

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Diagnostica Collaterale In Medicina Veterinaria

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza: Vet 08

**Studio sull'Eziopatogenesi dei Tumori
Corticosurrenali Cortisolo Secernenti nel Cane**

Presentata da: Dott. Dardan Shehdula

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Famigli Bergamini Paolo

Dott. Fracassi Federico

Indice

1.Introduzione

2.Capitolo I

	Pagina
Sindrome di Cushing	4
Eziopatogenesi	4
Sintomatologia clinica	6
Esami di laboratorio	8
Diagnosi	9
Terapia	14

3.Capitolo II

Wnt pathway	16
I componenti della Wnt pathway	20
Wnt pathway e la genesi tumorale	32

4.Capitolo III

La Wnt pathway nei tumori delle ghiandole surrenali in cani con- ipercortisolismo surrenalico e in surrenali normali.	35
Materiali e Metodi	37
Risultati	40
Discussione	48

Introduzione

I tumori delle ghiandole surrenali sono comuni nell'uomo e in diverse specie animali compresi i cani. Nel cane, questi tumori sono la causa di 15-20% dei casi di ipercortisolismo (Feldman & Nelson, 2004). Nonostante ci sia ancora molto da chiarire sull'origine e l'evoluzione di questi tumori nell'uomo e negli animali domestici, i dati provenienti dallo studio dei tumori dell'uomo indicano che la tumorigenesi surrenalica coinvolge alterazioni genetiche ed epigenetiche (Bielinska e coll, 2009). Le ipotesi che cercano di spiegare l'origine e l'evoluzione dei tumori surrenalici sono due: la multistep clonale, modello genetico e il modello progenitoriale epigenetico. Questi due modelli sono complementari più che escludenti l'un l'altro. La maggior parte dei casi di tumori surrenalici riflettono una combinazione di questi due meccanismi. I meccanismi epigenetici servono per espandere la popolazione delle cellule progenitrici normali, modulare la loro plasticità fenotipica (per esempio la loro reattività ai segnali extracellulari) ed aumentare così la probabilità delle alterazioni genetiche susseguenti (Bielinska e coll, 2009). Nell'ultimo decennio in medicina umana sono stati fatti avanzamenti significativi nella comprensione della patogenesi dei tumori cortico-surrenalici. Tali progressi sono derivati principalmente dallo studio della genetica dei tumori corticosurrenalici sia a livello germinativo in rare patologie ereditarie sia a livello somatico, studiando le alterazioni molecolari nei tumori sporadici. Tutti questi progressi sottolineano l'importanza delle alterazioni genetiche nello sviluppo dei tumori corticosurrenalici e indicano diverse regioni cromosomiche (2, 11p15, 11q, 17p13) e geni (IGF-II, p53, gene della β -catenina, recettore per ACTH). I geni coinvolti in queste alterazioni molecolari possono essere classificati in geni onco-soppressori e oncogeni (Libe R, 2007). Nella corteccia delle ghiandole surrenali come negli altri tessuti l'oncologia ricapitola l'ontogenia. Vie di segnalamento cellulare attive durante lo sviluppo embrionico/fetale e nel mantenimento/attivazione delle cellule staminali sono spesso alterate nei tumori corticosurrenalici (Giles e col, 2003; Tissier e coll, 2005; Libe R, 2007; Bielinska e coll 2009). Studi molecolari hanno individuato mutazioni attivanti della Wnt pathway come causa di molti tumori, inclusi i tumori corticosurrenalici nell'uomo (Kikuchi, 2003; Giles e coll, 2003; Tissier e coll, 2005; Polakis, 2007). In diversi studi condotti sui tumori cortico-surrenalici è stato rilevato che, in tali tumori

dell'uomo è frequente un coinvolgimento della Wnt pathway con conseguente accumulo citoplasmatico/nucleare abnorme della β -catenina (Bläker e coll, 2004; Tissier e coll, 2005; Tadjine e coll, 2007). Se si escludono gli studi condotti sui tumori mammari e un singolo caso di coriocarcinoma gastrico con dimostrata Wnt attivata e accumulo di β -catenina, si può affermare che tali tipi di studi sono pressoché assenti nella medicina canina. (Rao e coll, 2008; Poutahidis e coll, 2008). L'adrenalectomia è considerato il trattamento di scelta per l'ipercortisolismo surrenalico. I cani che sopravvivono all'immediato periodo postoperatorio hanno una buona prognosi a lungo termine indipendentemente dalla diagnosi istologica (Schwartz e coll, 2008). Nonostante la buona prognosi per un tempo di sopravvivenza lungo, sono tuttavia stati riportati alti tassi di complicazioni postoperatorie (51%) ed alti tassi di mortalità (19-22%) nell'immediato postoperatorio (Anderson e coll, 2001; Kyles e coll, 2003; Schwartz e coll, 2008; Pelaez J e coll, 2008). La patogenesi di questi tumori nel cane non è stata ancora chiarita. Il progresso nella comprensione della patofisiologia dei tumori cortico-surrenali nel cane risulta utile per scopi diagnostici, prognostici e terapeutici. L'obiettivo di questo studio è stato quello di investigare la via di segnalazione Wnt nei tumori cortico-surrenali e nelle surrenali di cani sani.

Capitolo I

Sindrome di Cushing

La malattia di Cushing è stata descritta per la prima volta nel 1932 dal neurochirurgo francese Harvey Cushing. Oggi tale patologia è ben conosciuta e viene denominata malattia di Cushing (nella forma ipofisi dipendente) o sindrome di Cushing (nelle forme non ipofisi dipendenti). Tale sindrome prende anche il nome di iperadrenocorticismo, tuttavia, è più corretto parlare di ipercortisolismo dal momento che l'iperadrenocorticismo comprende anche l'iperaldosteronismo che è una patologia differente. La Sindrome di Cushing si manifesta generalmente in soggetti di età compresa tra i 6 e i 16 anni, con una media di circa 10 anni nei soggetti con PDH e di 11 anni in quelli con ADH. L'incidenza delle neoplasie ipofisarie è maggiore nei soggetti di peso inferiore ai 20 Kg (75%) e nelle femmine (55-60%). Le neoplasie surrenaliche, invece, mostrano un'incidenza del 50% in soggetti di peso superiore ai 20 Kg e nelle femmine (60-65%). Le razze più a rischio sono il Barbone Nano, il Bassotto, il Beagle, il Boxer, il Labrador, il Pastore Tedesco e i vari Terrier (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010).

Eziopatogenesi:

La sindrome di Cushing (ipercortisolismo) viene definita come l'insieme delle alterazioni cliniche e laboratoristiche connesse ad uno stato di ipercortisolemia inappropriata e prolungata (Feldman & Nelson, 2004).

In base all'eziopatogenesi è possibile distinguere diverse forme di ipercortisolismo:

- ◇ Ipercortisolismo ipofisi-dipendente "pituitary dependent hypercortisolism" (PDH) o malattia di Cushing

Circa l'85% dei cani presenta questa forma. E' sostenuta da una neoplasia ipofisaria ACTH-secernente. L'eccessiva secrezione di ACTH determina un'iperplasia surrenalica bilaterale ed una conseguente ipersecrezione di glucocorticoidi da parte della corticale del surrene. Nella maggior parte dei casi si tratta di tumori benigni che normalmente sono microadenomi e nel 15-25% macroadenomi (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010).

- ◇ Ipercortisolismo surrenalo-dipendente, "adrenal dependent hypercortisolism" (ADH) è sostenuto da adenomi o carcinomi a carico della corticale delle surrenali che secernono un'eccessiva quantità di cortisolo indipendentemente dal controllo ipofisario. Solitamente la neoplasia è monolaterale, tuttavia sono segnalati anche casi di tumori a carico di entrambe le ghiandole (Rijnberk & Kooistra, 2010). Rimane ancora da determinare se i carcinomi corticosurrenali si sviluppano da adenomi cortico-surrenali oppure si sviluppano come entità indipendenti. In medicina umana ci sono delle indicazioni che lo sviluppo dei tumori surrenali sia un processo multistep che progredisce da cellule normali a cellule adenomatose ed in fine a cellule maligne (Bernard e coll, 2003).

Se pur raramente, la forma ipofisi-dipendente e surrenale-dipendente possono coesistere nello stesso soggetto (Greco e coll, 1999) .

- ◇ Ipercortisolismo iatrogeno

Questa situazione si verifica in seguito alla somministrazione prolungata e/o eccessiva di glucocorticoidi esogeni (Feldman & Nelson, 2004).

- ◇ Ipercortisolismo da produzione ectopica di ACTH

Nell'uomo tale patologia è ben conosciuta ed è caratterizzata dalla produzione di ACTH da parte di neoplasie non ipofisarie. La maggior parte dei tumori che causano secrezione ectopica di ACTH nell'uomo sono tumori maligni originati da cellule neuroendocrine come i carcinomi polmonari a cellule piccole, i carcinoidi bronchiali, carcinoidi timici, tumori delle cellule insulari del pancreas, carcinomi midollari delle tiroidi ecc (Galac e coll, 2005). Ciò determina un'abnorme stimolazione delle surrenali con conseguente iperplasia bilaterale

ed iperproduzione di cortisolo. Tale forma è stata recentemente segnalata in un cane con un tumore neuro endocrino addominale (Galac e coll, 2005).

◇ Ipercortisolismo alimento dipendente

Oltre ai tumori adrenocorticali, l'ipercortisolismo ACTH-indipendente potrebbe essere causato da un'aberrante espressione di recettori ormonali nella corteccia surrenalica che rispondono a molecole alimento-indotte. Galac e coll. (2008) hanno riportato un caso di un Bracco Ungherese di sei anni la cui ipercortisolemia alimento-dipendente era associata a ipercortisolismo ACTH-indipendente.

Sintomatologia clinica

Una cronica esposizione a livelli eccessivi di cortisolo si manifesta con un'ampia serie di segni clinici caratteristici che tuttavia possono non essere sempre presenti e possono manifestarsi con variabili gradi di gravità (Feldamn & Nelson, 2004).

Poliuria e polidipsia: sono segni estremamente comuni in corso di ipercortisolismo (80-85% dei soggetti) e sono spesso il motivo principale che spinge il proprietario a richiedere il consulto veterinario.

Un soggetto con ipercortisolismo beve una quantità di acqua da 2 a 10 volte superiore alla norma e quindi superiore ai 100 ml/Kg/die che è la soglia che nel cane permette di definire uno stato di polidipsia. Il cortisolo, prodotto in elevate quantità, interferisce con l'azione dell'ormone antidiuretico a livello di tubuli collettori distali renali, determinano una forma di diabete insipido nefrogenico secondario . Inoltre, s'instaura uno stato di diabete insipido centrale, con una vera e propria carente secrezione di ormone antidiuretico.

Polifagia: nel cane, l'aumento dell'appetito, sembra essere un effetto diretto dei glucocorticoidi. La polifagia si manifesta in più del 90% dei casi di ipercortisolismo e probabilmente è dovuta ad un'azione anti-insulinica del cortisolo che riduce l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti (Feldman & Nelson, 2004).

“Addome a botte”: questo sintomo è rilevabile nell’80% dei cani con ipercortisolismo ed è la conseguenza di un aumento del contenuto addominale e di una diminuzione della tonicità dei muscoli addominali dovuta agli effetti proteocatabolici del cortisolo.

L’aumento del volume addominale è attribuibile alla redistribuzione dei grassi corporei con accumulo a livello omentale, all’epatomegalia (per infiltrazione lipidica ed accumulo di glicogeno) e alla sovradistensione cronica della vescica (Feldman & Nelson, 2004).

Astenia muscolare e letargia: l’astenia muscolare si manifesta con intolleranza all’esercizio, difficoltà nel salire le scale e nel compiere sforzi fisici intensi ed è il risultato del catabolismo proteico mediato dai glucocorticoidi che si ripercuote sul tessuto muscolare nel 75-85% dei soggetti con Sindrome di Cushing.

La letargia è probabilmente l’espressione dell’astenia e del danno muscolare.

Manifestazioni cutanee: le alterazioni cutanee, in corso di ipercortisolismo, sono frequenti e solitamente non sono associate a prurito. L’alopecia simmetrica bilaterale è uno dei sintomi più comuni e si localizza, generalmente, a livello del tronco, risparmiando la testa e gli arti. E’ il risultato di un’atrofia follicolare e pilosebacea che determina caduta del pelo e mancata ricrescita. La cute si presenta ipotonica e notevolmente assottigliata, con una marcata tendenza a sviluppare ematomi, petecchie e soffiusioni. Inoltre, la cute è più soggetta ad infezioni secondarie, conseguenti all’effetto immunosoppressivo dei glucocorticoidi, sostenute da batteri, miceti o acari (ad esempio demodicosi). Spesso si evidenziano comedoni attorno ai capezzoli e lungo la linea mediana dorsale, e a volte possono essere presenti lungo tutto il tronco; non di rado vi è la presenza di aree di iperpigmentazione focale o diffusa. Rilievo meno comune (2-8%), è invece la “Calcinosis cutis”, cioè una deposizione distrofica di calcio nel derma e nel sottocute, di cui non si conosce ancora completamente il meccanismo eziopatogenetico (Scott e coll, 2001; Reusch, 2005).

Dispnea: i soggetti affetti da ipercortisolismo, hanno un aumento della deposizione di grassi a carico del torace e una debolezza muscolare che coinvolge anche i muscoli respiratori. Questo fattori possono determinare

l'insorgenza di dispnea. L'aumento della pressione esercitata sul diaframma dall'accumulo di grassi in addome, associato all'epatomegalia, può accentuare i disturbi del meccanismo di ventilazione. Altre cause includono la mineralizzazione dell'intertizio polmonare e il tromboembolismo polmonare (Feldman & Nelson, 2004). Sintomi meno comuni: cani affetti da ipercortisolismo possono raramente manifestare segni legati all'apparato riproduttivo quali atrofia testicolare o anestro. Un altro fenomeno piuttosto raro sono le miotonie: raramente, cani con ipercortisolismo sviluppano una miopatia caratterizzata da contrazioni muscolari persistenti e rigidità muscolare evidenziabili con alterazioni all'elettromiografia. La causa di tale alterazione nel cane è ancora sconosciuta (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010).

Sintomatologia nervosa: nei soggetti affetti da un macroadenoma ipofisario, la compressione sulle strutture circostanti può determinare una sintomatologia nervosa caratterizzata da alterazioni dello stato mentale (ottundimento del sensorio, stupor), atassia, tetraparesi, disorientamento e compulsione (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010).

Esami di laboratorio:

Esame emocromocitometrico

La classica alterazione presente in corso di ipercortisolismo è il "leucogramma da stress": l'80% dei soggetti presenta una linfopenia ed eosinopenia e il 20-25% mostra un lieve aumento dei leucociti totali. L'eccessiva produzione di cortisolo, infatti, causa una demarginazione dei neutrofili e dei monociti dall'endotelio dei capillari, determinando una neutrofilia ed una monocitosi. Un altro rilievo comune è la trombocitosi mentre più raramente si può riscontrare una lieve eritrocitosi (Feldman & Nelson 2004).

Esame ematobiochimico

Il rilievo ematobiochimico più comunemente evidenziato è l'aumento della fosfatasi alcalina (SAP). L'eccesso di cortisolo endogeno determina infatti un aumento della fosfatasi alcalina corticosteroido-indotta. L'85% dei soggetti

affetti da ipercortisolismo presenta valori di fosfatasi alcalina superiori a 150 UI/L e non è raro che tali valori superino i 1000 UI/L. Gli enzimi epatici, soprattutto l'alanina aminotransferasi (ALT), sono generalmente aumentati a causa dell'epatopatia indotta dagli steroidi. Inoltre, i glucocorticoidi stimolano la lipolisi determinando quindi un aumento della lipemia e del colesterolo sierico nel 90% dei soggetti. L'insulino-resistenza e l'attivazione della gluconeogenesi epatica causate dal cortisolo endogeno possono determinare un moderato aumento della glicemia che solo nel 5-10% dei soggetti sfocia in un diabete mellito clinicamente manifesto. Nel 38% dei soggetti l'azotemia e la creatininemia possono essere inferiori all'intervallo di riferimento a causa dell'accentuata diuresi. Anche gli elettroliti sierici possono mostrare delle alterazioni: nel 33% dei soggetti viene evidenziata una ipofosfatemia causata dall'aumento dell'escrezione renale dei fosfati, il 50% dei soggetti mostra un aumento della natremia e un lieve calo della potassiemia (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010).

Esame Chimico-fisico delle urine

L'alterazione più comunemente riscontrabile nelle urine di cani affetti da ipercortisolismo è la diminuzione del peso specifico. Nell'85% dei soggetti, infatti, il peso specifico urinario risulta inferiore a 1.020. Circa il 40-50% dei soggetti presenta infezioni alle vie urinarie: l'immunosoppressione mediata dai glucocorticoidi, la sovradistensione cronica della vescica e la presenza di urine diluite, facilitano l'insorgenza di infezioni a carico delle basse vie urinarie (Feldman & Nelson, 2004).

Diagnosi

Test di stimolazione con ACTH

Il test di stimolazione con ACTH è il test più comunemente utilizzato per confermare la diagnosi di ipercortisolismo nel cane. Si tratta di un test semplice, relativamente poco costoso e veloce (Feldman & Nelson, 2004). Valutando la risposta delle surrenali in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno è possibile confermare la diagnosi di ipercortisolismo. Inoltre, questo test permette di identificare soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno. Numerosi

sono i protocolli pubblicati in letteratura, tuttavia, quello più comunemente utilizzato prevede la misurazione del cortisolo ematico basale e dopo 1 ora dalla somministrazione di 0,25 mg di ACTH sintetico (tetracosactide esacetato [Synacten®, Novartis]) per via endovenosa o intramuscolare (Feldman & Nelson, 2004). Un soggetto normale presenta valori basali di cortisolo ematico compresi tra 0.5 e 6.0 g/dl. Tipicamente i valori post-stimolazione sono compresi tra 6 e 17 µg/dl. Valori post-stimolazione compresi fra 17 e 22 µg/dl sono considerati dubbi e non diagnostici, invece valori post-stimolazione superiori a 22 µg/dl sono indicativi di ipercortisolismo. Soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno mostrano valori basali di cortisolo ematico bassi o normali, tuttavia tali valori non subiscono variazioni in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno. Questo test permette di confermare un ipercortisolismo nell'80-85% dei cani affetti da PDH e nel 50-60% dei cani affetti da ADH. La presenza di alte percentuali di falsi negativi in corso di ADH deriva dalla mancanza di sensibilità all'ACTH che talvolta si verifica in corso di neoplasie surrenaliche (Rijnberk & Kooistra, 2010).

Test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDS)

Questo test è sia diagnostico che discriminante e permette quindi di differenziare forme di PDH da forme di ADH sfruttando il feedback negativo del cortisolo sulla liberazione di ACTH. In un cane sano, infatti, la somministrazione di corticosteroidi esogeni, induce un blocco della liberazione di ACTH da parte dell'ipofisi e quindi una mancata produzione di cortisolo da parte delle surrenali. La riduzione della cortisolemia si avverte già dopo 2-3 ore dalla somministrazione endovenosa di desametasone e può perdurare per 8-48 ore. Il protocollo di esecuzione del test prevede la misurazione dei livelli di cortisolo ematico basali e dopo 4 ore e 8 ore dalla somministrazione endovenosa di 0.01 mg/kg di desametasone. La cortisolemia all'ottava ora permette di confermare la diagnosi di ipercortisolismo: il test viene considerato negativo se la cortisolemia all'ottava ora risulta inferiore a 1 µg/dl. Valori compresi tra 1 µg/dl e 1.4 µg/dl indicano una risposta dubbia al test e valori superiori a 1.4 µg/dl, invece, confermano la diagnosi di ipercortisolismo. La cortisolemia rilevata dopo

4 ore dalla somministrazione del desametasone permette di differenziare, nella maggioranza dei casi, soggetti affetti da PDH piuttosto che da ADH. In un soggetto sano la cortisolemia si abbassa a livelli inferiori a 1.4 µg/dl già a 4 ore dalla somministrazione del desamesone e perdura anche dopo 8 ore. In soggetti affetti da PDH si possono avere diversi tipi di risposta a 4 ore dalla somministrazione di desametasone:

- Il 20% dei soggetti non mostra alcuna soppressione del cortisolo ematico come nei soggetti affetti da ADH.
- Un altro 20% dei soggetti mostra una lieve soppressione.
- Il 30-40% dei soggetti ha un cortisolo alla quarta ora inferiore più del 50% rispetto al basale ma non inferiore a 1.4 µg/dl.
- Il restante 25% dei soggetti il cortisolo ematico a 4 ore scende a livelli inferiori a 1.4 µg/dl.

Nei primi due casi risulterà impossibile distinguere PDH da ADH, si avrà semplicemente la conferma diagnostica di ipercortisolismo. Ne consegue che solo nel 60% dei soggetti affetti da PDH si ottiene una risposta chiara al test di soppressione. Nei soggetti affetti da ADH, invece, non si ha alcuna soppressione della produzione di cortisolo da parte delle surrenali. Il test può comunque risultare dubbio nel caso in cui ci sia una apparente soppressione del cortisolo ematico alla 4 ora dalla somministrazione del desametasone che in realtà è probabilmente data da una lieve, casuale e temporanea fluttuazione del cortisolo ematico verificatasi al momento del prelievo. E' importante notare che un risultato falso positivo a questo test può essere determinato dallo stress dell'animale. A tale proposito, al fine di limitare possibili risultati falsi positivi, nel giorno in cui viene eseguito tale test è opportuno non effettuare altre procedure diagnostiche quali ecografie, anestesie ecc. Preferibilmente tale test non deve essere eseguito lo stesso giorno in cui viene eseguito il test di stimolazione con ACTH (Feldman & Nelson, 2004; Reusch, 2005).

Test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDS)

L'utilizzo di questo test è consigliato in quei casi in cui il LDDS non sia stato in grado di differenziare ADH da PDH. Infatti una neoplasia ipofisaria che non ha risposto alla dose di 0,01 mg/dl (bassa dose) di desametasone, potrebbe rispondere a dosi maggiori; mentre, in corso di neoplasia surrenalica non ci sarà alcuna soppressione del cortisolo ematico indipendentemente dalla dose utilizzata. Questo test si effettua misurando la cortisolemia prima e 3 ore dopo la somministrazione di 0,1 mg/kg di desametasone (una dose 10 volte la precedente). Non bisogna dimenticare che anche con questo test, circa il 15-25% dei casi di PDH non presenta alcuna soppressione, presentandosi quindi come un ADH .

Rapporto Cortisolo urinario/Creatinina (UC:CR)

La misurazione del UC:CR è un test di facile esecuzione che permette di valutare la funzionalità surrenalica. In soggetti affetti da ipercortisolismo, l'escrezione urinaria di cortisolo aumenta come conseguenza di una maggior secrezione da parte delle surrenali. La valutazione di tale rapporto permette di avere informazioni più attendibili sulla produzione di glucocorticoidi in quanto si evita il problema delle fluttuazioni plasmatiche del cortisolo. Questo test è dotato di una bassa specificità, tuttavia ha una sensibilità molto alta. Il rapporto UC:CR di per sé è un test semplicemente diagnostico, per renderlo discriminante si può utilizzare tale rapporto abbinato alla somministrazione di desametasone ad alte dosi. Il test UC:CR con desametasone ad alte dosi si effettua prelevando le urine per caduta per 2 mattine consecutive e somministrando, per tre volte a distanza di 8 ore, 0,1 mg/Kg di desametasone per bocca dopo il secondo prelievo di urine. Un terzo campione di urine deve essere prelevato dopo 8 ore dalla terza somministrazione di desametasone. Sui tre campioni di urine si valuta l'UC:CR. Tale test è considerato indicativo di PDH qualora l'UC:CR del terzo campione risulti inferiore più del 50% rispetto al valore medio dell'UC:CR dei primi due campioni (Rijnberk & Kooistra, 2010).

Ecografia addominale

L'ecografia addominale permette di valutare la forma e la dimensione delle ghiandole surrenali. Inoltre, permette di evidenziare la presenza di altre alterazioni a carico degli altri organi addominali, spesso presenti in corso di ipercortisolismo quali ad esempio l'epatomegalia, la presenza di calcoli urinari e metastasi neoplastiche a carico del fegato.

In corso di PDH, in circa il 97% dei casi, forma, contorni, ecogenicità ed ecostruttura delle ghiandole surrenali appaiono normali all'esame ecografico, tuttavia con un aumento simmetrico delle dimensioni. Il miglior parametro per oggettivizzare l'aumento di volume delle surrenali è la misurazione del diametro del polo caudale di ciascuna surrenale che non deve superare i 7 mm. In corso di ADH, invece, l'ecogenicità della surrenale colpita dalla neoplasia appare variabile ed eterogenea, con distorsione dei contorni e un aumento irregolare delle dimensioni, la surrenale controlaterale, invece, può apparire atrofica o normale. E' importante ricordare che esistono casi in cui il tumore può coinvolgere entrambe le surrenali, in tal caso entrambe le surrenali appariranno aumentate nelle loro dimensioni e con un'ecostruttura ed una ecogenicità alterate (Feldman & Nelson, 2004; Reusch, 2005).

Tomografia computerizzata

Le dimensioni dell'ipofisi sono differenti fra le varie razze e tra cani della stessa razza. In uno studio su 35 cani sani, le dimensioni tomografiche dell'ipofisi variavano da 3,2 a 5,1 mm in altezza, da 4,2 a 6,9 mm in larghezza e da 3,6 a 7,2 mm in lunghezza. Il primo segno di ingrandimento ipofisario pare essere l'aumento dell'altezza (cioè l'estensione dorsale soprasellare); l'ipofisi si considera ingrossata quando il contorno ipofisario dorsale protrude al di sopra dell'estensione soprasellare delle cisterne intercruiali, che si riconoscono facilmente nelle immagini della TC. In alternativa, si può utilizzare il rapporto tra l'altezza dell'ipofisi e l'area cerebrale misurata nell'immagine fino al centro dell'ipofisi (rapporto P:B) per discriminare tra ipofisi ingrandita (P:B superiore a 0,31) e normale (P:B inferiore o uguale a 0,31). I tumori di grandi dimensioni si individuano facilmente in immagini TC con mezzo di contrasto, per la loro grandezza e per la loro forma alterata; a volte i tumori possono essere difficili da visualizzare senza mezzo di contrasto. Nel 50-60% dei cani con

ipercortisolismo ipofisario, si può individuare una massa ipofisaria tramite TC; nel rimanente 40-50% dei casi, la patologia è causata da un microadenoma di dimensioni inferiori a 3-4 mm, che non è visibile neanche con contrasto. Nuove tecniche TC, che utilizzano una serie di scansioni trasversali passanti per il centro dell'ipofisi durante e dopo la rapida iniezione endovenosa di un mezzo di contrasto (TC dinamica), rilevano una differenza di contrasto tra la neuroipofisi e l'adenopofisi. Questo è dovuto a variazioni nel flusso sanguigno; si osserva un precoce, forte contrasto tra la neuroipofisi, al centro ("flush ipofisario"), come pure un più debole contrasto, leggermente ritardato, dell'adenopofisi, più periferica. Uno spostamento o una distorsione del flush della neuroipofisi può rilevare la presenza di piccole neoplasie (van der Vlugt-Meijer e coll, 2003; Rinberk & Kooistra, 2010).

Terapia

La terapia dell'ipercortisolismo può essere sia di tipo medico che chirurgico (Feldman & Nelson, 2004; Rinberk & Kooistra, 2010).

Terapia del PDH

Idealmente, il trattamento del PDH dovrebbe essere volto ad eliminare la causa di tale condizione. In Medicina umana, infatti, la rimozione chirurgica dell'ipofisi con un approccio transfenoidale è considerato il trattamento di elezione in corso di tumori pituitari. Anche in Medicina Veterinaria, tale tipo di intervento è stato effettuato con successo nel cane e secondo alcuni autori è il metodo di elezione per il trattamento del PDH canino (Meij e coll, 1998; Meij e coll, 2002). Nel caso di macroadenoma ipofisario con concomitanti sintomi neurologici le uniche possibilità terapeutiche sono rappresentate dalla chirurgia e dalla radioterapia. La radioterapia consente di ridurre notevolmente le dimensioni della massa ipofisaria ed è stato dimostrato la sua efficacia per il trattamento dei tumori ipofisari nei cani (de Fornel e coll, 2007; Kent e coll, 2007). La terapia medica del PDH prevede la somministrazione di principi attivi quali il mitotano, il ketoconazolo o il trilostano (Feldman & Nelson, 2004; Reusch, 2005; Rijnberk & Kooistra, 2010). Il mitotano è un derivato chimico del DDT. E' un potente adrecorticolitico e causa una necrosi progressiva della zona fascicolata, reticolare e glomerulosa delle surrenali. Il ketoconazolo è un derivato

dell'imidazolo ed è un antimicotico. Tuttavia, ad elevate dosi, il ketoconazolo ha effetti anche sulla biosintesi degli steroidi, determinando una soppressione della secrezione del cortisolo. L'elevato costo del farmaco, l'inefficacia evidenziata nel 20-25% dei soggetti e la necessità di doverlo somministrare due volte al giorno, ha limitato l'utilizzo del ketoconazolo nel trattamento dell'ipercortisolismo. Il trilostano (Vetoryl®, Janssen Animal Health) è un inibitore competitivo del 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi. Questo enzima media la conversione del pregnenolone a progesterone e del 17-idrossipregnenolone a 17-idrossiprogesterone. Il cortisolo, l'aldosterone e l'androsteneidione sono prodotti a partire dal progesterone e dal 17-idrossipregnenolone. Il trilostano inibisce la produzione di progesterone e di 17-idrossiprogesterone, con conseguente riduzione della sintesi dei vari steroidi prodotti dalle surrenali, dalle gonadi e dalla placenta. L'inibizione della steroidogenesi delle surrenali si manifesta a dosi inferiori rispetto a quelle necessarie ad inibire la sintesi di steroidi negli altri organi. In Medicina Veterinaria sono stati effettuati numerosi studi che hanno evidenziato un significativo miglioramento dei segni clinici in cani affetti da ipercortisolismo e sottoposti a terapia con trilostano, nonostante siano state segnalate risposte variabili nei diversi soggetti. Il trilostano è un farmaco efficace e sicuro nel trattamento del PDH nel cane. Inoltre, tale farmaco è l'unico registrato in Italia per la terapia della Sindrome di Cushing nel cane (Feldman & Nelson, 2004; Reusch, 2005; Rijnberk & Kooistra, 2010). Il protocollo di utilizzo di tale molecola è stato definito in un "Consensus Meeting" fra endocrinologi Europei avvenuto il 19 Aprile 2006.

Terapia dell'ADH

In corso di ADH, l'adrenalectomia è considerata il trattamento di scelta per i tumori surrenalici ameno che non si è riscontrata in precedenza la presenza di metastasi (Kyles e coll, 2003; Pelaez J and coll, 2008; Schwartz e coll, 2008). Tuttavia, prima dell'intervento chirurgico è indispensabile valutare se il soggetto sia un buon candidato per la chirurgia. Nel caso in cui il soggetto sia particolarmente debilitato e/o presenti problemi concomitanti all'ipercortisolismo, è consigliabile posticipare l'intervento, trattare il soggetto con trilostano per 1-3

mesi e stabilizzare l'animale (Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010). Il trattamento di tipo chirurgico è sconsigliato nel caso in cui la diagnostica per immagini abbia evidenziato una massa neoplastica palesemente inoperabile o la presenza di metastasi a carico di altri organi. Tuttavia, in questi soggetti è possibile procedere con la terapia medica descritta precedentemente. I cani che sopravvivono all'immediato periodo postoperatorio hanno una buona prognosi a lungo termine indipendentemente dalla diagnosi istologica (Schwartz e coll, 2008). Nonostante la buona prognosi per un tempo di sopravvivenza lungo, sono tuttavia stati riportati alti tassi di complicazioni postoperatorie (51%) ed alti tassi di mortalità (19-22%) nell'immediato postoperatorio (Anderson e coll, 2001; Kyles e coll, 2003; Schwartz e coll, 2008; Pelaez J e coll, 2008).

Capitolo II

Wnt Pathway

Le proteine Wnt costituiscono una grande famiglia di glicoproteine ricche in cisteina secrete come ligandi che controllano lo sviluppo degli organismi partendo dai vermi fino ai mammiferi (Miller 2001). Il termine Wnt è stato introdotto circa 25 anni fa fondendo i nomi di due geni orologi: Wingless (Wg) gene della *Drosophila* e Int-1 un protooncogene del topo (Giles e coll, 2003). Le vie di segnalamento cellulare provocate dalle proteine Wnt sono state ben conservate durante il processo evolutivo in molte specie animali. Le Wnt giocano ruoli chiave nell'evoluzione dell'embrione, e nel mantenimento dell'omeostasi nei tessuti adulti, regolando diversi processi cellulari come, la proliferazione, la differenziazione, e la sopravvivenza/apoptosi cellulare. Queste molecole sono delle glicoproteine di 39-46kDa che agiscono sulle cellule bersaglio legandosi a dei recettori transmembrana seven-span Frizzeld proteins e a dei co-recettori, lipoproteine a bassa densità 5/6 (LRP 5/6). Anche se è stato fatto un progresso considerevole nella comprensione delle vie di

segnalazione attivate da queste molecole, non è ancora chiaro il meccanismo di secrezione e di trasporto in aree lontane delle Wnt. Nella *Drosophila* l'Wingless (Wg) l'omologo della Wnt-1 è secreto da un numero cospicuo di cellule. I Wg secreti formano un gradiente a lunga distanza che porta la diffusione delle Wg ad alcuni diametri cellulari dal sito di secrezione (Neumann and Cohen, 1997). Il meccanismo con il quale il Wg è trasportato dal sito di secrezione a cellule target distanti è rimasto poco chiarito. Le proteine Wnt sono altamente idrofobiche e strettamente associate alle membrane cellulari a causa di modificazioni palmityoliche essenziali per l'attività biologica di queste molecole (Willert e col, 2003). Per spiegare il movimento delle molecole Wnt dal sito di secrezione alle cellule target sono stati proposti diversi meccanismi. L'associazione delle Wnt con proteine glycosaminoglican-modified nella matrice extracellulare (Baeg e coll, 2001), la formazione di vescicole chiamati argosomi (Greco e coll, 2001), particelle lipoproteiche extracellulari (Panakova e coll, 2005), transcitosis (Coudreuse e coll, 2006), oppure una combinazione dei meccanismi sopradescritti. Nonostante, tutti questi meccanismi proposti il meccanismo esatto utilizzato durante il trasporto inter-cellulare delle Wnt non è ancora stato chiarito (Korkut e coll, 2009). Attualmente sono state identificate 19 proteine Wnt e 10 membri differenti dei recettori Fz nel genoma umano (Akiyama, 2000; Nelson WJ & Nusse R, 2004). Una grande varietà di risposte può essere iniziata dall'interazione Wnt/frizzeld. Fino a poco tempo fa si credeva che esistessero solo tre vie di segnalazione regolate dalle glicoproteine Wnt.

1- La Wnt/beta-catenin (canonica) che regola l'espressione dei geni target tramite beta-catenina/T-cell factor (TCF) (Cadigan and Nusse, 1997; Akiyama, 2000).

2- La via Planar cell polarity (PCP) che definisce le polarità asimmetriche della cellula, coordina i cambiamenti della forma cellulare e i movimenti cellulari (Akiyama, 2000; Giles e coll, 2003; Takahashi-Yanaga e coll, 2007).

3-La via Wnt/Ca⁺⁺ che regola l'adesione e la mobilità cellulare (Kuhl e coll, 2000).

4-Recentemente è stata scoperta una quarta via di segnalazione Wnt che coinvolge la protein chinasi A e gioca un ruolo nella miogenesi (Akiyama , 2000; Chen AE e coll, 2005; Takahashi-Yanaga e coll, 2007).

Tra le quattro vie di segnalazione la meglio conosciuta è la via canonica oppure la Wnt/ β -catenin pathway (Cadigan and Nusse, 1997; Giles e coll, 2003). L'attività di questa via di segnalazione è determinata dalla quantità di β -catenina nel citoplasma. La β -catenina è l'ortologo mammifero della proteina Arm della *Drosophila* ed è il mediatore chiave della Wnt pathway. È stata originariamente identificata come componente degli adherens junctions dove lega le E-cadherine alla α -catenina e poi al reticolo di actina dello citoscheletro. In aggiunta al suo ruolo chiave di mediatore del segnale Wnt la β -catenina è una componente essenziale dei sistemi di adesione (desmosomi) tra cellule (Akiyama, 2000; Giles e coll. 2003; Xu and Kimelman, 2007). Normalmente il livello di beta-catenina citoplasmatica è mantenuto basso tramite un continuo processo di degradazione della stessa mediata dal sistema ubiquitin-proteasome (β -Trcp) (Cadigan and Nusse, 1997; Akiyama, 2000; Giles e coll, 2003). Non è ancora del tutto chiaro come, il legame delle proteine Wnt ai recettori di membrana Fz/LRP provochi il segnale intracellulare. Dopo il legame WNT-Fz/LRP la proteina citoplasmatica dishelved (Dvl), parte del complesso recettoriale, viene fosforilata ed inibisce l'attività delle Glicogen sintasi kinasi-3 β (GSK-3 β) e Casein kinasi 1 α (CK1 α). L'inibizione dell'attività di GSK-3 β e di CK1 α tramite la loro ritenzione nel complesso proteico formato da Axina e adenomatous poliposis coli protein (Apc), risulta nell'accumulo intracitoplasmatico di β -catenina non fosforilata. La β -catenina non fosforilata sfugge al complesso β -TrCP evitando la degradazione. Dal citoplasma, la β -catenina viene traslocata al nucleo dove forma un complesso con il fattore di trascrizione T cell factor (TCF) Lymphoid enhancer factor (LEF). In assenza di β -catenina il TCF forma un complesso con Groucho che reprime l'attività

trascrizionale. La β -catenina interferisce nell' interazione tra TCF e Groucho ed induce la trascrizione dei geni target della Wnt pathway (Cadigan and Nusse, 1997; Giles e coll, 2003) (Fig 1).

Il programma genetico iniziato dalla β -catenina e TCF attiva la trascrizione di un set di geni che determinano principalmente il destino cellulare e la proliferazione. Il segnalamento tramite questa via di segnalazione è attivo durante l'embriogenesi. I segnali Wnt controllano aspetti multipli dello sviluppo, includendo la proliferazione, la specificazione cellulare, la polarità, e la migrazione cellulare. In aggiunta, un'iperattivazione dei segnali Wnt è uno dei fattori più importanti nell'oncogenesi nell'uomo e negli animali (Cadigan and Nusse, 1997; Akiyama, 2000; Polakis2000; Giles e coll, 2003)

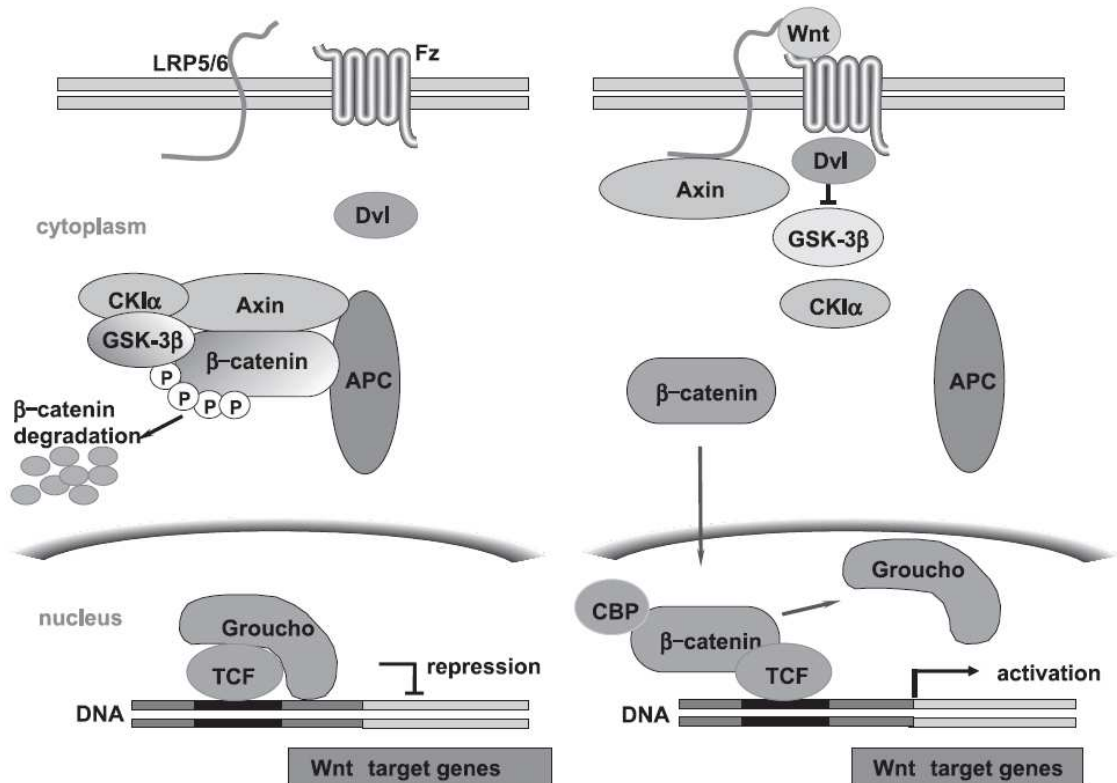


Fig. 1. Modello semplificato di trascrizione attivata dalla beta-catenina dopo il legame della proteina Wnt con i recettori di membrana Lrp 5/6 e Fz. **A sinistra:** In assenza del segnale Wnt, i livelli di β -catenina sono mantenuti bassi dal complesso di degradazione composta da APC,

Axina, Gsk-3 β , CKI α . La trascrizione dei geni target è represso dalla presenza dei co-repressori Groucho. **A destra:** Il segnale Wnt destabilizza il complesso che degrada la β -catenina, permettendo così il suo trasporto nel nucleo. Una volta che la β -catenina entra nel nucleo sposta Groucho per legarsi al TCF ed attivare la trascrizione dei geni target (modificato da Takahashi-Yanaga e coll, 2007).

I componenti della Wnt pathway

A livello della membrana cellulare

Il segnale Wnt inizia con il legame dei ligandi Wnt con uno dei membri della famiglia dei recettori Fz insieme ai co-recettori LRP-5/6 membri della famiglia dei recettori lipoproteici a bassa densità (Akiyama, 2000; Giles e coll, 2003). La via di segnalazione Wnt canonica è attivata soltanto quando entrambi i recettori Fz e LRP creano un complesso con le Wnt (Pinson e coll, 2000) (Fig 2). Nel complesso Fz-LRP, Fz recluta disheveled (Dvl) la quale in seguito recluta il complesso Axin-GSK-3 β , promuovendo la fosforilazione di LRP5/6 avviando il segnale intracitoplasmatico (Zeng e coll, 2008) (Fig 2). La maggior parte delle proteine Wnt può legarsi a diversi recettori Fz e viceversa. Esistono anche forme solubili di Fz (FzBs) le quali si crede abbiano effetti antagonisti catturando Wnt prima di legarsi ai recettori di membrana Fz (Leyns e coll, 1997; Finch e coll, 1997). Altri inibitori secreti sono le proteine Dickkopf (Dkk). Questi ultimi sono strutturalmente diversi alle Wnt e bloccano la Wnt pathway legandosi ai recettori LRP-6 in modo tale da impedire il legame degli Wnt a tali recettori (Mao e coll, 2001). Oltre ai recettori Fz e LRP5/6 esistono altri recettori di membrana che interagiscono con le proteine Wnt. In molti casi questi recettori giocano un ruolo nelle vie alternative della Wnt pathway. In dipendenza dello sviluppo temporale e del tipo di cellula e tessuto, le proteine Wnt possono interagire con una moltitudine di partner, recettori di membrana, co-recettori, co-fattori ed inibitori della Wnt pathway (van Amerongen e Nusse, 2009). Una buona parte di queste interazioni non è ancora del tutto chiaro ma gettano luce sulla complessità di questa via di segnalazione così importante nella fisiologia e nella patofisiologia dei tumori nei mammiferi.

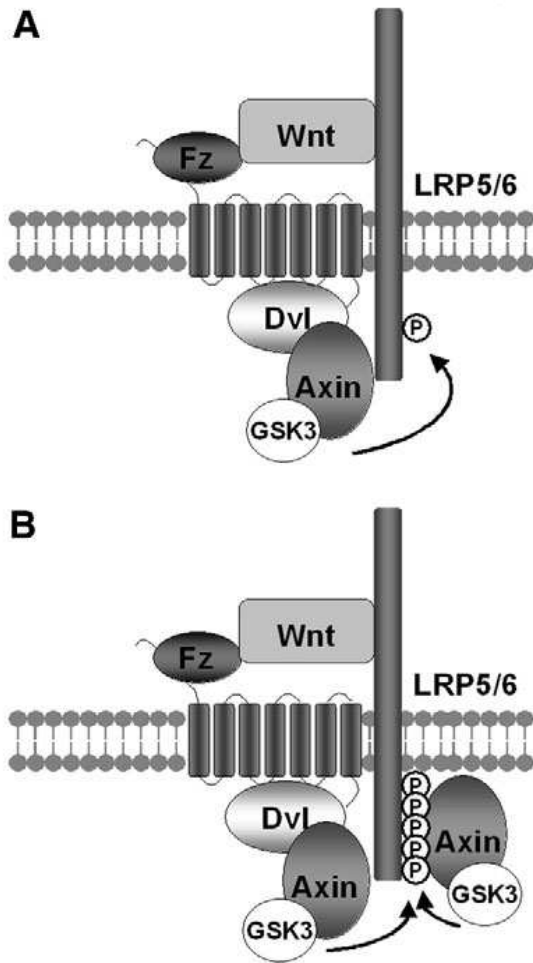


Fig 2. Iniziazione del segnale Wnt a livello della membrana cellulare. La formazione del complesso Fz-LRP5/6 indotto dal segnale Wnt, promuove la fosforilazione del LRP6 da parte del complesso Axina-Gsk-3 β tramite la proteina Dvl (modificato da Zeng e coll, 2008).

Nel citoplasma

Al legame Wnt-Fz segue la traslocazione di Axina nella membrana cellulare, dove interagisce con la coda intracitoplasmatica di LRP-5/6 prima fosforilata dalla GSK-3 β (Zeng e coll, 2008) (Fig 2B). L'interazione dell'Axina con la coda intracitoplasmatica del corecettore LRP distoglie l'Axina dal complesso di degradazione della β -catenina. In parallelo il legame Wnt-Fz risulta nella iperfosforilazione della proteina intracitoplasmatica Dvl. Non è ancora stato chiarito se la proteina Dvl inibisce direttamente la fosforilazione della β -catenina da parte della GSK-3 β oltre a mediare la fosforilazione del LRP6 dal complesso

Axin-GSK-3 β . Il complesso Axin-GSK-3 β svolge funzioni opposte tramite la fosforilazione della coda intracitoplasmatica del LRP6 e la fosforilazione della β -catenina. La prima funzione è di attivazione della Wnt pathway, la seconda una funzione inibente della stessa via. Fz e Dvl sembrano controllare l'equilibrio tra le funzioni positive e negative del complesso Axin-GSK-3 β . Rimane inoltre ancora da chiarire se queste funzioni opposte siano svolte dallo stesso complesso Axina-GSK3 β oppure da complessi diversi (Zeng e coll, 2008). Da quanto si evince dai meccanismi sopra descritti risulta chiaro che la via di segnalazione Wnt/ β -catenin è un processo altamente cinetico/dinamico piuttosto che un semplice meccanismo di acceso/spento (Giles e coll 2003; Zeng e coll, 2008; van Amerongen e Nusse, 2009). Questi meccanismi indotti dal legame Wnt-Fz causano la stabilizzazione della β -catenina e di conseguenza il suo accumulo nel citoplasma, permettendo a quest'ultima di entrare nel nucleo ed interagire con TCF/LEF inducendo la trascrizione dei geni target (Fig 1). In assenza del segnale canonico Wnt la β -catenina viene fosforilata a livello di 4 residui amino-terminali (Behrens e coll, 1998; van Noort e coll, 2002) venendo così marcata per poter essere riconosciuta dalla proteina contenente ripetuti β -transductin (β -TrCP), componente del complesso ubiquitin ligasi E3, seguito dalla degradazione ad opera del complesso proteasome 26S (Kitagawa M e coll, 1999; Liu C e coll, 2002;). La GSK-3 β è attiva nelle cellule non stimolate in riposo. Prima della fosforilazione ad opera della GSK-3 β la CK1 α fosforilizza la β -catenina su Ser-45 creando un sito necessario e sufficiente alla GSK-3 β per fosforilare la β -catenina sul Thr-41, Ser-37, Ser-33 (Amit e coll, 2002; Yanagawa e coll, 2002). Il sistema di degradazione della β -catenina è composto da GSK-3 β , Axin, e la proteina Adenomatose poliposis coli (APC). Axin e APC formano una struttura di degradazione che permette la GSK-3 β di fosforilare la β -catenina ed anche l'APC e l'Axina stessa. Axina sembra fungere da supporto per sorreggere insieme GSK-3 β , CK1 α , APC e la β -catenina, stimolando la fosforilazione e regolando così le concentrazioni citoplasmatiche e nucleari della β -catenina (Giles e coll, 2003). L'importanza della funzionalità dell'Axina è stata dimostrata in studi che hanno rilevato mutazioni di Axin1 che portano ad accumuli nucleari di β -catenina in cellule di carcinomi epatocellulari. Il trasferimento tramite adenovirus del gene non mutato in queste cellule è stato in grado di abbassare l'accumulo intracellulare

di β -catenina e diminuire l'attività trascrizionale mediato dal β -catenin/TCF/LEF (Kikuchi, 2003). Adenomatose poliposis coli protein (APC) è una grossa proteina (312 kDa) che interagisce con almeno altri dieci partner proteici incluso la β -catenina e l'Axina (Giles e coll, 2003; Zeng e coll, 2008). Questa proteina ha funzioni multiple nella migrazione e adesione cellulare, nella regolazione del ciclo cellulare e nella stabilità dei cromosomi (Giles e col, 2003). Nella Wnt pathway l'APC si lega alla β -catenina ed è necessaria per la sua degradazione. In aggiunta del suo ruolo strutturale nel complesso di degradazione della β -catenina l'APC cattura ed accompagna la β -catenina nucleare al meccanismo di degradazione citoplasmatico (Giles e coll, 2003). L'APC non è assolutamente indispensabile alla degradazione della β -catenina in quanto una iper-espressione dell'Axina puo compensare la sua mancante funzionalità (Nakamura e coll, 1998; Hart e coll, 1998). L'inclusione dell'APC nel complesso di degradazione risulta in una presentazione migliorata della β -catenina alla GSK-3 β portando ad una fosforilazione più efficiente e di conseguenza una degradazione più efficiente (Giles e coll, 2003). La β -catenina è l'ortologo mammifero della proteina Arm della *Drosophila* ed è il mediatore chiave della Wnt pathway. È stata originariamente identificata come componente degli adherens junctions dove lega le E-cadherine alla α -catenina e poi al reticolo di actina dello citoschelettro. In aggiunta al suo ruolo chiave di mediatore del segnale Wnt la β -catenina è una componente essenziale dei sistemi di adesione (desmosomi) tra cellule (Giles e coll. 2003; Akiyama, 2000; Xu and Kimelman, 2007). Strutturalmente la β -catenina è composta di una regione centrale costituita da 12 frammenti ripetuti di tre eliche ciascuno (chiamati the armadillo repeats), formando una super-elica di eliche (Huber e coll, 1997). Questa struttura accoglie i siti di legame dei molti fattori che interagiscono con la β -catenina, come il TCF, la cadherina, APC, Axin, e altri (Graham e coll. 2000, 2002; Huber e coll, 2001; Spink e coll, 2001). La maggior parte dei partner della β -catenina legano i residui di lisina nei frammenti 5 e 8, che gli autori hanno chiamato "bottoni carichi" in quanto questi giocano il ruolo principale durante il legame della β -catenina con i suoi partner tramite interazioni elettrostatiche (Graham e coll, 2000). Le regioni terminali N- e C- sono molto più piccoli e flessibili e interagiscono principalmente con i fattori di attivazione della trascrizione (Kimmelman e Xu 2006).

Nel Nucleo

Il terminale carbonico della β -catenina contiene un dominio di transattivazione. La β -catenina non si lega direttamente al DNA, ma è un cofattore essenziale per i fattori di trascrizione TCF/LEF. L'interazione della β -catenina con altre proteine nucleari (ICAT, Chibby, CREB-binding protein, legless, BCL9 e pygopus) influenza ulteriormente la sua attività (Giles et al, 2003; Xu e Kimelman, 2007). Nell'uomo la famiglia dei fattori di trascrizione TCF/LEF è composta da quattro membri: TCF1, LEF1, TCF3 e TCF4. I fattori T-cell 1 (TCF1) e lymphoid enhancing factor 1 (LEF1) sono stati identificati in origine come fattori di trascrizione specifici per i linfociti T (Travis e coll, 1991, Giles et al 2003). Queste proteine contengono un gruppo altamente mobile il quale lega il DNA in modo sequenza-specifico (Giese e coll, 1992; Giles e coll, 2003). I TCF devono legare la β -catenina per iniziare la transattivazione (Molenaar e coll, 1996, Giles e coll, 2003). In assenza del segnale Wnt, TCF/LEF legano una famiglia di repressori della trascrizione chiamati Grg o proteine Groucho. Questi repressori della trascrizione reprimono attivamente la trascrizione dei geni target dei TCF/LEF reclutando deacetilasi degli histoni le quali di seguito agiscono condensando la cromatina (Brantjes e coll, 2001; Chen e coll, 1999; Giles e coll 2003). I geni target del complesso β -catenina-TCF/LEF meglio studiati sono, *Xenopus siamosis* e *Twin* (Akiyama e coll, 2000). Negli ultimi anni la Wnt pathway ha suscitato un enorme interesse nel mondo accademico, ragione per cui gli studi su questo argomento si sono moltiplicati. Attualmente la lista dei geni target del complesso β -catenina-TCF/LEF si è enormemente allargata come da tabella seguente. Per una lista completa dei geni target della Wnt pathway (che viene qui sotto riportata) si può fare riferimento al sito <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>.

Gene	Organisms/system	Direct/Indirect	up/down
c-myc	human colon cancer	yes	up
n-myc	mesenchyme limbs		up
Cyclin D	human colon cancer	yes	up
Tcf-1	human colon cancer	yes	up
LEF1	human colon cancer	yes	up
PPARdelta	human colon cancer	yes	up
c-jun	human colon cancer	yes	up
fra-1	human colon cancer	yes	up
uPAR	human colon cancer	?	up
matrix metalloproteinase MMP-7	human colon cancer	yes	up
Axin-2	human colon cancer	yes	up
Nr-CAM	human colon cancer	yes	up
ITF-2	human colon cancer	yes	up
Gastrin	human colon cancer	?	up

CD44	human cancer	colon	?	up
EphB/ephrin- B	human cancer	colon	?	up/down
BMP4	human cancer	colon	?	up
claudin-1	human cancer	colon	yes	up
Survivin	human cancer	colon		up
VEGF	human cancer	colon	yes	up
FGF18	human cancer	colon	yes	up
Hath1	human cancer	colon		down
Met	human cancer	colon		up
endothelin-1	human cancer	colon		up
c-myc binding protein	human cancer	colon	yes	up
L1 neural adhesion	human cancer	colon		up
Id2	human cancer	colon	yes	up
Jagged	human cancer	colon		up
Tiam1	Colon tumors			
Nitric Oxide Synthase 2	Hepg2 cells			up

Dickkopf	Various cells, tumors		up
FGF9	ovarian endometrioid adenocarcinoma		up
FGF20	Various cells, tumors		
LGR5/GPR49	Intestine	yes	up
Sox9	Intestine		up
Sox9	Mesenchyme		down
Runx2	Chondrocytes		up
Gremlin	Fibroblasts		up
SALL4			
RANK ligand	Osteoblasts		down
CCN1/Cyr61	Osteoblasts		up
Sox2	Xenopus retina		up
Pituitary tumor transforming gene (PTTG)	esophageal squamous cell carcinoma		
Delta-like 1	Somites		
FoxN1	Thymus	?	yes
matrix metalloproteinase-26	Human		
nanog	ES		
Oct 4	ES		up
snail	ES/EB		up
Fibronectin	ES/EB		up
Frizzled 7	EC cells	yes	up

Follistatin	EC cells, ovary	yes	up
Wnt3a	EC cells		
Fibronectin	Mouse lung		up
Islet1	Cardiac cells		up
MMP2, MMP9	T cells		
Siamois	Xenopus	yes	up
fibronectin	Xenopus	yes	up
BMP4	Xenopus	?	down
myogenic bHLH	Xenopus	?	up
engrailed-2	Xenopus	yes	up
Xnr3	Xenopus	yes	up
connexin43	Xenopus, Mouse	yes	up
twin	Xenopus	yes	up
connexin 30	Xenopus	?	
retinoic acid receptor gamma	Xenopus	?	
dharma/bozoz ok	Zebrafish	yes	up
MITF/nacre	Zebrafish	yes	up
Stra6	Wnt-1 transformed mouse cells	? co-induced by Wnt plus RA	up
Wrch-1	Wnt-1 transformed mouse cells	? Not through TCF	up

TNF family 41BB ligand, ephrinB1, Stra6, autotaxin and ISLR	Wnt-1 transformed mouse cells	By Wnt plus retinoic acid	up
Twist	Wnt1 induced mammary cancer		up
Stromelysin	Wnt-1 transformed mouse cells		up
WISP	Wnt-1 transformed mouse cells	yes, but not through TCF	up
Brachyury	Mouse (Wnt- 3A)	yes	up
Proglucagon	Mouse	?	up
Osteocalcin	Mouse	yes	down
Cdx1	Mouse embryo		
cyclooxygenase-2	mouse (Wnt-1)	?	up
Irx3 and Six3	Mouse brain		
neurogenin 1	Mouse brain	yes	up
SP5	Mouse brain	yes	up
Nkx2.2	Neural tube	yes	down
WISP-1, WISP-2, IGF-II, Proliferin-2, Proliferin-3, Emp, IGF-I,	3T3-L1 Preadipocytes	?	up

VEGF-C, MDR1, COX- 2, IL-6			
Â periostin	Mouse Wnt-3	Â not through β - catenin?	down
Cdx1	Mouse Wnt- 3A	yes	up
Cdx4	Mouse Wnt-3A		
Cdx4	Zebrafish HSC	?	up
Â betaTrCP		independent of transcription	up
sFRP-2	Mouse (Wnt-4)	?	up
Pitx2	Pituitary	yes	up
EGF receptor	Liver		up
Eda (TNF- related)	Mouse hair follicle	?	up
E-cadherin	Mouse hair follicle	yes	down
E-cadherin	ES/EB		down
Keratin	Mouse hair follicle	yes	up
movo1	Mouse hair follicle	yes	up
Jagged1	Mouse hair follicle		up
P16ink4A	Melanocytes	yes	down
CTLA-4	Melanomas	yes	up
Â mBTEB2	Mouse	Â independe nt β -catenin	up

FGF4	Mouse tooth bud	yes	up
Interleukin8	Endothelial cells		
ret	rat PC12	?	up
connexin43	rat cardiomyocytes	?	up
versican	vascular smooth muscle cells	yes	up
Tnfrsf19	Somitic mesoderm	yes	up
Ubx	Drosophila	yes	up or down
wingless	Drosophila	?	up or down
Â Dpp	Drosophila	yes	down
Engrailed	Drosophila	?	up
Dfrizzled2	Drosophila	?	down
shavenbaby	Drosophila	?	down
stripe	Drosophila	yes	down
Nemo	Drosophila		up

Tab1. Vengono riportati i geni target della Wnt pathway e gli organi/sistemi nei quali sono stati studiati. Geni target diretti sono stati definiti quei geni con il sito di legame per il TCF.

Wnt pathway e la genesi tumorale

La genetica dello sviluppo e della formazione dei tumori è converso nell'identificazione di vie di segnalamento intra ed extracellulari regolate in modo aberrante durante lo sviluppo tumorale. Vie quest' ultime che assolvono un ruolo centrale durante lo sviluppo embrionale e l'omeostasi dei tessuti adulti (Kikuchi, 2003). La Wnt pathway è un ottimo esempio per questo. I geni della β -catenina, APC, e Axina nella Wnt pathway sono spesso mutati nei tumori dell'uomo e di altri mammiferi (Kikuchi, 2003; Rao e coll, 2008; Poutahidis e coll, 2008; Uva e coll, 2009). Nei tumori con una dimostrata attivazione della Wnt pathway il denominatore comune è l'attivazione della trascrizione dei geni dal complesso β -catenin/TCF. La β -catenina è abnormemente accumulata nel citoplasma e nel nucleo, e l'espressione dei geni mediata dai TCF è aumentata in questi tumori (Kikuchi, 2003, Tissier e coll, 2005). Dal momento che l'APC e l'Axina inducono la degradazione della β -catenina è deducibile che queste due molecole agiscono da onco-soppressori al contrario della β -catenina che agisce da oncogene (Kikuchi, 2003). Mutazioni dell'APC sono stati frequentemente trovati nella poliposi adenomatosa familiare del colon e nei tumori colo-rettali, ma sono rari in altri tumori (Morin e coll, 1997; Giles e coll, 2003; Polakis, 2007). La maggior parte delle mutazioni dell'APC risultano in una proteina troncata la quale manca dei siti di legame per l'Axina. In ogni caso, le mutazioni dell'APC sono fortemente associate con la regolamentazione della stabilità della β -catenina. La pressione selettiva è diretta contro la presenza dei siti che legano l'Axina in quanto la presenza di tali siti è critica nella regolamentazione della degradazione della β -catenina risultante dalla collaborazione tra Axina, APC e degli altri componenti del sistema di degradazione di tale molecola. Queste mutazioni dell'APC portano di conseguenza alla stabilizzazione e all'accumulo citoplasmatico e nucleare della β -catenina (Morin e coll, 1997; Polakis e coll, 2000; Kikuchi e coll 2003). Axina, come l'APC è un oncosoppressore in quanto entrambe queste molecole hanno un ruolo attivo nell'abbassare i livelli intracitoplasmatici della β -catenina. La funzione oncosoppressore dell'Axina è stata verificata dalla dimostrazione della sua inattivazione biallelica negli epatocarcinomi umani (Kikuchi, 2003, Park e coll, 2005). Queste mutazioni dell'Axina sono state trovate in epatocarcinomi con geni della β -catenina e dell'APC intatti. Tutte queste mutazioni generano una

proteina troncata nella quale manca il sito dove si lega la β -catenina, prevenendo così la sua degradazione. Mutazioni della Axina sono state trovate anche in altri tumori come il medulloblastoma (Huang e coll, 2000; Gilles e coll, 2003) e il carcinoma ovarico (Wu e coll, 2001). Alterazioni della β -catenina sono stati riscontrati nei tumori del colon, tumori gastrici, melanoma, medulloblastoma, tumori ovarici, tumori pancreatici, dell'ipofisi, delle ghiandole surrenali, pilomatricomi, adenocarcinomi polmonari, epatoblastomi nell'uomo ecc (Morin e coll, 1997; Akiyama 2000; Giles e coll, 2003; Kikuchi, 2003; Tissier e coll, 2005; Libe e coll, 2007; Polakis, 2007). Le mutazioni del gene della β -catenina CTNNB1 avvengono in residui aminoacidici specifici essenziali per la degradazione della β -catenina a livello dell'exon 3 (Morin coll, 1997; Giles e col, 2003; Kikuchi, 2003; Tissier e coll, 2005). Queste mutazioni coinvolgono gli aminoacidi D32, S33, G34,S37,T41,e S45. L'S45 è un sito di fosforilazione per la CK1 α e S33, S37, T41 sono siti di fosforilazione per la GSK-3 β . D32 e G34 sono necessari per l'interazione della β -catenina con la proteina F-box componente del sistema di degradazione ubiquitin ligase (E3). La β -catenina mutante non viene più fosforilata evitando la degradazione e causando il suo accumulo citoplasmatico/nucleare con conseguente attivazione della trascrizione dei geni target della Wnt pathway (Akiyama, 2000; Kikuchi, 2003; Giles e coll, 2003; Polakis, 2007). La crescita delle cellule animali è guidata da meccanismi che sono evoluti per formare e mantenere una massa e funzionalità ottimali degli organi interdipendenti. Le cellule tumorali sovvertono questi meccanismi e trasformano la loro crescita in un modello nutrient-limited (Kikuchi, 2003). La comprensione dei meccanismi di crescita fisiologici è di grande aiuto per la comprensione dei meccanismi di crescita tumorali. E' stato ormai dimostrato che le mutazioni genetiche della Wnt pathway sono il fulcro della fisiopatologia di molti tumori. La formazione dei tumori dovuta all'attivazione anormale della Wnt pathway risulta dall'attivazione inappropriata dei geni mediata dalla β -catenina stabilizzata. I geni target della Wnt pathway sono numerosi e molti di loro sono direttamente coinvolti nei meccanismi di crescita cellulare, proliferazione, differenziazione ed apoptosi (Kikuchi, 2003; Giles e coll, 2003 Polakis, 2007). Nonostante i primi studi sulla Wnt pathway siano stati condotti su animali, il coinvolgimento della Wnt pathway nella fisiopatologia dei tumori negli animali domestici è stata studiata in misura molto

minore in confronto all'uomo. Rao e coll, 2008 hanno studiato l'espressione genetica di diverse linee cellulari di tumori mammari nei cani, trovando un'attiva Wnt pathway nella linea cellulare P114 (linea cellulare di tumore mammario). In un altro case report è stato rilevato l'accumulo citoplasmatico/nucleare della β -catenina in un choriocarcinoma gastrico in un cane . Gli autori hanno trovato un pattern immunoistochimico normale per l'APC ed un aumento dell'espressione di uno dei geni target della Wnt pathway, il c-myc (Poutahidis e coll, 2008). Da quanto si evince da sopra la Wnt pathway può rappresentare una via di segnalamento intracellulare di grande interesse per la clinica degli animali da compagnia.

Capitolo III

La Wnt pathway nei tumori delle ghiandole surrenali in cani con ipercortisolismo surrenalico e in surrenali normali.

I tumori delle ghiandole surrenali secernenti autonomamente glucocorticoidi sono la causa di 15-20% dei casi di ipercortisolismo nei cani (Feldman, Nelson, 2004). Questi tumori sono principalmente monolaterali, quelli bilaterali sono rari. È stata inoltre riportata la co-esistenza dei tumori ipofisari e surrenalici (Greco e coll., 1999). Le ghiandole, destra e sinistra sono ugualmente affette. La classificazione in adenomi o carcinomi risulta spesso difficoltosa in assenza di metastasi o di ovvia invasione di tessuti adiacenti come ad esempio la vena cava caudale. Con la presente classificazione istologica nel cane i carcinomi sembrano essere più frequenti (Anderson e coll, 2001; Kyles e coll, 2003; Labelle e coll, 2004; Schwartz coll, 2008). Non sono state riportate differenze nei tempi di sopravvivenza tra i cani con o senza trombi tumorali o tra adenomi e carcinomi (Anderson e coll, 2001; Kyles e coll, 2003; Schwartz e coll, 2008). L'adrenalectomia è considerata il trattamento di scelta per l'ipercortisolismo surrenalico. I cani che sopravvivono all'immediato periodo postoperatorio hanno una buona prognosi a lungo termine indipendentemente dalla diagnosi istologica (Schwartz e coll, 2008). Nonostante la buona prognosi per un tempo di sopravvivenza lungo, sono tuttavia stati riportati alti tassi di complicazioni postoperatorie ed alti tassi di mortalità nell'immediato postoperatorio (Anderson e coll, 2001; Kyles e coll, 2003; Schwartz e coll, 2008). La patogenesi di questi tumori nel cane non è stata ancora chiarita. L'analisi della clonalità tumorale è importante per determinare l'origine cellulare della neoplasia e per identificare i meccanismi coinvolti nella progressione tumorale. La monoclonalità indica che la progressione tumorale è il risultato finale di una mutazione genetica intrinseca. La policlonalità suggerisce che le cellule tumorali sono influenzate da stimoli locali o sistemici. L'analisi del modello di inattivazione del cromosoma X in tessuti di femmine eterozigote ha rivelato che i carcinomi corticosurrenalici consistono in popolazioni cellulari monoclonali, i tumori benigni invece possono essere sia monoclonali che policlonali (Beuschlein e coll. 1994, Gicquel e coll.

1994). Nell'ultimo decennio in medicina umana sono stati fatti avanzamenti significativi nella comprensione della patogenesi dei tumori corticosurrenali. Tali progressi sono derivati principalmente dallo studio della genetica dei tumori corticosurrenali sia a livello germinativo in rare patologie ereditarie sia a livello somatico studiando le alterazioni molecolari nei tumori sporadici. Tutti questi progressi sottolineano l'importanza delle alterazioni genetiche nello sviluppo dei tumori corticosurrenali e indicano diverse regioni cromosomiche (2, 11p15, 11q, 17p13) e geni coinvolti (IGF-II, p53, β -catenin, recettore per ACTH). I geni coinvolti in queste alterazioni molecolari possono essere classificati in geni onco-spressori e oncogeni (Libe R, 2007). Studi molecolari hanno individuato mutazioni attivanti della Wnt pathway come causa di molti tumori (Kikuchi, 2003; Giles e coll, 2003; Tissier e coll, 2005; Polakis, 2007). La via di segnalazione cellulare Wnt è normalmente attivata durante lo sviluppo embrionale. Questa via gioca un ruolo importante in molti processi di sviluppo, inclusi la formazione dell'asse del corpo, lo sviluppo del sistema nervoso centrale, la specificazione assiale nello sviluppo degli arti, il rinnovamento omeostatico dei tessuti adulti ecc (Akiyama, 2000). La β -Catenina gioca un ruolo importante nella Wnt pathway. Questa molecola ha un ruolo strutturale nell'adesione cellulare ed è un cofattore di trascrizione insieme al TCF/LEF nella Wnt pathway. In assenza del segnale Wnt il livello della β -catenina è basso. La β -catenina viene fosforilata al livello del residuo terminale NH₂ dalla casein kinase 1 α (CK1 α) alla Serina 45 (S45) e Glicogen sintasi kinase-3 β (GSK3- β) alla T41, S33 e S37. Queste chinasi sono parte del complesso proteico composto dalla Axina e APC. In seguito la β -catenina fosforilata viene degradata dalla sistema ubiquitin-proteasome. In presenza del segnale Wnt la fosforilazione della β -catenina viene inibita. Questo, porta alla sua accumulazione nel citosol, permettendo così la sua migrazione al nucleo dove si lega al TCF/LEF ed insieme attivano la trascrizione dei geni target della via Wnt canonica (Xu e coll, 2007). Tra le varie molecole coinvolte in questa via di segnalazione sono state trovate frequenti alterazioni della β -catenina, APC ed Axina in molti tumori dell'uomo (Kikuchi A, 2003, Giles e coll, 2003; Tissier e coll, 2005). La dimostrazione di un attivo segnale β -cateninico nel tumore è il rilevamento dell'acumulo citoplasmatico/nucleare della β -catenina nelle cellule tumorali tramite anticorpi marcati diretti contro questa molecola (Giles e coll.,

2003). In uno studio condotto da Tissier e coll. (2005), gli autori hanno rilevato che nei tumori corticosurrenali dell'uomo è frequente un accumulo citoplasmatico/nucleare anormale della β -catenina. Tuttavia, esistono delle differenze tra questi tumori con un accumulo anormale di β -catenina. L'immunostaining anormale della β -catenina è stato focale nella maggior parte degli adenomi e diffusa nei carcinomi corticosurrenali. Questa localizzazione anormale della β -catenina è stata inoltre osservata anche nelle cellule H295R (linea cellulare di tumore corticosurrenalico) (Tissier e coll, 2005). In uno studio più recente gli autori hanno rilevato mutazioni della β -catenina in 5 dei 33 adenomi corticosurrenali e 4 di questi sono risultati essere adenomi funzionali (Tadjine e coll., 2007). Inoltre, Bläker e coll, (2004) hanno riportato una mutazione dell'APC in un adenoma corticosurrenalico con dimostrato accumulo di β -catenina nel citoplasma. Se si escludono gli studi condotti sui tumori mammari e un singolo caso di coriocarcinoma gastrico con dimostrata Wnt attivata e accumulo di β -catenina, si può affermare che tali tipi di studi sono pressoché assenti nella medicina canina. (Rao e coll, 2008; Poutahidis e coll, 2008). Il progresso nella comprensione della patofisiologia dei tumori corticosurrenali nel cane risulta utile per scopi diagnostici, prognostici e terapeutici. L'obiettivo di questo studio è stato quello di investigare la via di segnalazione Wnt nei tumori cortico-surrenali e nelle surrenali di cani sani.

Materiali e Metodi

Un gruppo di ghiandole surrenali di cani sani ed un gruppo di tumori surrenali sono stati usati per l'analisi dell'espressione della β -catenina. Le ghiandole surrenali (8) e le neoplasie (23) sono state raccolte negli anni precedenti per scopi di ricerca all'Università di Utrecht "Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University" The Netherlands. Tutti i tumori sono stati raccolti in sede operatoria da cani con sindrome di Cushing (ADH). La diagnosi di ipercortisolismo surrenalo-dipendente è stata fatta in seguito all'esame clinico, gli esami di laboratorio ematobiochimici, UCCR, il test di soppressione ad alte dosi di desametasone e l'esame ecografico delle surrenali. Nove dei tumori surrenali sono stati

classificati come adenomi. Dieci dei 23 tumori surrenalici sono stati classificati come carcinomi da patologi diversi. Quattro dei tumori surrenalici sono stati classificati sia come adenomi sia come carcinomi da patologi diversi. Le ghiandole sane sono state prelevate in sede autoptica per scopi di ricerca. Sono state classificate sane in seguito all'esame istologico delle stesse.

Immunoistochimica

Campioni di tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni di 5 μ M e messi su vetrini rivestiti di poly-l-lysine (Sigma The Netherlands), deparaffinizzati e reidratati. La colorazione immunoistochimica è stata eseguita usando il metodo avidin-biotin-perossidasi. Per il recupero dell'antigene le sezioni sono state immerse in una soluzione di 10 mM citrate buffer (PH 6.0) e bollite in microonde a 1000 W per 3 min. Le sezioni sono state deidratate e l'attività endogena della perossidasi è stata bloccata incubando i campioni con 1% H₂O₂ in una soluzione di metanolo al 100% per 30 min. In seguito i campioni sono stati reidratati e lavati 3 volte con PBS. I legami anticorpali non specifici sono stati bloccati pre-incubando i campioni con una soluzione al 3% di BSA contenente 0,025% (v/v) TritonX in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi di coniglio anti- β -catenina umana policlonali (AB2982; Abcam UK) per i quali è stato riportato che riconoscono la β -catenina canina, sono stati usati come anticorpi primari. Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari (diluzione 50x) per 90 min a temperatura ambiente. In seguito i vetrini sono stati risciacquati 2 volte (5 min per volta) in PBS+ 0.025% (v/v) Triton X-100 e incubati con anticorpi secondari caprini anti-coniglio biotinilati (K4004; Dako, Denmark). I vetrini sono stati lavati 2 volte (5 min per volta) in PBS e poi asciugati. In seguito i vetrini sono stati incubati in 200 μ l di soluzione DAB (Sigma) per 5 min inseguito da un breve risciacquo in acqua. I campioni sono stati colorati con l'ematosilina di Mayer per 1-2 sec, deidratati in etanolo e xilene, e ricoperti con un copri oggetto usando l'Eukitt. I controlli negativi sono stati fatti sostituendo gli anticorpi di coniglio con siero di coniglio normale. I controlli positivi sono stati carcinomi coloretali con conosciute mutazioni attivanti della via di segnalazione Wnt.

L'isolamento del RNA e la sintesi del cDNA

L'RNA totale dai tumori surrenalici è stato isolato dai campioni conservati a -80 C°, usando il mini kit RNeasy (Qiagen, The Netherlands) secondo le istruzioni del produttore. La sintesi del cDNA è stata fatta da 1.5 µg RNA totale in volumi di reazione di 60 µl usando il kit iScript™ per la sintesi del cDNA secondo il protocollo del produttore (Bio-rad, The Netherlands). I primers sono stati progettati usando il software primer select DNA star (Madison, WI) secondo i parametri indicati nel manuale Bio-Rad i-cycler. La specificità di ciascun paio di primer è stata confermata sequenziando i loro prodotti.

L'analisi di sequenziamento dei Nucleotidi

I primer per la polymerase chain reaction (PCR) sono stati disegnati per amplificare un frammento di 448-bp dell'exone 3 del gene della β -catenina, includendo la sequenza dei siti di fosforilazione del gene della β -catenina che avrebbe potuto contenere le mutazioni descritte in precedenza (Tissier et al., 2005; Tadjine et al., 2008). I primer includevano sense primer: (intron 2) forward 5'AGAAAAGCAGCTGTTAGTCAC3', e antisense primer (intron 3) 5'CCACCTGGTCCTCATCATTTA3'. La PCR è stata eseguita utilizzando TAQ DNA polimerase (Invitrogen) in un volume finale di 50µl contenente 0.3 µM di ciascun primer, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ e 0.05 U/µl TAQ polimerase. Il programma di PCR è stato: 4 min denaturazione a 94°C, seguito da 35 cicli di amplificazione (94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min) e terminato con 10 min a 72°C. Per il sequenziamento i prodotti sono stati purificati usando il kit di purificazione QIAquick PCR (Qiagen) ed amplificati con il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I prodotti sono stati filtrati con Sephadex G-50 Superfine (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) e sequenziati usando l'ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La sequenza ottenuta è stata paragonata con il database di NCBI con il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Risultati

L'espressione della β -catenina. La dimostrazione di un attivo segnale β -cateninico nel tumore è il rilevamento dell'accumulo citoplasmatico/nucleare della β -catenina nelle cellule tumorali tramite anticorpi marcati diretti contro questa molecola (Giles e coll, 2003). La colorazione immunoistochimica per la β -catenina è stata osservata in tutti i campioni, tuttavia sono state osservate delle differenze nell'intensità e nella distribuzione della colorazione tra le surrenali normali e neoplastiche. Nelle surrenali sane l'intensità della colorazione è risultata minima in due e moderata in sei. La colorazione è stata limitata alla zona glomerulosa con localizzazione citoplasmatica/nucleare nelle surrenali sane (Fig 5). La colorazione immunoistochimica dei tumori ha rilevato una colorazione diffusa in 60% (14 su 23) dei tumori, con intensità forte nel 47% dei casi (11 su 23). Nove dei tumori surrenalici erano stati classificati come adenomi. In 55% (5 su 9) dei casi l'intensità della colorazione era intensa ed in 45% (4 su 9) dei casi è risultata moderata. In circa 66% (6 su 9) degli adenomi la colorazione si presentava diffusa con localizzazione cellulare citoplasmatica/nucleare, nei rimanenti tre, invece, è risultata limitata alla zona glomerulosa con localizzazione cellulare citoplasmatica/nucleare in tutti gli adenomi (Fig 6). Dieci dei 23 tumori surrenalici erano stati classificati come carcinomi. Nel 50% (5 su 10) l'intensità della colorazione immunoistochimica è risultata intensa (Fig 7), nel 40% (4 su 10) moderata, ed in un caso minima. In 70% (7 su 10) dei carcinomi la colorazione è risultata diffusa con localizzazione citoplasmatica nucleare (Fig7), mentre nel restante 30 % (3 su 10) la colorazione si limitava alla zona più esterna con localizzazione cellulare citoplasmatica/nucleare. Quattro dei tumori surrenalici sono risultati difficili da classificare dal momento che diversi patologi non concordavano nel definirli adenomi piuttosto che carcinomi. In due di questi tumori l'intensità della colorazione immunoistochimica è stata moderata, in uno è risultata intensa ed in uno da minima ad aspecifica. Nel 75% di questi la colorazione è risultata focale ed in uno diffusa. La localizzazione cellulare della colorazione è risultata citoplasmatico/nucleare in 3 ed aspecifica in uno dei tumori.

Risultati Immunoistochimici

Numero del Paziente	Tipo di campione	Espressione della β -catenina
1	Surrenale Normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
2	Surrenale normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
3	Surrenale normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
4	Surrenale normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
5	Surrenale normale	+, minima, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
6	Surrenale normale	+, minima, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
7	Surrenale normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
8	Surrenale normale	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
	Adenomi	
9	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, zona glomerulosa
10	- Crescita vascolare	+,

	- Invasione capsulare	intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
11	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
12	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
13	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
14	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, limitato alla zona più esterna
15	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffusa
16	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare localizzato nella zona più esterna
17	- Crescita vascolare - Invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, diffuso
	Carcinomi	
18	- Crescita vascolare + invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
19	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, diffuso
20	+ crescita vascolare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare,

	+ invasione capsulare	diffuso
21	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
22	+ crescita vascolare - invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
23	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, diffuso
24	Crescita vascolare sospettata - invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, diffuso
25	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare, diffuso
26	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, minima, citoplasmatico/nucleare, focale
27	- crescita vascolare + invasione capsulare	+, moderata, citoplasmatico/nucleare localizzato nella più zona esterna
	Adenomi/Carcinomi	
28	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, moderato, citoplasmatico/nucleare localizzato nella zona più esterna
29	+ crescita vascolare + invasione capsulare	+, intenso, citoplasmatico/nucleare, focale
30	- crescita vascolare	+, moderato,

	+ invasione capsulare	citoplasmatico/nucleare, diffuso
31	Crescita vascolare sospettata + invasione capsulare	+, minima, aspecifica, focale

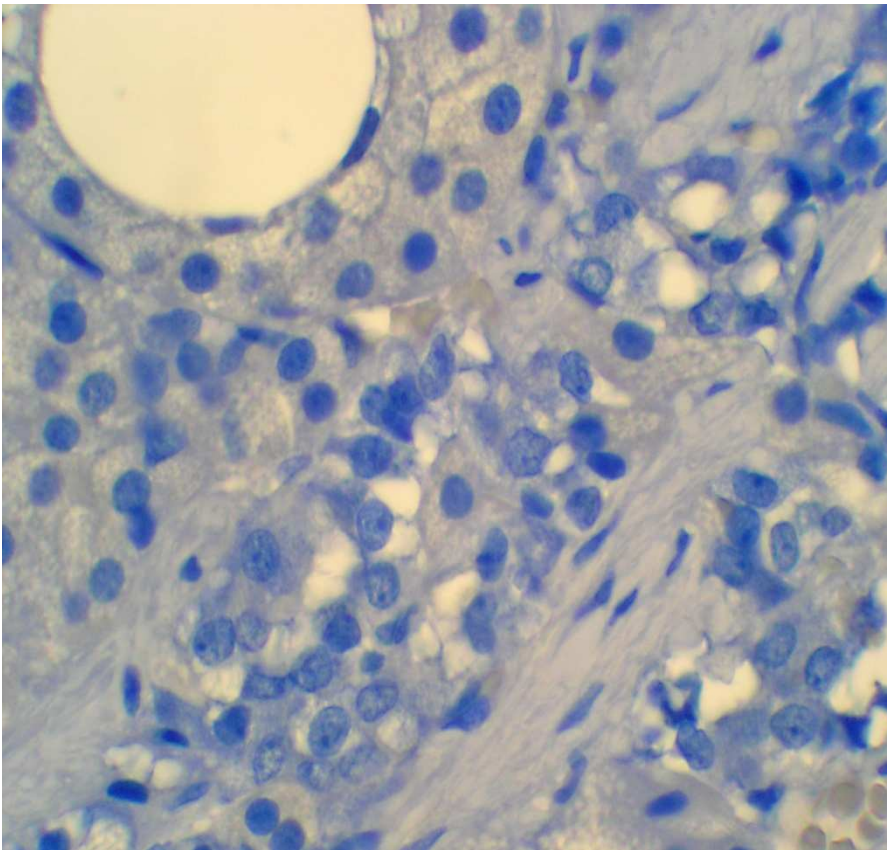


Fig 3. Controllo negativo, pancreas canino.

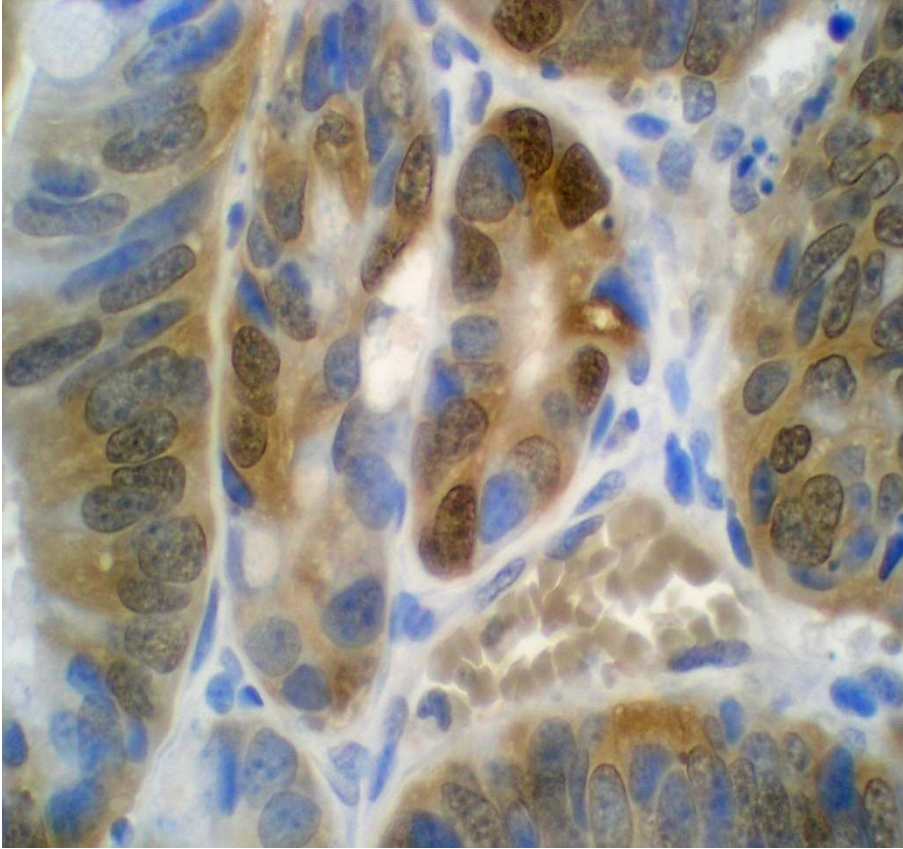


Fig 4.Controllo positivo (Carcinoma coloretale). Tumore del colon con dimostrata mutazione dell'APC. Si noti la colorazione intensa del citoplasma e dei nuclei delle cellule tumorali. La colorazione intensa citoplasmatico/nucleare per la beta-catenina indica l'attività della Wnt pathway in questo tumore.

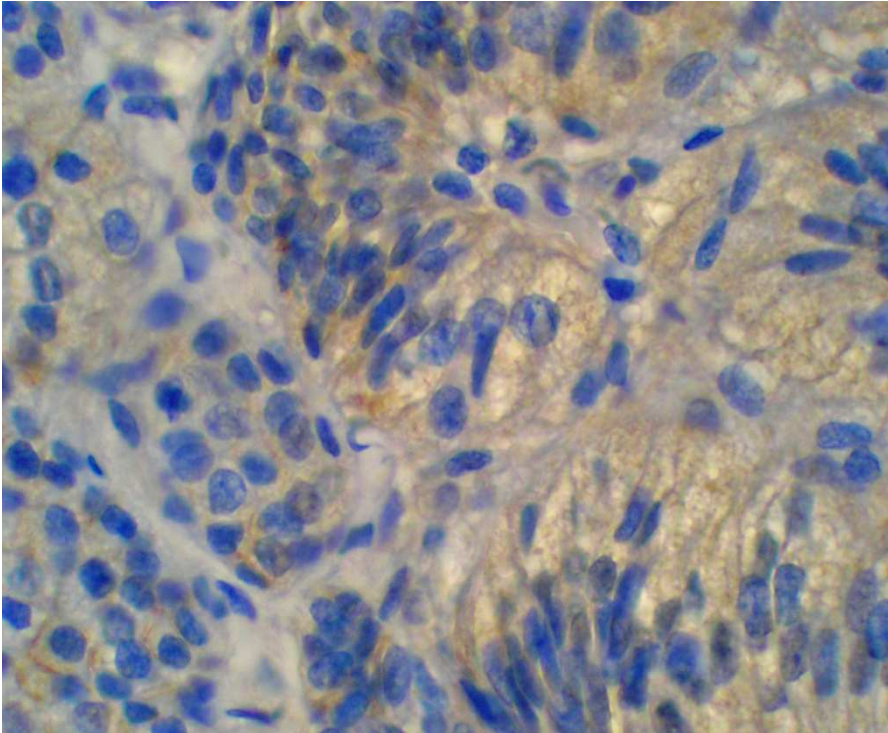


Fig 5. Preparato di corticale del surrene normale di cane. Si noti la colorazione del citoplasma soprattutto nelle cellule della zona glomerulosa. Cellule queste ultime con una nota intensa attività proliferativa. In tutte le surrenali sane la colorazione per la Beta-catenina è stata localizzata nella zona glomerulosa.

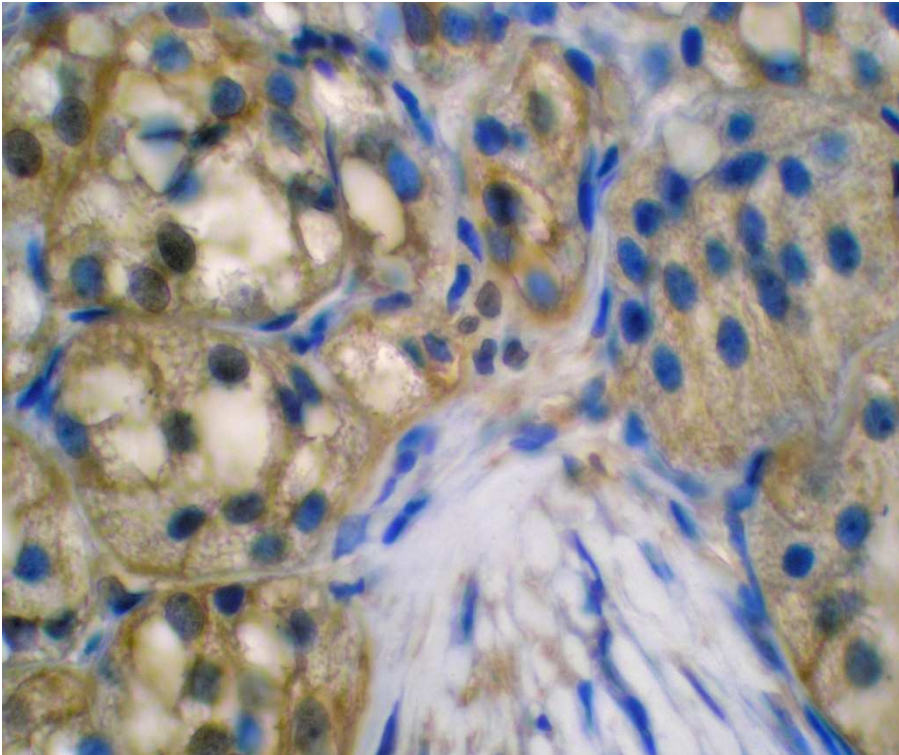


Fig 6. Preparato di adenoma corticosurrenale. Si noti la colorazione più intensa e più diffusa in confronto alle surrenali sane sia dei citoplasmici che dei nuclei di alcune delle cellule adenomatose. Inoltre in 66% degli adenomi la colorazione è risultata essere diffusa.

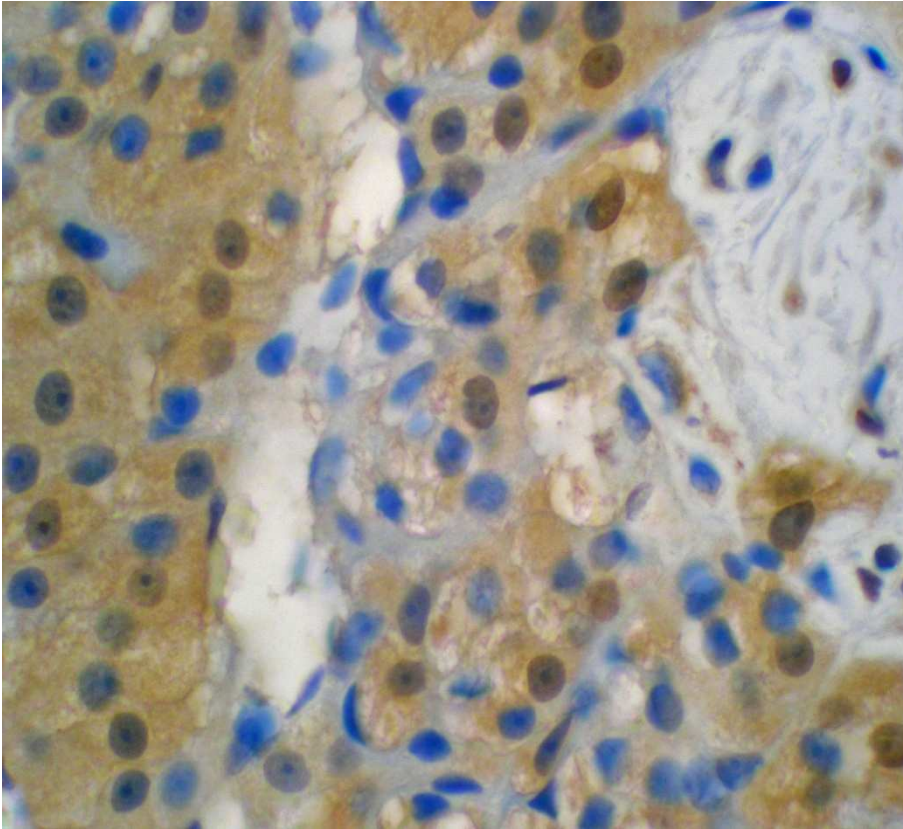


Fig 7. Preparato di carcinoma corticosurrenale. Si noti la colorazione intensa dei nuclei cellulari che dimostra l'attivazione della Wnt pathway. In 70 % dei carcinomi corticosurrenali la colorazione immunostochimica per la beta-catenina è risultata essere diffusa.

La sequenza della c DNA della β -catenina

La colorazione immunostochimica ha dimostrato delle differenze fra surrenali neoplastiche e sane. Poiché sono state osservate delle differenze nella colorazione è stato eseguito il sequenziamento della c DNA della β -catenina. Non sono state osservate delle mutazioni attivanti la via di segnalazione Wnt nel gene della β -catenina. Si è osservato un polimorfismo del gene al nucleotide 350 in confronto con il gene della β -catenina catalogato nel NCBI. Questo polimorfismo si è osservato sia nei tumori che nelle ghiandole sane.

Discussione

La corticale delle surrenali nell'adulto è composta di tre strati concentrici (zona glomerulosa, zona fasciculata, e zona reticularis) ciascuna con proprietà steroidogeniche specifiche. La zona glomerulosa non è solo specializzata nella produzione dell'aldosterone ma è anche un sito importante di proliferazione cellulare. Inoltre, la zona glomerulosa, assieme alla capsula e/o la zona intermedia sono considerate come regioni progenitrici della corteccia delle surrenali (Vinson, 2003; Otis e coll, 2007). L'attività proliferativa della zona glomerulosa (sia di topi che umana) è stata altresì confermata da studi in vitro dove le colture cellulari di cellule della zona glomerulosa hanno rivelato la loro propensione proliferativa raddoppiando il loro numero entro 3 giorni in medium contenente soltanto siero fetale al 2% (Gallo-Payet e coll, 1996,1993). In aggiunta, le cellule della zona glomerulosa hanno l'abilità di adattare la loro morfologia in relazione alle condizioni ambientali, come durante diete carenti di Na, dove la proliferazione cellulare e lo spessore della zona glomerulosa risultano aumentati (Aguilera e Catt,1983). La via di segnalazione cellulare Wnt è normalmente attivata durante lo sviluppo embrionale. Questa via gioca un ruolo importante in molti processi di sviluppo, inclusi la formazione dell'asse del corpo, lo sviluppo del sistema nervoso centrale, la specificazione assiale nello sviluppo degli arti, il rinnovamento omeostatico dei tessuti adulti ecc (Akiyama T, 2000; Giles e coll. 2003). La colorazione immunohistochimica per la β -catenina delle surrenali sane conferma il coinvolgimento della via di segnalazione Wnt e della β -catenina nei processi di rinnovamento omeostatico dei tessuti sani. La localizzazione della colorazione nella zona glomerulosa potrebbe essere dovuta proprio alla propensione proliferativa che caratterizza questa zona in confronto alle altre due aree della corticale surrenalica. Le differenze nelle intensità della colorazione tra le surrenali normali potrebbero essere dovute ad un errore interpretativo (vista la soggettività di tale parametro), al fatto che le surrenali sane potrebbero essersi trovate, in momenti diversi della proliferazione normale; non è escluso che la dieta dei singoli soggetti possa aver avuto un ruolo in tale differente distribuzione in quanto diete carenti di sodio possono influenzare lo spessore e l'attività proliferativi della zona glomerulosa del surrene (Aguilera e Catt,1983). La colorazione immunohistochimica dei campioni ha presentato delle differenze marcate tra le

surrenali sane e i tumori. In tutte le surrenali sane la colorazione immunohistochimica è stata localizzata nella zona glomerulosa, di contro, la colorazione del 60% dei tumori è risultata diffusa, dato indicativo di un anormale accumulo di β -catenina nelle zone dove di norma non si trova. La colorazione diffusa di queste zone indica un'aumentata proliferazione cellulare in queste aree, in accordo con lo stato patologico tumorale dei campioni. Per quanto riguarda la localizzazione cellulare della colorazione dei campioni, è possibile che una localizzazione citoplasmatica della β -catenina porti alla sua migrazione nel nucleo con la conseguente attivazione dei geni target della Wnt pathway. Di conseguenza non è stata fatta la classificazione della localizzazione cellulare della colorazione in citoplasmatico o nucleare, in quanto citoplasmatico è stato interpretato anche come nucleare. Nonostante queste considerazioni, in molti dei campioni, soprattutto carcinomi, la presenza della β -catenina nel nucleo delle cellule tumorali risulta ben evidenziata. Nello studio di Tissier e coll, 2005 condotto su tumori delle surrenali umane, gli autori hanno rilevato una maggiore frequenza della colorazione diffusa per la β -catenina nei carcinomi, in accordo con la loro natura maggiormente proliferativa/invasiva. Nel nostro studio la colorazione dei carcinomi è risultata diffusa nel 70% dei casi ed in 66% degli adenomi. Deve comunque essere tenuto in considerazione il minor numero degli adenomi esaminato. Nel nostro caso non sono state rilevate delle grosse differenze nella frequenza di un'abnorme colorazione immunohistochimica tra adenomi e carcinomi delle surrenali dei cani esaminati. In relazione all'intensità della colorazione, questo parametro è molto soggettivo ed i numeri dei campioni non sufficientemente elevati per poter produrre delle differenze statisticamente significative. La colorazione abnorme dei tumori surrenalici per la β -catenina indica una via di segnalazione Wnt attivata in buona parte di questi tumori. Nei tumori delle ghiandole surrenali dell'uomo la mutazione nel gene della β -catenina è stata un'anomalia frequentemente riscontrata (Tissier e coll, 2005; Tadjine e coll, 2008). Tissier e coll hanno trovato mutazioni del CTBBN1 nel 28 % (11 su 39) dei tumori corticosurrenali studiati. La maggior parte delle mutazioni sono state mutazioni alteranti Ser 45 nell'exon 3 risultanti in una sostituzione amminoacidica. Negli altri tumori sono stati osservati delezioni ed inserzioni alteranti l'exon 3. Queste alterazioni genetiche sono state osservate sia negli adenomi che nei carcinomi, ma soltanto nei tumori con una

colorazione immunoistochimica anormale per la β -catenina. In un altro studio condotto da Tadjine e coll, 2008 su 53 tumori corticosurrenali, gli autori hanno osservato mutazione del CTBBN1 in 15 % (5 su 33) degli adenomi studiati ma non hanno riscontrato mutazioni nei carcinomi studiati. In entrambi questi studi le mutazioni riscontrate sono state a livello somatico, quindi riscontrate soltanto nei tessuti tumorali. Nel nostro studio non sono state riscontrate mutazioni del CTBBN1. E' stato riscontrato invece un polimorfismo di questo gene al nucleotide 350. Tuttavia, tale polimorfismo non comportava il cambiamento dell'ordine degli amminoacidi nella molecola della β -catenina. Tale polimorfismo è stato osservato sia nei tumori che nei tessuti sani indicando una diversità intra-specie. L'abnorme colorazione immunoistochimica per la β -catenina nei tumori delle surrenali da noi studiati indica il coinvolgimento della Wnt pathway nella genesi di questi tumori nei cani. La mancata dimostrazione delle alterazioni genetiche sul CTBBN1 suggerisce l'implicazione delle altre componenti molecolari della Wnt pathway (Tissier e coll, 2005). Mutazioni dell'Axina e dell'APC sono state riscontrate in molti altri tumori nell'uomo (Giles e coll, 2003, Kikuchi, 2003; Polakis, 2007). In alternativa l'alta frequenza dell'abnorme accumulo di β -catenina in questi tumori del cane potrebbe essere dovuta alla cross-interazione tra diverse vie di segnalazione come ad esempio il sistema delle Insulin like Growth Factor (IGF), il quale è quasi sempre attivo in questi tumori (Gicquel e coll, 2001). In conclusione questo è il primo studio che prende in considerazione il coinvolgimento della via di segnalazione Wnt nella patogenesi dei tumori surrenali dei cani. Esiste evidenza che questa via di segnalazione intracellulare potrebbe giocare un ruolo importante nella genesi e nella progressione dei tumori corticosurrenali dei cani, sia adenomi che carcinomi. La comprensione della patogenesi di questi tumori porterà miglioramenti utili per lo scopo diagnostico, prognostico e terapeutico di tali neoplasie.

Bibliografia

1. Aguilera, G., Catt, K. Regulation of aldosterone secretion during altered sodium intake. *J. Steroid Biochem.* 19, 525–530, 1983.
2. Akiyama T. Wnt/ β -catenin signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11 273-282, 2000.
3. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen J S, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y , Alkalay I .Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066– 1076, 2002.
4. Anderson C R, Birchard S J, Powers B E, Belandria G A, Kuntz C A, Withrow S J. Surgical treatment of Adrenocortical tumors; 21 cases (1990-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 37; 93-97, 2001.
5. Baeg G H, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128: 87–94, 2001.
6. Behrens J, Jerchow B A, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280 596– 599, 1998.
7. Bernard M H, Sidhu S, Berger N, Peix J L, Marsh D J, Robinson B G, Gaaston V, Le Bouc Y, Gicquel C. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 998-1001, 2003.
8. Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jausch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP & Allolio B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Research* 54 4927–4932, 1994.

9. Bielinska M, Parviainen H, Kiiveri S, Heikinheimo M, and Wilson D B. Origin and Molecular Pathology of Adrenocortical Neoplasms. *Vet Pathol.* March ; 46(2): 194–210, 2009.
10. Bläker H, Sutter C, Kadmon M, Otto H F, Knebel-Doeberitz M, Gebert J and Helmke B M. Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumours of patients with familial adenomatous polyposis coli. *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* 41:93–98, 2004.
11. Brantjes H, Roose J, van de Wetering M, Clevers H, All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* 29, 1410–1419, 2001.
12. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* Dec 15;11(24):3286-305, 1997.
13. Chen AE, Ginty DD, Fan CM. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* 433:317–322, 2005.
14. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey A J . A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218– 2230,1999.
15. Coudreuse D Y, Roel G, Betist M C, Destree O, Korswagen H C. Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* 312: 921–924, 2006.
16. de Fornel P, Delisle F, Devauchelle P, Rosenberg D. Effects of radiotherapy on pituitary corticotroph macrotumors in dogs: A retrospective study of 12 cases. *Can Vet J.* 48; 481-486, 2007.
17. Feldman E C, Nelson W R. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* 3 Ed, Saunders, pp 251-357, 2004.

- 18.** Finch P W , He X, Kelley M J, Uren A, Schaudies R P, Popescu N C, Rudikoff S, Aaronson S A, Varmus H E, Rubin J S. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 , 6770–6775, 1997.
- 19.** Galac S, Kooistra H S, Voorhout G, van den Ingh T S G A M, Mol A J, van den Berg G, Meij B P, J.A. Mola, G. van den Bergd, B.P. Meij. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestic Animal Endocrinology* 28, 338–348, 2005.
- 20.** Galac S, Kars V J, Voorhout G, Mol J A, and Kooistra H S. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: A case report. *The Veterinary Journal.* Volume 177, Issue 1, July, Pages 141-143, 2008.
- 21.** Gallo-Payet N, Payet MD, Chouinard L, Balestre MN, Guillon G. A model for studying regulation of aldosterone secretion: freshly isolated or cultured cells. *Cell. Signal.* 5, 651–666, 1993.
- 22.** Gallo-Payet N, Grazzini E, Cote M, Chouinard L, Chorvatova A, Bilodeau L, Payet M D, Guillon G. Role of Ca²⁺ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. *J. Clin. Invest.* 98, 460–466, 1996.
- 23.** Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, Girard F & Le Bouc Y. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting-adenomas. *Clinical Endocrinology* 40 465–477, 1994.
- 24.** Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 61:6762–7, 2001.

25. Giese K, Cox J, R. Grosschedl R . The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69, 185–195, 1992.
26. Giles H.R, van Es J.H, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1653, 1-24, 2003.
27. Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. Crystal structure of a β -catenin/Tcf complex. *Cell* 103: 885–896, 2000.
28. Graham TA, Clements WK, Kimelman D, Xu W. The crystal structure of the β -catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell* 10: 563–571, 2002.
29. Greco D S, Peterson M E, Davidson A P, Feldman E C, Komurek K. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995). *JAVMA*, 214, Vol 9, May 1, 1349-53, 1999.
30. Greco V, Hannus M, Eaton S. Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* 106: 633–645, 2001.
31. Hart MJ, de los Santos R, Albert I, *et al.* Downregulation of β -catenin by human axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Curr Biol*, 8:573–81, 1998.
32. Huang H, Mahler-Araujo B M, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC Mutations in Sporadic Medulloblastomas. *Am. J. Pathol.* 156, 433–437, 2000
33. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell*, 90: 871–882, 1997.

34. Huber AH, Weis WI. The structure of the β -catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by β -catenin. *Cell* 105: 391–402, 2001.
35. Kent M S, Bommarito D, Feldman E, Theon A P. Survival, neurologic response, and prognostic factors in dogs with pituitary masses treated with radiation therapy and untreated dogs. *J Vet Intern Med.* Sep-Oct; 21 (5); 1027-33, 2007.
36. Ken M. Cadigan and Roel Nusse. Wnt signaling: a common theme in animal development. *GENES & DEVELOPMENT* 11:3286–3305, 1997.
37. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signalling pathway. *Cancer Sci*, March Vol 94, no 3, 225-229, 2003.
38. Kimelman D and Xu W. β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491, 2006.
39. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.* 18, 2401– 2410, 1999.
40. Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N, Budnik V. Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell.* Oct 16;139(2):393-404, 2009.
41. Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16:279–283, 2000;
42. Kyles A E, Feldman E, De Cock H E V, Kass P H, Mathews K G, Hardie E M, Nels R W, Ilkiw EJ, Gregory C R. Surgical management of adrenal gland tumors with and without associated tumor thrombi in dogs; 40 cases (1994-2001). *JAVMA*, Vol 223, No 5, September 1, 2003.

43. Leyns L, Bouwmeester T, Kim S H, Piccolo S, De Robertis E M .Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747–756, 1997.
44. Libé R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer*, 14:13–28, 2007.
45. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 108:837–847, 2002.
46. Mao B., Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins *Nature*. 411 ; 321– 325, 2001.
47. Manuel Jiménez Pelàez, Bernard M. Bouvy, and Gilles P. Duprè. Laparoscopic Adrenalectomy for Treatment of Unilateral Adrenocortical Carcinomas: Technique, Complications, and Results in Seven Dogs. *Veterinary Surgery*, 37:444–453, 2008.
48. Meij B P, Voorhout G, van den Ingh T S G A M, Teske E, Rijnberk A. Results of Transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Vet surgery*, May-June; 27 (3); 246-61, 1998.
49. Meij B P, Voorhout G, Rijnberk A. Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Mol and Cell Endoc* 197; 89-96, 2002.
50. Miller J R. The Wnts. *Genome Biology*, 3(1):reviews3001.1–3001.15, 2001.
51. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391–399, 1996.

- 52.** Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. Mar 21;275(5307):1787-90, 1997.
- 53.** Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T. Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells* 3, 395–403, 1998.
- 54.** Nelson W J and Nusse R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. Vol 303 *Science*, 5 March 2004.
- 55.** Neumann C J, Cohen S M. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development*, 124: 871–880, 1997.
- 56.** Otis M, Campbell S, D. Payet M, Gallo-Payet N. The growth-promoting effects of angiotensin II in adrenal glomerulosa cells: An interactive tale. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 273,1–5, 2007.
- 57.** Paolo Uva, Luigi Aurisicchio, James Watters, Andrey Loboda, Amit Kulkarni, John Castle, Fabio Palombo, Valentina Viti, Giuseppe Mesiti, Valentina Zappulli, Laura Marconato, Francesca Abramo, Gennaro Ciliberto, Armin Lahm, Nicola La Monica and Emanuele de Rinaldis. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, 10:135, 2009.
- 58.** Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435: 58–65, 2005.
- 59.** Park J Y, Park W S, Nam Wn S, Kim Y S, Lee HS, Yoo J N, Lee Y J, and Park C K. Mutations of β -catenin and AXIN1 genes are a late event in human hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 25: 70-76, 2005.
- 60.** Pinson K I, Brennan J, Monkley S, Avery B J, Skarnes W C. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. Sep 28;407(6803):535-8, 2000.

61. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14: 1837-1851, 2000.
62. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17:45–51, 2007.
63. Poutahidis T, Doulberis M, Karamanav Ei, Angelopoulou K, Koutinas C K and Papazoglou L G. Primary Gastric Choriocarcinoma in a Dog, *J. Comp. Path.* Vol. 139, 146 e 150, 2008.
64. Renée van Amerongen and Roel Nusse. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-3214, 2009.
65. Reusch C. Iperadrenocorticism. *Clinica Medica Veterinaria*. 6 Ed, Elsevier Masson S.r.l. pp 1629-1660, 2005.
66. Rijnberk A, Kooistra H S. *Clinical Endocrinology of dogs and cats*. 2^o Edition, pp 111-134, 2010.
67. Schwartz P, Kovak J R, Koprowski A, Ludwig L L, Monette S, Bergman P J. Evaluation of prognostic factors in the surgical treatment of adrenal gland tumors in dogs: 41 cases (1999-2005). *JAVMA*, Vol 232, No 1, January, 2008.
68. Scott W D, Miller W H, Griffin C E. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 6 Ed, by W B Saunders company, pp 789-795, 2001.
69. Spink K, Fridman SG, Weis WI. Molecular mechanisms of b-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC- β -catenin complex *EMBO J* 20: 6203–6212, 2001.
70. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L and Bourdeau I. Frequent mutations of β -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clinical Endocrinology*, 68, 264-270, 2007.

- 71.** Takahashi-Yanaga F, and Sasaguri T. The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. *J Pharmacol Sci* 104, 293 – 302, 2007.
- 72.** Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré A-M, Rene-Crail F, Jullian E, Gicquel Ch, Bertagna X, Vacher-Lavenu M-C, Perret Ch, and Berthrat J. *Cancer Res*, 65: (17). September, 1, 7622-7627, 2005.
- 73.** Travis A, Amsterdam A, Belanger C, and Grosschedl R . LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev*. May, 5: 880-894, 1991.
- 74.** van der Vlugt-Meijer R H, Meij B P, van den Ingh T S, Rijnberk A, Voorhout G. Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary dependent-hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med*. Nov-Dec; 17 (6); 773-80, 2003.
- 75.** van Noort M, van de Wetering M, Clevers H. Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin *Exp. Cell Res* 276, 264– 272, 2002.
- 76.** Vinson G P. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc. Res. Tech.* 61, 227–23, 2003.
- 77.** Wenqing Xu¹, and David Kimelman. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners *Journal of Cell Science* 120, 3337-3344, 2007.
- 78.** Willert K, Brown J D, Danenberg E, Duncan A W, Weissman I L, Reya T, John R Y, & Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448–452, 2003.
- 79.** Wu R, Zhai Y, E.R. Fearon E R, Cho K R. Diverse Mechanisms of β -Catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Res*. 61, 8247– 8255, 2001.

- 80.** Xu W, and Kimelman D,. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *Journal of cell science* 120 (19), 2007.
- 81.** Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A; *J. Biol. Chem.* 274, 10681-10684, 1999.
- 82.** Yanagawa S, Matsuda Y, Lee J S, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* 21, 1733–1742, 2002.
- 83.** Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh J-C and He X. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-375, 2008.