni ionizzanti è in grado di reprimere l'espressione di *HIF-1 α* nelle due linee cellulari derivate da carcinoma corticosurrenalico, determinando inoltre una significativa riduzione nei livelli di espressione di *VEGF-A*, uno dei principali fattori di crescita over-espressi in questo tipo di neoplasia.

5. Discussione

Il lavoro svolto durante il periodo di Dottorato di Ricerca è stato finalizzato all'approfondimento delle attuali conoscenze relative alle possibili strategie terapeutiche per la cura del carcinoma corticosurrenalico, attraverso due diversi tipi di approccio: da un lato, l'identificazione di una nuova opzione terapeutica basata sull'impiego di un farmaco, il rosiglitazone, normalmente utilizzato per la cura del diabete mellito di tipo 2, la cui efficacia anti-neoplastica è già stata dimostrata in altri tipi di cancro; dall'altro, il miglioramento delle attuali terapie in uso per il carcinoma corticosurrenalico, in particolare la radioterapia.

Il rosiglitazone è un ligando di PPAR- γ appartenente alla famiglia dei tiazolidinedioni. La scelta di questa molecola come potenziale farmaco anti-tumorale nei casi di carcinoma corticosurrenalico deriva dall'osservazione che gli agonisti di PPAR- γ sono in grado di indurre morte cellulare in diversi tipi di cancro (Kubota *et al.*, 1998; Heaney *et al.*, 2003; Pérez-Ortiz *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Copland *et al.*, 2006; Han e Roman, 2006; Weng *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). L'espressione di PPAR- γ è stata dimostrata in una casistica di carcinomi corticosurrenalici e nella linea cellulare H295R (Betz *et al.*, 2005; Ferruzzi *et al.*, 2005), inoltre l'inibizione della proliferazione indotta dai tiazolidinedioni in modelli cellulari di ACC è stata precedentemente osservata da altri autori, tuttavia il meccanismo d'azione degli agonisti di PPAR- γ nell'ambito di questa neoplasia non è ancora stato del tutto chiarito (Betz *et al.*, 2005; Ferruzzi *et al.*, 2005; Cantini *et al.*, 2008).

Nel corso dello studio, l'effetto del rosiglitazone è stato valutato in due modelli cellulari di carcinoma corticosurrenalico, H295R e SW-13. Il farmaco è risultato in grado di inibire la proliferazione cellulare in entrambe le linee e di indurre l'attivazione di PPAR- γ , mentre la somministrazione dell'antagonista di PPAR- γ GW9662 determina una riduzione dei livelli del recettore, sia rispetto ai campioni di controllo, sia rispetto alle cellule trattate con il rosiglitazone.

Il trattamento con GW9662 in combinazione con il rosiglitazone, tuttavia, non è in grado di contrastare completamente l'effetto del farmaco, infatti nella linea cellulare H295R è stata osservata una parziale ripresa della crescita cellulare, che tuttavia risulta inibita rispetto ai campioni di controllo. Nelle cellule della linea SW-13, al contrario, il trattamento con i due farmaci in combinazione determina un effetto sulla proliferazione del tutto simile a

quello indotto dal solo rosiglitazone. Tali risultati indicano quindi che il rosiglitazone agisce nei due diversi modelli cellulari attraverso meccanismi molecolari indipendenti da PPAR- γ , nonostante l'effetto stimolante esercitato su questo recettore.

La capacità del rosiglitazone di esercitare un effetto anti-tumorale attraverso vie di trasduzione del segnale indipendenti da PPAR- γ è stata dimostrata in diversi modelli di cancro. Esperimenti condotti su linee cellulari che esprimono bassi livelli di PPAR- γ , quali LNCaP, derivanti da carcinoma prostatico, e MCF7, originarie da carcinoma della mammella, hanno infatti dimostrato che queste cellule sono più sensibili al trattamento con tiazolidinedioni rispetto ad altre linee cellulari derivate dagli stessi tumori, PC3 e MDA-MB-321, che presentano elevati livelli di PPAR- γ (Huang *et al.*, 2005; Shiau *et al.*, 2005). Gli effetti PPAR- γ -indipendenti dei tiazolidinedioni riscontrati *in vitro* sono inoltre molteplici e differiscono a seconda del modello cellulare considerato (Brunmair *et al.*, 2004; Han e Roman, 2006; LeBrasseur *et al.*, 2006).

In accordo con altri autori (Lu *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2006), il rosiglitazone appare in grado di indurre una de-regolazione del ciclo cellulare nella linea cellulare SW-13, che comporta un blocco di queste cellule nella fase G₀/G₁. Tale effetto è correlato con un abbassamento dei livelli della ciclina E e di Cdk2, che determina una minore attività del complesso ciclina-chinasi, come dimostrato dalla riduzione nei livelli di fosforilazione della proteina Rb.

L'effetto del trattamento sul ciclo cellulare nelle cellule SW-13 è correlato con una forte inibizione della proliferazione cellulare, tuttavia non appare sufficiente per indurre morte cellulare. Nella linea cellulare H295R, invece, il rosiglitazone è in grado di stimolare il processo di morte cellulare per autofagia, che appare evidente ad una analisi ultrastrutturale di queste cellule. Le analisi di Western blotting e immunofluorescenza condotte per valutare l'effetto del farmaco sulle diverse proteine coinvolte nel processo di autofagia hanno confermato che il rosiglitazone esercita un effetto di stimolazione sulla via di segnalazione che conduce alla morte cellulare, attraverso un meccanismo molecolare che coinvolge la proteina AMPK.

La protein-chinasi attivata dall'AMP, AMPK, è un fattore fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi energetica, che viene attivato in risposta ad un cambiamento nelle condizioni metaboliche cellulari (Rutter *et al.*, 2003). AMPK è in grado di attivare diverse vie di segnalazione intracellulare, che possono condurre alla morte cellulare per apoptosi o

per autofagia, e rappresenta pertanto un importante regolatore di questi due processi (Liang *et al.*, 2007).

L'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello intracellulare costituisce uno stress che provoca la riduzione dei livelli di ATP, determinando in questo modo l'attivazione di AMPK (Son *et al.*, 2011). I tiazolidinedioni sono in grado di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004) e l'analisi citofluorimetrica condotta nella linea H295R ha confermato che il rosiglitazone è in grado di stimolare l'accumulo di ROS in queste cellule in modo tempo-dipendente e che tale effetto determina un aumento dello stress ossidativo tale da indurre la depolarizzazione della membrana mitocondriale.

Sulla base di questi risultati, il meccanismo d'azione del rosiglitazone nelle cellule della linea H295R appare quindi mediato da AMPK, la cui attivazione, a seguito di uno stress ossidativo che comporta l'accumulo intracellulare di ROS e la depolarizzazione della membrana mitocondriale, provoca l'innescio del processo autofagico, che culmina nella morte programmata di queste cellule.

Sulla base degli effetti osservati, appare evidente che ulteriori indagini atte a chiarire i motivi per cui il rosiglitazone induce effetti diversi nelle cellule delle linee H295R e SW-13 sono necessarie. I risultati ottenuti finora, tuttavia, dimostrano che il rosiglitazone è in grado di indurre un effetto anti-tumorale in entrambe queste linee cellulari.

Per la prima volta, inoltre, è stato dimostrato che il rosiglitazone induce morte cellulare per autofagia nelle cellule della linea H295R ed è stato confermato il processo di deregolazione del ciclo cellulare nella linea SW-13. La capacità del farmaco di indurre un effetto anti-proliferativo su linee cellulari derivate da diversi stadi tumorali e con un profilo genetico differente rappresenta un dato importante, suggerendo un potenziale utilizzo terapeutico del rosiglitazone nei casi di carcinoma corticosurrenalico.

Uno dei più forti limiti all'applicabilità clinica della terapia con il rosiglitazone è rappresentato dall'osservazione che dosi elevate di questo farmaco possono indurre gravi effetti collaterali, soprattutto a livello del sistema cardiovascolare (Ciudin *et al.*, 2012). Nonostante attualmente siano in atto dei *trials* clinici basati sull'uso di molecole che mimano l'effetto del rosiglitazone sull'insulino-resistenza e la risposta infiammatoria, non esistono al momento dati sull'efficacia di questi composti nella terapia anti-tumorale (Yew *et al.*, 2011; Ciudin *et al.*, 2012). Il potenziale utilizzo di questi farmaci nel trattamento del can-

cro rappresenta tuttavia una interessante prospettiva da approfondire nell'ambito dello studio di nuove terapie anti-tumorali.

La tossicità indotta dal trattamento farmacologico e chemioterapico rappresenta uno dei maggiori problemi riscontrati nella cura del carcinoma corticosurrenalico. La terapia adiuvante per questa neoplasia è infatti prevalentemente basata sull'utilizzo del mitotano e di altri chemioterapici. Nonostante questi farmaci possiedano una certa efficacia terapeutica, il loro utilizzo è fortemente limitato dall'insorgenza di gravi effetti collaterali, che spesso richiedono la sospensione del trattamento (Alloio e Fassnacht, 2006; Libè *et al.*, 2007).

La radioterapia, al contrario, determina degli effetti collaterali notevolmente minori e potrebbe pertanto rappresentare una valida alternativa alla terapia farmacologica e con chemioterapici. Ciononostante, il trattamento con radiazioni ionizzanti non viene intrapreso frequentemente, a causa dell'elevata variabilità osservata nella risposta in diversi gruppi di pazienti, e fino a qualche tempo fa, il carcinoma corticosurrenalico era considerato un tumore radio-resistente (Fassnacht *et al.*, 2006; Patalano *et al.*, 2009). Recentemente, la validità della radioterapia nei casi di carcinoma corticosurrenalico è stata dimostrata in diversi studi, tuttavia molti autori concordano nel rimarcare la necessità di identificare dei fattori predittivi che consentano di discriminare i pazienti idonei ad intraprendere questo tipo di trattamento da quelli per i quali è invece sconsigliabile (Fassnacht *et al.*, 2006; Polat *et al.*, 2009).

Lo scopo di questo studio era pertanto quello di identificare dei possibili marcatori molecolari che consentano di predire l'esito del trattamento radioterapico, al fine di favorire la prognosi e le condizioni di vita dei pazienti. Considerato l'importante ruolo dell'oncosoppressore p53 nella risposta cellulare al danno al DNA indotto da radiazioni, è stato ipotizzato che questo fattore potesse rappresentare uno di questi marcatori.

La proteina p53 è un fattore di fondamentale importanza per processi cellulari quali la regolazione del ciclo cellulare, la riparazione del danno al DNA e l'apoptosi. Essa è codificata dal gene *TP53*, che risulta frequentemente mutato in molti tipi di tumore (Levine *et al.*, 2006; Römer *et al.*, 2006; Millau *et al.*, 2009). Molti studi riportano una associazione tra mutazioni del gene *TP53* e la radio-resistenza di alcune linee cellulari (McIlwrath *et al.*, 1994; Bristow *et al.*, 1996; Gallardo *et al.*, 1996; Concin *et al.*, 2000). Poiché tuttavia non esistono dati relativi alla correlazione tra lo stato di *TP53* e l'efficacia della radioterapia nel carcinoma corticosurrenalico, in questo studio è stato valutato il ruolo di p53 nella risposta alla radioterapia in due linee cellulari derivanti da questo tumore.

Le linee cellulari H295R e SW-13 presentano entrambe mutazioni nel gene *TP53*. La delezione degli esoni 8 e 9 del gene, presente nella linea H295R, era già stata precedentemente descritta dal nostro gruppo (Cerquetti *et al.*, 2008), mentre la mutazione puntiforme H193Y della linea SW-13 è stata identificata da Reincke *et al.* (1994), tuttavia, attualmente non esistono dati relativi all'effetto di queste mutazioni sulla funzionalità di p53. Nel corso dello studio è stato inoltre identificato un polimorfismo a livello del codone 72 (P72R) nella linea SW-13. L'effetto di questo polimorfismo sull'attività di p53 è molto dibattuto (Whibley *et al.*, 2009), tuttavia nei portatori omozigoti è stata osservata una maggiore suscettibilità allo sviluppo di tumori, mentre una riduzione della sopravvivenza è stata rilevata in pazienti eterozigoti affetti da carcinoma della mammella (Bonafé *et al.*, 2003; Whibley *et al.*, 2009).

Il mutante di p53 presente nella linea H295R è privo di parte del dominio di legame al DNA e dell'interio dominio C-terminale, mentre nella linea SW-13 è presente una mutazione all'interno del dominio di legame al DNA, suggerendo che l'attività di p53 in queste cellule sia verosimilmente persa.

L'effetto della reintroduzione di p53 è stato valutato nelle linee cellulari derivanti da carcinoma corticosurrenalico e nella linea p53^{-/-} SK-OV-3, che è stata utilizzata come controllo. In passato, infatti, è stato dimostrato che la perdita di p53 nella linea SK-OV-3 è responsabile della radio-resistenza di queste cellule, mentre la reintroduzione della forma *wild type* di p53 è in grado di determinare un forte effetto sulla proliferazione e la vitalità cellulare in risposta all'irraggiamento (Gallardo *et al.*, 1996; Concin *et al.*, 2000). In accordo con tali risultati, è stato confermato che la trasfezione delle cellule SK-OV-3 con un vettore esprimente la forma *wild type* di *TP53* induce una inibizione della proliferazione cellulare e apoptosi in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti. La morte cellulare è presente solo nelle cellule che esprimono p53^{wt}, nonostante un certo effetto sulla proliferazione cellulare sia stato osservato anche nei campioni trasfettati con un vettore vuoto, confermando quindi che in queste cellule la presenza di una p53 funzionale è necessaria per l'induzione dell'apoptosi in risposta all'irraggiamento.

Nelle linee cellulari H295R e SW-13, l'over-espressione di p53^{wt} non è in grado di indurre un effetto significativo sulla proliferazione cellulare, tuttavia la presenza della forma *wild type* della proteina appare fondamentale per inibire la proliferazione e indurre morte per apoptosi in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti, indicando pertanto che la

perdita dell'attività di p53 rappresenta un evento strettamente correlato con la diminuzione della sensibilità alla radioterapia nei modelli cellulari di carcinoma corticosurrenalico.

Il trattamento con radiazioni ionizzanti determina un aumento dei livelli di p53, che è dovuto ad una stabilizzazione della proteina, piuttosto che ad un aumento dei livelli di espressione dell'mRNA del gene, indicando pertanto la sua attivazione. Inoltre, è stato osservato anche un aumento dell'attività trascrizionale di p53, che induce una inibizione dell'espressione del gene anti-apoptotico *BCL2*. I livelli di *BCL2*, infatti, non sono influenzati dall'irraggiamento in assenza di p53^{wt}, mentre il ripristino di p53 determina una forte diminuzione della sua espressione.

Questi risultati indicano pertanto che l'attivazione di p53 da parte delle radiazioni ionizzanti è necessaria per indurre morte cellulare per apoptosi nelle linee cellulari studiate. Inoltre, nonostante le linee H295R e SW-13 abbiano caratteristiche molto diverse e risultino anche più resistenti al trattamento con radiazioni ionizzanti rispetto alla linea SK-OV-3, gli effetti del ripristino di p53 sono molto simili in tutte e tre le linee cellulari. Tale osservazione farebbe presumere che i mutanti di p53 identificati nelle linee H295R e SW-13 rappresentino delle forme non funzionanti della proteina, piuttosto che dei mutanti dominanti negativi o *gain-of-function*. Una più approfondita caratterizzazione di queste mutazioni sarebbe tuttavia necessaria per poter confermare questa ipotesi.

Poiché in questo lavoro è stato identificato un meccanismo alla base dell'effetto della radioterapia che richiede la presenza di una p53 funzionale, i risultati ottenuti sottolineano inoltre l'importanza di una diagnosi precoce del carcinoma corticosurrenalico, al fine di intraprendere il trattamento radioterapico durante i primi stadi dello sviluppo tumorale, potenzialmente prima dell'insorgenza di mutazioni nel gene *TP53*. Inoltre, l'esistenza di molecole in grado di riattivare la proteina p53 mutante o inattiva, quali le nutline, PRIMA-1 e RITA (Wang *et al.*, 2003; Wiman, 2010), suggerisce la possibilità di utilizzare questi composti in associazione con la radioterapia nei casi in cui *TP53* sia mutato.

Attualmente non esistono dati relativi all'associazione tra lo stato di p53 e l'efficacia della radioterapia nei pazienti affetti da carcinoma corticosurrenalico, tuttavia degli studi retrospettivi e prospettici su una casistica di pazienti sottoposti alla radioterapia appaiono indispensabili per confermare l'effettivo valore di p53 come fattore predittivo nell'ambito dell'ACC.

Nel corso dello studio, è stato inoltre valutato l'effetto di p53^{wt} sull'espressione di *IGF2*. Il fattore di crescita insulino-simile (IGF-II) è over-espresso nel 90% dei carcinomi corti-

cosurrenali (Wilkin *et al.*, 2000; de Reyniès *et al.*, 2009) e rappresenta il principale marcatore che consente di distinguere i tumori maligni dagli adenomi (Gicquel *et al.*, 2001; de Reyniès *et al.*, 2009). Inoltre, l'over-espressione di *IGF2* è considerata un fattore prognostico negativo nei casi di ACC (Gicquel *et al.*, 2001; Patalano *et al.*, 2009).

Diversi studi hanno dimostrato che p53 è in grado di inibire l'espressione di *IGF2*, sia direttamente, attraverso la repressione del promotore P3 di *IGF2*, sia indirettamente, mediante la regolazione dell'espressione delle DNA metiltrasferasi (Dnmt), che consente il mantenimento di un corretto *pattern* di metilazione nella regione di controllo dell'*imprinting* (ICR) nella regione 11p15.5 (Zhang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2005).

In questo studio è stato dimostrato che l'attivazione di p53 in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti determina una forte inibizione dell'espressione di *IGF2* nelle due linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico. Inoltre, è stata osservata anche una forte riduzione nei livelli di attivazione della proteina Akt, che è coerente con l'induzione dell'apoptosi osservata nelle cellule esprimenti p53^{wt} sottoposte ad irraggiamento. L'assenza di questi effetti nelle cellule che esprimono soltanto le forme mutanti di p53 suggerisce che la presenza della forma *wild type* della proteina sia necessaria per inibire la via di trasduzione del segnale mediata da IGF-II e Akt, che è iper-attivata nel carcinoma corticosurrenalico.

Ulteriori studi sono necessari al fine di comprendere l'esatto meccanismo che determina la repressione di *IGF2* da parte di p53 in seguito all'irraggiamento, tuttavia l'inibizione della via di IGF-II/Akt rappresenta un importante traguardo terapeutico. Considerato il valore prognostico di *IGF2* nell'ambito dell'ACC, infatti, l'inibizione della sua espressione da parte di p53 in risposta alla radioterapia potrebbe contribuire a ridurre l'aggressività del tumore, riducendo la probabilità di recidive e potenzialmente aumentando la sopravvivenza dei pazienti.

Sebbene IGF-II costituisca il principale marcatore di malignità per il carcinoma corticosurrenalico, esso non è l'unico fattore di crescita che risulta over-espresso in questo tipo di neoplasia. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) è un altro fattore di crescita la cui espressione aumenta significativamente nei tumori maligni della corteccia surrenale (Libé *et al.*, 2007). VEGF è un fattore coinvolto nella vasculogenesi e nell'angiogenesi, una condizione tipica dei tumori. La sua espressione è fortemente stimolata in condizioni di ipossia ed è regolata dal fattore indotto dall'ipossia, HIF-1 (Lee *et al.*, 2004; Weidemann e Johnson, 2008).

HIF-1 risulta iper-attivato in molti tipi di tumore, spesso a causa della perdita di regolatori negativi, quali PTEN e p53, o della over-espressione di molecole induttrici, quali MDM2 e IGF-II (Feldser *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Semenza, 2003). Lo stato di HIF-1 nel carcinoma corticosurrenalico è attualmente sconosciuto, tuttavia, considerata la forte espressione di *VEGF* e *IGF2*, nonché la frequenza delle mutazioni di *TP53*, è stato ipotizzato che esso possa essere attivo in modo anomalo anche in questa neoplasia.

I dati ottenuti in questo studio supportano questa ipotesi, infatti è stato dimostrato che nelle linee cellulari di ACC la subunità α di HIF-1 è stabilizzata anche in normali condizioni di ossigenazione e risulta localizzata prevalentemente a livello nucleare, indicando uno stato di attivazione patologica. Nonostante i meccanismi alla base della attivazione di HIF-1 α non siano stati ancora chiariti, i risultati ottenuti fino a questo momento suggeriscono comunque che HIF-1 α possa costituire un fattore importante per la progressione neoplastica del carcinoma corticosurrenalico. Ulteriori studi si rendono quindi necessari per chiarire l'effettivo ruolo diagnostico e prognostico di questo fattore, oltre che per l'identificazione delle alterazioni molecolari alla base della sua attivazione, al fine di poter definire nuove strategie terapeutiche mirate alla sua inibizione.

L'attivazione di p53 in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti è risultata in grado di determinare una inibizione di HIF-1 α , sia a livello trascrizionale, sia in termini di repressione della sua attività, infatti l'espressione di *VEGF-A*, la proteina più importante della famiglia dei VEGF, appare fortemente inibita dal ripristino di p53 nelle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico. Considerati i diversi meccanismi attraverso i quali p53 è in grado di inibire HIF-1 α e VEGF, sia direttamente, sia attraverso la repressione di *IGF2*, il ruolo di p53 nell'inibizione dell'angiogenesi appare quindi un importante aspetto da approfondire, al fine di chiarire l'effetto del trattamento con radiazioni ionizzanti nell'ambito del carcinoma corticosurrenalico.

In conclusione, lo scopo del lavoro svolto durante questo Dottorato di Ricerca era quello di identificare delle strategie terapeutiche efficaci per la cura del carcinoma corticosurrenalico. I risultati ottenuti fino a questo momento confermano che il rosiglitazone rappresenta un nuovo farmaco anti-tumorale potenzialmente efficace nell'inibire la progressione neoplastica dell'ACC. Nonostante la diversità degli effetti osservati nei due modelli cellulari utilizzati nello studio, infatti, il rosiglitazone appare comunque in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali e di indurre morte cellulare nella linea H295R, suggerendone un possibile utilizzo terapeutico.

Inoltre, l'approfondimento delle conoscenze relative all'efficacia del trattamento radioterapico nella cura del carcinoma corticosurrenalico ha evidenziato l'importanza del fattore onco-soppressore p53, infatti è stato dimostrato che p53^{wt} è in grado di indurre arresto della proliferazione cellulare e morte per apoptosi nelle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico, indipendentemente dal loro stadio di differenziamento e dalle caratteristiche endocrine, suggerendo quindi che la presenza della forma *wild type* di p53 possa essere considerata un fattore predittivo favorevole per la radioterapia nei casi di carcinoma corticosurrenalico.

Ulteriori studi si rendono necessari al fine di chiarire i meccanismi molecolari alla base della patogenesi delle neoplasie corticosurrenaliche, tuttavia i risultati finora ottenuti circa l'identificazione di nuove strategie farmacologiche costituiscono degli importanti elementi, favorevoli al miglioramento ed allo sviluppo futuro di protocolli terapeutici per questa grave neoplasia.

6. Bibliografia

Abiven, G.; Coste, J.; Groussin, L.; Anract, P.; Tissier, F.; Legmann, P.; Dousset, B.; Bertagna, X.; Betherat, J. (2006) *Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91 (7): 2650-2655.

Allolio, B.; Fassnacht, M. (2006) *Adrenocortical carcinoma: clinical update*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91 (6): 2017-2037.

Allolio, B.; Hahner, S.; Weismann, D.; Fassnacht, M. (2004) *Management of adrenocortical carcinoma*. Clinical Endocrinology; Oxford, 60 (3): 273-287.

Almeida, M.Q.; Soares, I.C.; Ribeiro, T.C.; Fragoso, M.C.; Marins, L.V.; Wakamatsu, A.; Ressio, R.A.; Nishi, M.Y.; Jorge, A.A.; Lerario, A.M.; Alves, V.A.; Mendonca, B.B.; Latronico, A.C. (2010) *Steroidogenic Factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 95 (3): 1458-1462.

Arlt, W.; Reincke, M.; Siekmann, L.; Winkelmann, W.; Allolio, B. (1994) *Suramin in adrenocortical cancer: limited efficacy and serious toxicity*. Clinical Endocrinology, 41 (3): 299-307.

Assié, G.; Antoni, G.; Tissier, F.; Caillou, B.; Abiven, G.; Gicquel, C.; Leboulleux, S.; Travagli, J.P.; Dromain, C.; Bertagna, X.; Bertherat, J.; Schlumberger, M.; Baudin, E. (2007) *Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 92 (1): 148-154.

Assié, G.; Guillaud-Bataille, M.; Ragazzon, B.; Bertagna, X.; Bertherat, J.; Clauser, E. (2010) *The pathophysiology, diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors revisited by transcriptome analyses*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 21 (5): 325-334.

Barlaskar, F.M.; Hammer, G.D. (2007) *The molecular genetics of adrenocortical carcinoma*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 8: 343-348.

Barlaskar, F.M.; Spalding, A.C.; Heaton, J.H.; Kuick, R.; Kim, A.C.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Ben-Josef, E.; Hammer, G.D. (2009) *Preclinical targeting of the type I Insulin-Like Growth Factor Receptor in adrenocortical carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 94: 204-212.

Barzon, L.; Fallo, F.; Sonino, N.; Daniele, O.; Boscaro, M. (1999) *Is there a role for low doses of mitotane (o,p'-DDD) as adjuvant therapy in adrenocortical carcinoma?* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 84 (4): 1488-1489.

Bates, S.E.; Shieh, C.Y.; Mickley, L.A.; Dichek, H.L.; Gazdar, A.; Loriaux, D.L.; Fojo, A.T. (1991) *Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) which is also expressed by adrenocortical carcinomas.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 73: 18-29.

Belfiore, A.; Genua, M.; Malaguarnera, R. (2009) *PPAR-gamma agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: implications for cancer.* PPAR Research, 2009: 830501.

Berruti, A.; Terzolo, M.; Sperone, P.; Pia, A.; Della Casa, S.; Gross, D.J.; Carnaghi, C.; Casali, P.; Porpiglia, F.; Mantero, F.; Reimondo, G.; Angeli, A.; Dogliotti, L. (2005) *Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial.* Endocrine-Related Cancer, 12: 657–666.

Bertherat, J.; Coste, J.; Bertagna, X. (2007) *Adjuvant mitotane in adrenocortical carcinoma.* The New England Journal of Medicine, 357 (12): 1256-1257.

Betz, M.J.; Shapiro, I.; Fassnacht, M.; Hahner, S.; Reincke, M.; Beuschlein, F. (2005) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation.* The Journal of Endocrinology and Metabolism, 90 (7): 3886-3896.

Bielinska, M.; Parviainen, H.; Kiiveri, S.; Heikinheimo, M.; Wilson, D.B. (2009) *Origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms.* Veterinary Pathology, 46 (2): 194-210.

Bonafé, M.; Ceccarelli, C.; Farabegoli, F.; Santini, D.; Taffurelli, M.; Barbi, C.; Marzi, E.; Trapassi, C.; Storci, G.; Olivieri, F.; Franceschi, C. (2003) *Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients.* Clinical Cancer Research, 9 (13): 4860-4864.

Bononi, A.; Agnoletto, C.; De Marchi, E.; Marchi, S.; Patergnani, S.; Bonora, M.; Giorgi, C.; Missiroli, S.; Poletti, F.; Rimessi, A.; Pinton, P. (2011) *Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate.* Enzyme Research, 2011: 329098.

Bristow, R.G.; Benchimol, S.; Hill, R.P. (1996) *The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy.* Radiotherapy and Oncology, 40 (3): 197-223.

Brosh, R.; Rotter, V. (2009) *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. Nature Reviews; Cancer, 9: 701-713.

Brunmair, B.; Staniek, K.; Gras, F.; Scharf, N.; Althaym, A.; Clara, R.; Roden, M.; Gnaiger, E.; Nohl, H.; Waldhäusl, W.; Fürnsinn, C. (2004) *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I. A common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* Diabetes, 53: 1052-1059.

Bursch, W.; Hochegger, K.; Török, L.; Marian, B.; Ellinger, A.; Schulte-Hermann, R. (2000) *Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments*. Journal of Cell Science, 113: 1189-1198.

Cantini, G.; Lombardi, A.; Piscitelli, E.; Poli, G.; Ceni, E.; Marchiani, S.; Ercolino, T.; Galli, A.; Serio, M.; Mannelli, M.; Luconi, M. (2008) *Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-IR intracellular signaling*. PPAR Research, 2008:904041.

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

Cerquetti, L.; Sampaoli, C.; Amendola, D.; Bucci, B.; Misiti, S.; Raza, G.; De Paula, U.; Marchese, R.; Brunetti, E.; Toscano, V.; Stigliano, A. (2010) *Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation*. International Journal of Oncology, 37 (2): 493-501.

Chen, Y.; Azad, M.B.; Gibson, S.B. (2009) *Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy*. Cell Death and Differentiation, 16: 1040-1052.

Chouairry, C.J.; Abdul-Karim, F.; MacLennan, G.T. (2008) *Adrenocortical carcinoma*. The Journal of Urology, 179: 323.

Ciudin, A.; Hernández, C.; Simó, R. (2012) *Update on Cardiovascular safety of PPARgamma agonists and relevance to medicinal chemistry and clinical pharmacology*. Current Topics in Medical Chemistry, *in stampa*.

Concin, N.; Zeillinger, C.; Stimpfel, M.; Schiebel, I.; Tong, D.; Wolff, U.; Reiner, A.; Leodolter, S.; Zeillinger, R. (2000) *p53-dependent radioresistance in ovarian carcinoma cell lines*. Cancer Letters, 150 (2): 191-199.

- Copland, J.A.; Marlow, L.A.; Kurakata, S.; Fujiwara, K.; Wong, A.K.; Kreinest, P.A.; Williams, S.F.; Haugen, B.R.; Kloppe, J.P.; Smallridge, R.C. (2006) *Novel high-affinity PPAR γ agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1*. *Oncogene*, 25 (16): 2304-2317.
- Cox, P.J.; Ryan, D.A.; Hollis, F.J.; Harris, A.M.; Miller, A.K.; Vousden, M.; Cowley, H. (2000) *Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in human*. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 772-780.
- De Martino, M.C.; van Koetsveld, P.M.; Pivonello, R.; Hofland, L.J. (2010) *Role of the mTOR pathway in normal and tumoral adrenal cells*. *Neuroendocrinology*, 92 (suppl 1): 28-34.
- de Reyniès, A.; Assié, G.; Rickman, D.S.; Tissier, F.; Groussin, L.; René-Corail, F.; Dousset, B.; Bertagna, X.; Clauser, E.; Bertherat, J. (2009) *Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival*. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (7): 1108-1115.
- Delerive, P.; Fruchart, J.C.; Staels, B. (2001) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in inflammation control*. *The Journal of Endocrinology*, 169: 453-459.
- Doghman, M.; El Wakil, A.; Cardinaud, B.; Thomas, E.; Wang, J.; Zhao, W.; Peralta-Del Valle, M.H.C.; Figueiredo, B.C.; Zambetti, G.P. Lalli, E. (2010) *Regulation of IGF - mTOR signalling by miRNA in childhood adrenocortical tumors*. *Cancer Research*, 70 (11): 4666-4675.
- Dorfinger, K.; Vierhapper, H.; Wilfing, A.; Czernin, S.; Niederle, B.; Nowotny, P.; Peterlik, M.; Waldhäusl, W.; Grubeck-Loebenstien, B. (1991) *The effects of suramin on human adrenocortical cells in vitro: suramin inhibits cortisol secretion and adrenocortical cell growth*. *Metabolism*, 40 (10): 1020-1024.
- Fair, A.M.; Dai, Q.; Shu, X.O.; Matthews, C.E.; Yu, H.; Jin, F.; Gai, Y.T.; Zheng, W. (2007) *Energy balance, insulin resistance biomarkers, and breast cancer risk*. *Cancer Detection and Prevention*, 31 (3): 214-219.
- Fassnacht, M.; Weismann, D.; Ebert, S.; Adam, P.; Zink, M.; Beuschlein, F.; Hahner, S.; Allolio, B. (2005) *AKT is highly phosphorylated in pheochromocytomas but not in benign adrenocortical tumors*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90 (7): 4366-4370.

- Fassnacht, M.; Hahner, S.; Polat, B.; Koschker, A.C.; Kenn, W.; Flentje, M.; Allolio, B. (2006) *Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91 (11): 4501-4504.
- Feldser, D.; Agani, F.; Iyer, N.V.; Pak, B.; Ferreira, G.; Semenza, G.L. (1999) *Reciprocal positive regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α and Insulin-like Growth Factor 2*. Cancer Research, 59: 3915-3918.
- Fels, D.R.; Koumenis, C. (2005) *HIF-1 α and p53: the ODD couple?* TRENDS in Biochemical Sciences, 30 (8): 426-429.
- Ferruzzi, P.; Ceni, E.; Tarocchi, M.; Grappone, C.; Dilani, S.; Galli, A.; Fiorelli, G.; Serio, M.; Mannelli, M. (2005) *Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 90 (3): 1332-1339.
- Flack, M.R.; Pyle, R.G.; Mullen, N.M.; Lorenzo, B.; Wu, Y.W.; Knazek, R.A.; Nisula, B.C.; Reidenberg, M.M. (1993) *Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 76 (4): 1019-1024.
- Fukuda, R.; Hirota, K.; Fan, F.; Jung, Y.D.; Ellis, L.M.; Semenza, G.L. (2002) *Insulin-like Growth Factor 1 induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor expression, which is dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase signaling in colon cancer cells*. The Journal of Biological Chemistry, 277 (41): 38205-38211.
- Gajoux, S.; Grabar, S.; Fassnacht, M.; Ragazzon, B.; Launay, P.; Libè, R.; Chokri, I.; Audebourg, A.; Royer, B.; Sbiera, S.; Vacher-Lavenu, M.C.; Dousset, B.; Bertagna, X.; Allolio, B.; Bertherat, J.; Tissier, F. (2011) *β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma*. Clinical Cancer Research, 17 (2): 328-336.
- Gallardo, D.; Drazan, K.E.; McBride, W.H. (1996) *Adenovirus-based transfer of wild-type p53 gene increases ovarian tumor radiosensitivity*. Cancer Research, 56 (21): 4891-4893.
- Gicquel, C.; Raffin-Sanson, M.L.; Gaston, V.; Bertagna, X.; Plouin, P.F.; Schlumberger, M.; Louvel, A.; Luton, J.P.; Le Bouc, Y. (1997) *Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82 (8): 2559-2565.

Gicquel, C.; Bertagna, X.; Gaston, V.; Coste, J.; Louvel, A.; Baudin, E.; Bertherat, J.; Chapuis, Y.; Duclos, J.M.; Schlumberger, M.; Plouin, P.F.; Luton, J.P.; Le Bouc, Y. (2001) *Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors*. Cancer Research, 61: 6762-6767.

Grubbs, E.G.; Callender, G.G.; Xing, Y.; Perrier, N.D.; Evans, D.B.; Phan, A.T.; Lee, J.E. (2010) *Recurrence of adrenal cortical carcinoma following resection: surgery alone can achieve results equal to surgery plus mitotane*. Annals of Surgical Oncology, 17 (1): 263-270.

Grumbach, M.M.; Biller, B.M.K.; Braunstein, G.D.; Campbell, K.K.; Carney, J.A.; Godley, P.A.; Harris, E.L.; Lee, J.K.T.; Oertel, Y.C.; Posner, M.C.; Schlechte, J.A.; Wieand, H.S. (2003) *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. Annals of Internal Medicine, 138: 424-429.

Haase, M.; Willenberg, H.S. (2009) *Adrenal cortical tumors and multiple endocrine neoplasia-related syndromes*. Minerva Endocrinologica, 34 (2): 123-135.

Hahner, S.; Fassnacht, M. (2005) *Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment*. Current Opinion in Investigational Drugs, 6 (4): 386-394.

Haldar, S.; Negrini, M.; Monne, M.; Sabbioni, S.; Croce, C.M. (1994) *Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells*. Cancer Research, 54: 2095-2097.

Han, S.W.; Roman, J. (2006) *Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent signal pathways*. Molecular Cancer Therapy, 5 (2): 430-437.

Harris, S.G.; Phipps, R.P. (2002) *Prostaglandin D₂, its metabolite 15-d-PGJ₂, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells*. Immunology, 105: 13-34.

Heaney, A.P.; Fernando, M.; Melmed, S. (2003) *PPAR- γ receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas*. The Journal of Clinical Investigation, 111 (9): 1381-1388.

Hemann, M.T.; Lowe, S.W. (2006) *The p53-Bcl-2 connection*. Cell Death and Differentiation, 13: 1256-1259.

- Heppner, C.; Reincke, M.; Agarwal, S.K.; Mora, P.; Allolio, B.; Burns, A.L.; Spiegel, A.M.; Marx, S.J. (1999) *MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 84 (1): 216-219.
- Hermesen, I.G.; Groenen, Y.E.; Dercksen, M.W.; Thews, J.; Haak, H.R. (2010) *Response to radiation therapy in adrenocortical carcinoma*. Journal of Endocrinological Investigation, 33 (10): 712-714.
- Huang, J.W.; Shiau, C.W.; Yang, Y.T.; Kulp, S.K.; Chen, K.F.; Brueggemeier, R.W.; Shapiro, C.L.; Chen, C.S. (2005) *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells*. Molecular Pharmacology, 67: 1342-1348.
- Imataki, O.; Makimoto, A.; Kojima, R.; Sakiyama, M.; Hosono, A.; Takaue, Y. (2006) *Intensive multimodality therapy including paclitaxel and reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of adrenal cancer with multiple metastases*. International Journal of Clinical Oncology, 11 (2): 156-158.
- Jiang, B.H.; Jiang, G.; Zheng, J.Z.; Lu, Z.; Hunter, T.; Vogt, P.K. (2001) *Phosphatidylinositol 3-Kinase signaling controls levels of Hypoxia-inducible Factor 1*. Cell Growth and Differentiation, 12: 363-369.
- Jiang, Q.; Heneka, M.; Landreth, G.E. (2008). *The role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) in Alzheimer's disease: therapeutic implications*. CNS Drugs, 22 (1): 1-14.
- Keshamouni, V.G.; Han, S.W.; Roman, J. (2007) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lung Cancer*. PPAR Research, 2007: 90289.
- Khan, T.S.; Imam, H.; Juhlin, C.; Skogseid, B.; Gröndal, S.; Tibblin, S.; Wilander, E.; Öberg, K.; Eriksson, B. (2000) *Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long term survival in its adjuvant use*. Annals of Oncology, 11 (10): 1281-1287.
- Khan, T.S.; Sundin, A.; Juhlin, C.; Wilander, E.; Öberg, K.; Eriksson, B. (2004) *Vincristine, cisplatin, teniposide, and cyclophosphamide combination in the treatment of recurrent or metastatic adrenocortical cancer*. Medical Oncology, 21 (2): 167-177.
- Kim, A.C.; Barlaskar, F.M.; Heaton, J.H.; Else, T.; Kelly, V.R.; Krill, K.T.; Scheys, J.O.; Simon, D.P.; Trovato, A.; Yang, W.; Hammer, G.D. (2009) *In search for adrenocortical stem and progenitor cells*. Endocrine Reviews, 30 (3): 241-263.

Kubota, T.; Koshizuka, K.; Williamson, E.A.; Said, J.W.; Holden, S.; Miyoshi, I.; Koeffler, H.P. (1998) *Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo*. Cancer Research, 58: 3344-3352.

Latronico, A.C.; Chrousos, G.P. (1997) *Adrenocortical tumors*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82 (5): 1317-1324.

Latronico, A.C.; Modolo Pinto, E.; Domenice, S.; Barisson Villares Fragoso, M.C.; Matsunaga Martin, R.; Zerbini, M.C.; Marmo Lucon, A.; Bilharinho Mendonca, B. (2001) *An inherited mutation outside the highly conserved DNA-Binding Domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86 (10): 4970–4973.

Lebovitz, H.E.; Banerji, M.A. (2001) *Insulin resistance and its treatment with thiazolidinediones*. Recent Progress in Hormone Research, 56: 265-294.

LeBrasseur, N.K.; Kelly, M.; Tsao, T.S.; Farmer, S.R.; Saha, A.K.; Ruderman, N.B.; Tomas, E. (2006) *Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian tissues*. The American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 291 (1): E175-E181.

Lee, J.W.; Bae, S.H.; Jeong, J.W.; Kim, S.H.; Kim, K.W. (2004) *Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions*. Experimental and Molecular Medicine, 36 (1): 1-12.

Lehmann, J.M.; Moore, L.B.; Smith-Oliver, T.A.; Wilkinson, W.O.; Willson, T.M.; Kliewer, S.A. (1995) *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)*. The Journal of Biological Chemistry, 279 (22): 12953-12956.

Lenders, J.W.; Eisenhofer, G.; Mannelli, M.; Pacak, K. (2005) *Phaeochromocytoma*. Lancet, 366 (9486): 665-75.

Levine, A.J.; Feng, Z.; Mak, T.W.; You, H.; Jin, S. (2006) *Coordination and communication between the p53 and IGF-1–AKT–TOR signal transduction pathways*. Genes and Development, 20: 267-275.

Liang, J.; Shao, S.H.; Xu, Z.X.; Hennessy, B.; Ding, Z.; Larrea, M.; Kondo, S.; Dumont, D.J.; Gutterman, J.U.; Walker, C.L.; Slingerland, J.M.; Mills, G.B. (2007) *The energy sensing LKB1–AMPK*

pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nature Cell Biology, 9 (2): 218-229.

Libè, R.; Fratticci, A.; Bertherat, J. (2007) *Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management.* Endocrine-Related Cancer, 14: 13-28.

Lin, M.S.; Chen, W.C.; Bai, X.; Wang, Y.D. (2007) *Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer.* The Journal of Digestive Diseases, 8 (2): 82-88.

Logiè, A.; Boulle, N.; Gaston, V.; Perin, L.; Boudou, P.; Le Bouc, Y.; Gicquel, C. (1999) *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line.* Journal of Molecular Endocrinology, 23: 23-32.

Lu, M.; Kwan, T.; Yu, C.; Chen, F.; Freedman, B.; Schafer, J.M.; Lee, E.J.; Jameson, J.L.; Jordan, V.C.; Cryns, V.L. (2005) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest.* The Journal of Biological Chemistry, 280 (8): 6742-6751.

Macfarlane, D.A. (1958) *Cancer of the adrenal cortex: the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases.* Annals of the Royal College of Surgeons of England, 23 (3): 155-186.

Maluf, D.F.; de Oliveira, B.H.; Lalli, E. (2011) *Therapy of adrenocortical cancer: present and future.* American Journal of Cancer Research, 1 (2): 222-232.

Markoe, A.M.; Serber, W.; Micaily, B.; Brady, L.W. (1991) *Radiation therapy for adjunctive treatment of adrenal cortical carcinoma.* American Journal of Clinical Oncology, 14 (2): 170-174.

McIlwrath, A.J.; Vasey, P.A.; Ross, G.M.; Brown, R. (1994) *Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity.* Cancer Research, 54 (14): 3718-3722.

Millau, J.F.; Bastien, N.; Drouin, R. (2009) *P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts.* Mutation Research, 681 (2-3): 118-133.

Minella, A.C.; Grim, J.E.; Welcker, M.; Clurman, B.E. (2007) *p53 and SCF^{Fbw7} cooperatively restrain cyclin E-associated genome instability.* Oncogene, 26: 6948-6953.

- Miyashita, T.; Harigai, M.; Hanada, M.; Reed, J.C. (1994) *Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene*. *Cancer Research*, 54: 3131-3135.
- Modesti, A.; Masuelli, L.; Modica, A.; D'Orazi, G.; Scarpa, S.; Bosco, M.C.; Forni, G. (1993). *Ultrastructural evidence of the mechanisms responsible for interleukin-4-activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma*. *International Journal of Cancer*, 53: 988-993.
- Mosmann, T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *The Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- Olefsky, J.M. (2000) *Treatment of insulin resistance with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ agonists*. *The Journal of Clinical Investigation*, 106 (4): 467-472.
- Olivier, M.; Goldgar, D.E.; Sodha, N.; Ohgaki, H.; Kleihues, P.; Hainaut, P.; Eeles, R.A. (2003) *Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype*. *Cancer Research*, 63: 6643-6650.
- Opocher, G.; Schiavi, F.; Cicala, M.V.; Patalano, A.; Mariniello, B.; Boaretto, F.; Zovato, S.; Pignataro, V.; Macino, B.; Negro, I.; Mantero, F. (2009) *Genetics of adrenal tumors*. *Minerva Endocrinologica*, 34 (2): 107-121.
- Özata, D.M.; Caramuta, S.; Velázquez-Fernández, D.; Akçakaya, P.; Zie, H.; Höög, A.; Zedenius, J.; Bäckdahl, M.; Larsson, C.; Lui, W.O. (2011) *The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma*. *Endocrine-Related Cancer*, 18 (6): 643-655.
- Paglin, S.; Lee, N.Y.; Nakar, C.; Fitzgerald, M.; Plotkin, J.; Deuel, B.; Hackett, N.; McMahon, M.; Sphicas, E.; Lampen, N.; Yahalom, J. (2005) *Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells*. *Cancer Research*, 65 (23): 11061-11070.
- Park, I.Y.; Sohn, B.H.; Choo, J.H.; Joe, C.O.; Seong, J.K.; Lee, Y.I.; Chung, J.H. (2005) *Deregulation of DNA methyltransferases and loss of parental methylation at the Insulin-like Growth Factor II (Igf2)/H19 loci in p53 knockout mice prior to tumor development*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94: 585-596.
- Patalano, A.; Brancato, V.; Mantero, F. (2009) *Adrenocortical cancer treatment*. *Hormone Research*, 71 (suppl. 1): 99-104.
- Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. (2011) *MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy*. *Cancer*, 117 (8): 1630-1639.

Pérez-Ortiz, J.M.; Tranque, P.; Vaquero, C.F.; Domingo, B.; Molina, F.; Calvo, S.; Jordà, J.; Ceña, V.; Llopis, J. (2004) *Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* . The Journal of Biological Chemistry, 279 (10): 8976-8985.

Piette, J.; Neel, H.; Maréchal, V. (1997) *Mdm2: keeping p53 under control*. Oncogene, 15: 1001-1010.

Polat, B.; Fassnacht, M.; Pfreundner, L.; Guckenberger, M.; Bratengeier, K.; Johansen, S.; Kenn, W.; Hahner, S.; Allolio, B.; Flentje, M. (2009) *Radiotherapy in adrenocortical carcinoma*. Cancer, 115: 2816-2823.

Ragazzon, B.; Assié, G.; Bertherat, J. (2011) *Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments*. Endocrine-Related Cancer, 18: R15-R27.

Reincke, M.; Karl, M.; Travis, W.H.; Mastorakos, G.; Allolio, B.; Linehan, H.M.; Chrousos, G.P. (1994) *p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 78 (3): 790-794.

Ribeiro, R.C.; Michalkiewicz, E.L.; Figueiredo, B.C.; DeLacerda, L.; Sandrini, F.; Pianovsky, M.D.; Sampaio, G.; Sandrini, R. (2000) *Adrenocortical tumors in children*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 33: 1225-1234.

Ribeiro, R.C.; Sandrini, F.; Figueiredo, B.C.; Zambetti, G.P.; Michalkiewicz, E.; Lafferty, A.R.; DeLacerda, L.; Rabin, M.; Cadwell, C.; Sampaio, G.; Cat, I.; Stratakis, C.A.; Sandrini, R. (2001) *An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98 (16): 9330-9335.

Römer, L.; Klein, C.; Dehner, A.; Kessler, H.; Buchner, J. (2006) *p53 a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts*. Angewandte Chemie International Edition (English), 45 (39): 6440-6460.

Rutter, G.A.; Da Silva Xavier, G.; Leclerc, I. (2003) *Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis*. Biochemical Journal, 375: 1-16.

Sabolch, A.; Feng, M.; Griffith, K.; Hammer, G.; Doherty, G.; Ben-Josef, E. (2010) *Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma*. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 80 (5): 1477-1484.

- Satter, E.K.; Barnette, D.J. (2008) *Adrenocortical carcinoma with delayed cutaneous metastasis*. Journal of Cutaneous Pathology, 35 (7): 677-680.
- Sbiera, S.; Schmull, S.; Assié, G.; Voelker, H.U.; Kraus, L.; Beyer, M.; Ragazzon, B.; Beuschlein, F.; Willenberg, H.S.; Hahner, S.; Saeger, W.; Bertherat, J.; Allolio, B.; Fassnacht, M. (2010) *High diagnostic and prognostic value of Steroidogenic Factor-1 expression in adrenal tumors*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 95 (10): E161-E171.
- Scherz-Shouval, R.; Elazar, Z. (2007) *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. Trends in Cell Biology, 17: 422-427.
- Schlumberger, M.; Ostronoff, M.; Bellaiche, M.; Rougier, P.; Droz, J.P.; Parmentier, C. (1988) *5-Fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin regimen in adrenal cortical carcinoma*. Cancer, 61 (8): 1492-1494.
- Schmitz, K.J.; Helwig, J.; Bertram, S.; Sheu, S.Y.; Suttorp, A.C.; Seggewiß, J.; Willscher, E.; Walz, M.K.; Worm, K.; Schmid, K.W. (2011) *Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours*. Journal of Clinical Pathology, 64 (6): 529-535.
- Schteingart, D.E.; Doherty, G.M.; Gauger, P.G.; Giordano, T.J.; Hammer, G.D.; Korobkin, M.; Worden, F.P. (2005) *Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference*. Endocrine-Related Cancer, 12: 667-680.
- Schteingart, D.E. (2007) *Adjuvant mitotane therapy of adrenal cancer - use and controversy*. The New England Journal of Medicine, 356 (23): 2415-2418.
- Semenza, G.L. (2003) *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nature Reviews; Cancer, 3: 721-732.
- Shiau, C.W.; Yang, C.C.; Kulp, S.K.; Chen, K.F.; Chen, C.S.; Huang, J.W.; Chen, C.S. (2005) *Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma*. Cancer Research, 65: 1561-1569.
- Singh, P.; Soon, P.S.H.; Feige, J.J.; Chabre, O.; Zhao, J.T.; Cherradi, N.; Lalli, E.; Sidhu, S.B. (2011) *Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors*. Molecular and Cellular Endocrinology, *in stampa*.
- Son, Y.O.; Wang, X.; Hitron, J.A.; Zhang, Z.; Cheng, S.; Budhரா, A.; Ding, S.; Lee, J.C.; Shi, X. (2011) *Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells*. Toxicology and Applied Pharmacology, 255 (3): 287-296.

Soon, P.S.H.; Sidhu, S.B. (2009) *Molecular basis of adrenocortical carcinomas*. Minerva Endocrinologica, 34 (2): 137-147.

Soon, P.S.H.; Tacon, L.J.; Gill, A.J.; Bambach, C.P.; Sywak, M.S.; Campbell, P.R.; Yeh, M.W.; Wong, S.G.; Clifton-Bligh, R.J.; Robinson, B.G.; Sidhu, S.B. (2009) *miR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer*. Clinical Cancer Research, 15: 7684-7692.

Steelman, L.S.; Chappell, W.H.; Abrams, S.L.; Kempf, R.C.; Long, J.; Laidler, P.; Mijatovic, S.; Maksimovic-Ivanic, D.; Stivala, F.; Mazzarino, M.C.; Donia, M.; Fagone, P.; Malaponte, G.; Nicoletti, F.; Libra, M.; Milella, M.; Tafuri, A.; Bonati, A.; Bäsecke, J.; Cocco, L.; Evangelisti, C.; Martelli, A.M.; Montalto, G.; Cervello, M.; McCubrey, J.A. (2011) *Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging*. Aging (Albany NY), 3 (3): 192-222.

Stojadinovic, A.; Ghossein, R.A.; Hoos, A.; Nissan, A.; Marshall, D.; Dudas, M.; Cordon-Cardo, C.; Jaques, D.P.; Brennan, M.F. (2002) *Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic and molecular characterization*. Journal of Clinical Oncology, 20 (4): 941-950.

Sullivan, M.; Boileau, M.; Hodges, C.V. (1978) *Adrenal cortical carcinoma*. The Journal of Urology, 120 (6): 660-665.

Tacon, L.J.; Soon, P.S.; Gill, A.J.; Chou, A.S.; Clarkson, A.; Botling, J.; Stalberg, P.L.; Skogseid, B.M.; Robinson, B.G.; Sidhu, S.B.; Clifton-Bligh, R.J. (2009) *The glucocorticoid receptor is over-expressed in malignant adrenocortical tumors*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 94 (11): 4591-4599.

Terzolo, M.; Angeli, A.; Fassnacht, M.; Daffara, F.; Tauchmanova, L.; Conton, P.A.; Rossetto, R.; Buci, L.; Sperone, P.; Grossrubatscher, E.; Reimondo, G.; Bollito, E.; Papotti, M.; Sanger, W.; Hahner, S.; Koschker, A.C.; Arvat, E.; Ambrosi, B.; Loli, P.; Lombardi, G.; Mannelli, M.; Bruzzi, P.; Mantero, F.; Allolio, B.; Dogliotti, L.; Bernuti, A. (2007) *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. The New England Journal of Medicine, 356 (23): 2372-2380.

Tissier, F.; Cavard, C.; Groussin, L.; Perlempine, K.; Fumey, G.; Hagneré, A.; René-Corail, F.; Julian, E.; Gicquel, C.; Bertagna, X.; Vacher-Lavenu, M.C.; Perret, C.; Bertherat, J. (2005) *Mutations of β -catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors*. Cancer Research, 65 (17): 7622-7627.

- Veronese, A.; Lupini, L.; Consiglio, J.; Visone, R.; Ferracin, M.; Fornari, F.; Zanesi, N.; Alder, H.; D'Elia, G.; Gramantieri, L.; Bolondi, L.; Lanza, G.; Querzoli, P.; Angioni, A.; Croce, C.M.; Negri-ni, M. (2010) *Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus*. Cancer Research, 70: 3140-3149.
- Veronese, A.; Visone, R.; Consiglio, J.; Acunzo, M.; Lupini, L.; Kima, T.; Ferracin, M.; Lovata, F.; Miotto, E.; Balatti, V.; D'Abundo, L.; Gramantieri, L.; Bolondi, L.; Pekarsky, Y.; Perrotti, D.; Ne-grini, M.; Croce, C.M. (2011) *Mutated β -catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108 (12): 4840-4845.
- Wajchenberg, B.L.; Albergaria Pereira, M.A.; Medonca, B.B.; Latronico, A.C.; Campos Carneiro, P.; Alves, V.A.; Zerbini, M.C.; Liberman, B.; Carlos Gomes, G.; Kirschner, M.A. (2000) *Adreno-cortical carcinoma: clinical and laboratory observations*. Cancer, 88 (4): 711-736.
- Wang, W.; Rastinejad, F.; El-Deiry, W.S. (2003) *Restoring p53-dependent tumor suppression*. Cancer Biology and Therapy, 2 (4, Suppl 1): S55-63.
- Wasserman, J.D.; Zambetti, G.P.; Malkin, D. (2011) *Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis*. Molecular and Cellular Endocrinology, in stampa.
- Watson, G.S.; Craft, S. (2003) *The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's dis-ease: implications for treatment*. CNS Drugs, 17 (1): 27-45.
- Weidemann, A.; Johnson, R.S. (2008) *Biology of HIF-1 α* . Cell Death and Differentiation, 15: 621-627.
- Weiss, L.M. (1984) *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. The American Journal of Surgical Pathology, 8 (3): 163-169.
- Weng, J.R.; Chen, C.Y.; Pinzone, J.J.; Ringel, M.D.; Chen, C.S. (2006) *Beyond Peroxisome Prolif-erator-Activated Receptor γ signalling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidin-ediones*. Endocrine-Related Cancer, 13: 401-413.
- Whibley, C.; Pharoah, P.D.; Hollstein, M. (2009) *p53 polymorphisms: cancer implications*. Nature Reviews; Cancer, 9 (2): 95-107.
- Wilkin, F.; Gagné, N.; Paquette, J.; Oligny, L.L.; Deal, C. (2000) *Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 85 (5): 2048-2056.

- Willson, T.M.; Lehmann, J.M.; Kliewer, S.A. (1996) *Discovery of ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptors*. Annals New York Academy of Sciences, 804: 276-283.
- Wiman, K.G. (2010) *Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient*. Oncogene, 29 (30): 4245-4252.
- Wood, M.A.; Hammer, G.D. (2011) *Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins*. Molecular and Cellular Endocrinology, 336: 206-212.
- Wooten, M.D.; King, D.K. (1993) *Adrenal cortical carcinoma*. Cancer, 72 (11): 3145-3155.
- Yaginuma, Y.; Westphal, H. (1992) *Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines*. Cancer Research, 52 (15): 4196-4199.
- Yamakuchi, M.; Lotterman, C.D.; Bao, C.; Hruban, R.H.; Karim, B.; Mendell, J.T.; Huso, D.; Lowenstein, C.J. (2010) *P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107 (14): 6334-6339.
- Yew, T.; Toh, S.A.; Millar, J.S. (2011) *Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Modulation to Reduce Cardiovascular Risk in Patients with Insulin Resistance*. Recent Patents in Cardiovascular Drug Discovery, in stampa.
- Zhang, L.; Kashanchi, F.; Zhan, Q.; Zhan, S.; Brady, J.N.; Fornace, A.J.; Seth, P.; Helman, L.J. (1996) *Regulation of Insulin-like Growth Factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis*. Cancer Research, 56: 1367-1373.
- Zhong, H.; Chiles, K.; Feldser, D.; Laughner, E.; Hanrahan, C.; Georgescu, M.M.; Simons, J.W.; Semenza, G.L. (2000) *Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Research, 60: 1541-1545.