

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Chirurgiche**

Ciclo XXXII

Settore Concorsuale: 06/D2

Settore Scientifico Disciplinare: MED/13

**Analisi avanzata del profilo ormonale steroideo per
l'identificazione di predittori di rischio cardiovascolare in
pazienti con incidentaloma surrenalico mediante cromatografia
liquida abbinata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)**

Presentata da: Marco Mezzullo

Coordinatore Dottorato

Prof. Annalisa Patrizi

Supervisore

Prof. Uberto Pagotto

Esame finale anno 2020

ABSTRACT

La valutazione del profilo ormonale steroideo mediante l'uso della tecnologia gold-standard, quale la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), si è rivelata di grande utilità nella diagnosi e tipizzazione delle masse del surrene.

In questo studio abbiamo analizzato il profilo steroideo circolante basale e post test di soppressione al desametasone, in 302 pazienti con incidentaloma surrenalico, mediante l'applicazione di un metodo LC-MS/MS per la quantificazione di 11 steroidi circolanti. Abbiamo poi valutato le associazioni con la salute cardiovascolare durante il periodo di follow-up (media 39 mesi).

Lo scopo secondario prevedeva invece lo studio esplorativo della steroidogenesi intra-tumore ed il confronto con il tessuto surrenalico normale corrispondente in pazienti sottoposti a chirurgia, mediante lo sviluppo di un nuovo metodo LC-MS/MS per la caratterizzazione di un pannello di 22 steroidi surrenalici.

Da tale studio è emerso che i soggetti con adenoma unilaterale e secrezione disregolata di cortisolo avevano valori basali più elevati di cortisolo, 11-desossicortisolo e corticosterone e livelli ridotti di DHEA rispetto ai pazienti con adenoma non funzionante. Inoltre i soggetti con iperplasia e secrezione disregolata di cortisolo avevano livelli elevati di cortisolo ed androgeni ridotti rispetto alle iperplasia non funzionanti. I pazienti con secrezione disregolata hanno mostrato la mancata soppressione di cortisolo, 11-desossicortisolo e corticosterone post test al desametasone indipendentemente dalla morfologia della lesione. I livelli di cortisolo e corticosterone post test al desametasone erano inoltre associati con una prevalenza più elevata del peggioramento dell'ipertensione. Pazienti con adenoma unilaterale e secrezione disregolata avevano un'incidenza più elevata del peggioramento dell'ipertensione e per l'insorgenza di nuovi eventi cardiovascolari rispetto ai non secernenti, con il cortisolo post desametasone (Hazard Ratio 1.02, 95% CI 1.01-1.03, $P < 0.001$) ed il corticosterone basale (Hazard Ratio 1.06, 95% CI 1.01-1.12, $P < 0.031$) come maggiori predittori. Dallo studio della steroidogenesi tissutale è emerso il potenziale valore informativo di alcuni steroidi non tradizionali, come i metaboliti del cortisolo, il metabolita del progesterone, il 16-idrossiprogestosterone ed alcuni androgeni C19 11-ossidati come l'11-idrossiandrosterone, 11-ketoadrosterone e 11-idrossitestosterone le cui variazioni erano frequentemente riscontrate nel tessuto tumorale rispetto al tessuto surrenalico normale. I pazienti con incidentaloma surrenalico hanno mostrato un profilo steroideo differente in relazione allo status funzionale ed alla morfologia dei surreni che si associava a differenti livelli di rischio cardiovascolare.

INDICE

INTRODUZIONE	6
1- CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA	10
• Il metodo cromatografico.....	10
• Cromatografia liquida ad alta prestazione.....	12
• Componenti tipici di un HPLC.....	13
• Analisi Quantitativa.....	14
• Introduzione alla spettrometria di massa.....	15
• La sorgente API.....	17
• Interfaccia ESI.....	18
• Interfaccia APCI.....	19
• Il cromatogramma e lo spettro di massa.....	20
• L' effetto matrice e la quantificazione mediante diluizione isotopica...21	
2-GLI ORMONI STEROIDEI	23
• Biosintesi e Trasporto.....	23
• Recettori Steroidei e modalità di azione.....	25
• Mineralcorticoidi e cenni di fisiopatologia.....	27
• Glucocorticoidi e cenni di fisiopatologia.....	30
• Ormoni sessuali e cenni di fisiopatologia.....	36
• Vie biosintetiche e metaboliche non tradizionali.....	37
3-INCIDENTALOMA SURRENALICO	41
• Incidentaloma surrenalico.....	41
• Management clinico degli incidentalomi surrenalici.....	41
4-SCOPO DEL LAVORO	46
5-MATERIALI E METODI	47
• Composti, reagenti e strumentazione.....	47
• Soggetti.....	48
• Valutazione radiologica.....	49
• Valutazione ormonale.....	49
• Valutazione clinica.....	49
• Classificazione dei pazienti.....	49
• Protocollo dello studio.....	50
• Standard assays.....	50

• LC-MS/MS assays.....	50
• Analisi del tessuto surrenalico.....	55
• Analisi statistiche.....	57
6-RISULTATI.....	58
7-DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	88

Introduzione

I surreni sono piccoli organi posti superiormente a ciascun rene. Essi ricoprono un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo energetico, del bilancio idrico, della riproduzione e della risposta allo stress, mediante la sintesi e la secrezione regolata degli ormoni steroidei; inoltre i surreni producono anche le catecolamine adrenalina e noradrenalina. Le masse del surrene sono uno dei tumori più comuni nell'uomo: alcuni studi basati su gli esami di *imaging* stimano fino al 5 % di prevalenza nella popolazione adulta ed un'incidenza che aumenta con l'età [Bovio S et al. 2006]. Considerando gli incidentalomi surrenalici e l'aldosteronismo primario è verosimile ipotizzare che ci siano milioni di pazienti in tutto il mondo affetti da tali condizioni patologiche.

La maggior parte delle masse surrenali risulta benigna e clinicamente silente. Una piccola percentuale può tuttavia causare sia importanti alterazioni nella secrezione ormonale, sia evolvere in senso maligno. Le masse del surrene clinicamente silenti vengono spesso scoperte per caso nel corso di esami diagnostici o trattamenti eseguiti per diverse condizioni cliniche non collegate al sospetto di alterazioni ai surreni e quindi sono comunemente definite "incidentalomi". Il miglioramento tecnologico delle nuove tecniche di *imaging* ha consentito di mettere in evidenza un numero di casi di incidentaloma surrenalico crescente. L'aumento dell'interesse clinico e scientifico si riflette in un aumento esponenziale del numero delle pubblicazioni riguardanti l'incidentaloma surrenalico durante gli ultimi trent'anni. Quando viene rivelato, l'incidentaloma surrenalico determina importanti quesiti per i medici ed i loro pazienti. I percorsi diagnostici sono implementati per stabilire se la lesione sia di tipo "secernente" o "non secernente", e per differenziare lesioni con potenziale di malignità da lesioni di tipo benigno, inoltre la presenza di comorbidità cliniche cortisolo correlate determina la necessità di intervento chirurgico [Fassnacht M, et al. 2016].

A causa del fatto che la prevalenza aumenta con l'età, una corretta gestione delle masse surrenali costituisce, nella nostra società in via di invecchiamento, una sfida crescente.

Nel corso degli ultimi trent'anni sempre maggiori informazioni riguardo l'epidemiologia, la biologia, il trattamento ed il *follow up* dei tumori surrenalici si sono rese disponibili. La possibilità di studiare la secrezione ed il metabolismo degli steroidi, in siero, saliva ed urina, è ad oggi ampiamente disponibile, principalmente grazie alla diffusione ed all'applicazione della tecnologia della cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (*liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) [Fanelli F. et al. 2019; Di Dalmazi G. et al. 2019, 2015;

Ceccato F. et al 2018, 2017], tecnica analitica d'elezione che permette il *profiling* di un elevato numero di ormoni, su larga scala, in tempi relativamente brevi e con elevata affidabilità analitica. Primo in Italia, il nostro gruppo ha sviluppato e validato un metodo LC-MS/MS per l'analisi simultanea di dieci steroidi sierici: cortisolo (F), 11-desossicortisolo (11S), 21-desossicortisolo e 17-OHprogesterone (17-OHP4) per i glucocorticoidi, desossicorticosterone (DOC) e corticosterone (B), tra i mineralcorticoidi, e progesterone (P4), deidroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4) e testosterone (T) per gli ormoni sessuali [Fanelli et al. 2011]. Il metodo LC-MS/MS sviluppato nel nostro centro permette di ottenere informazioni quantitative su ormoni le cui azioni sono meno conosciute, proprio per via delle limitazioni analitiche, come B, 11S e DOC, il cui dosaggio non è disponibile nella maggioranza dei laboratori ospedalieri. Un recente report ha stimato che >15 % dei pazienti con incidentaloma surrenalico soffre di una disfunzione ormonale subclinica e costituisce una popolazione ad alto rischio per i disordini del metabolismo, ipertensione e per le patologie cardiovascolari. E' importante quindi determinare se gruppi di pazienti con lesioni subcliniche possano trarre beneficio dal trattamento chirurgico. Inoltre, l'identificazione di quelle categorie di pazienti maggiormente esposti al rischio cardiovascolare permetterà di ottimizzare i protocolli di gestione di tali pazienti, al fine di limitare quanto più possibile l'insorgere di eventi patologici maggiori nel corso del tempo e di limitare l'uso della chirurgia per quei pazienti che non risultino soggetti a rischio aumentato [Di Dalmazi G. 2019].

Lo studio fine della secrezione steroidea in una patologia ancora poco compresa, caratterizzata da presentazioni estremamente eterogenee da soggetto a soggetto, e le cui decisioni terapeutiche si rifanno ancora ampiamente alla soggettività del clinico, sarà quindi di grande aiuto nell'approfondimento delle alterazioni metabolico-omeostatiche e pertanto, nella scelta dell'approccio terapeutico migliore per ogni paziente.

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), rappresenta la principale tecnologia sviluppata in campo chimico-clinico degli ultimi 30 anni. Tale tecnologia ha rinnovato l'interesse nei confronti dello studio degli ormoni steroidei, ambito di ricerca sviluppatosi principalmente negli anni '70 e '80, contestualmente all'avvento della gas cromatografia—MS (GC-MS) e degli immunoassays (IA). I primi IA, che includevano uno step di purificazione del campione biologico, utilizzavano isotopi radioattivi (RIA) della molecola target per analisi anticorpo-mediate di tipo competitivo. Successivamente, grazie all'aumento della richiesta per tale tecnologia, gli IA si sono evoluti verso analisi automatizzate non competitive, a rivelazione non radioattiva e senza

necessità di purificazione del campione, permettendo di svolgere misurazioni su larga scala ad un costo relativamente contenuto. Di contro, gli IA hanno ridotto la complessità del sistema steroideo a un numero estremamente limitato di molecole. Inoltre, le eccessive semplificazioni metodologiche introdotte dopo i primi anni, hanno decisamente inficiato la specificità e sensibilità degli IA, principalmente a causa di fenomeni di reattività crociata e/o del rilascio incompleto dell'analita da parte delle proteine di trasporto. Tali difetti analitici hanno verosimilmente comportato l'utilizzo di approcci terapeutici impropri con conseguente errore nella diagnosi e risultati scientifici inconclusivi, spesso in contraddizione. A differenza degli IA, la tecnologia analitica basata su MS garantisce un'elevata specificità, in quanto utilizza il peso molecolare e caratteristiche strutturali della molecola in analisi come principi identificativi. Tuttavia, nel caso degli steroidi, queste due proprietà possono non essere sufficienti, visto che essi condividono stessa struttura e, frequentemente anche il peso molecolare. Per tale motivo, la moderna analisi MS è accoppiata alla cromatografia liquida che garantisce la semplificazione del campione in analisi, limitando le interferenze. Grazie all'incontrastata capacità risolutiva della GC, la GC-MS offre un livello di selettività ideale per la caratterizzazione di composti steroidei inusuali e per studi di *discovery*. Tuttavia, la GC-MS non ha facile impiego in laboratori clinici poiché richiede un'estensiva preparazione del campione che non risulta compatibile con l'elevato numero di misurazioni tipicamente effettuate dai moderni laboratori di chimica-clinica. Il vantaggio essenziale della LC-MS/MS comparata alla GC-MS, risiede quindi nella semplicità e rapidità di esecuzione, elementi centrali nella moderna chimica-clinica. La capacità separativa della LC viene molto spesso accoppiata ad un'analisi MS di tipo *tandem* che prevede, dapprima, una selezione della molecola target ionizzata e, successivamente, di un frammento da essa specificamente generato mediante la rottura della molecola. Inoltre, le tecniche MS garantiscono misurazioni accurate grazie all'impiego dello standard interno deuterato (IS), un isotopo della molecola in analisi "marcato" mediante la sostituzione degli idrogeni (H^+) con i deuteri ($^2H^+$), per correggere variabilità o interferenze che normalmente incorrono durante le fasi pre- e analitiche. Lo stimolo allo sviluppo di metodi LC-MS/MS sempre più sensibili e produttivi è anticipato di pari passo con la sempre maggiore dimostrazione della scarsa sensibilità, specificità e armonizzazione degli IA automatizzati. Studi condotti fin dalla fine degli anni '90, hanno dimostrato l'inadeguatezza degli IA nella determinazione di bassi valori di testosterone in condizioni fisiopatologiche, come nelle donne e nella popolazione pediatrica, ed in condizioni patologiche, come nell'ipogonadismo maschile. Ben presto, l'attenzione

è stata allargata all'inadeguatezza degli IA impiegati per gli altri steroidi misurati in clinica, portando importanti società e riviste scientifiche a rilasciare nuove linee guida, circa la necessità di utilizzare metodiche affidabili e ben validate. Un ulteriore vantaggio delle tecniche MS è dato dalla possibilità di analizzare simultaneamente pannelli di analiti che includono anche ormoni non valutabili con gli IA disponibili, permettendo quindi di studiare dettagliatamente i prodotti di complesse vie enzimatiche come quelle surrenaliche o gonadiche.

La LC-MS/MS sta quindi apportando fondamentali contributi nella ridefinizione dei criteri diagnostici e terapeutici di disturbi endocrini tra i quali l'iperandrogenismo femminile, l'ipogonadismo maschile e le masse surrenaliche.

Tale tecnica analitica costituisce quindi lo strumento d'elezione per lo studio delle patologie endocrine mediante il profiling degli ormoni steroidei.

1-CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM

-IL METODO CROMATOGRAFICO-

Le tecniche cromatografiche includono una serie di metodiche analitiche che consentono di separare le diverse molecole presenti in campioni complessi; lo sviluppo di tale metodica è stato effettuato agli inizi del XX secolo dallo scienziato russo *Mikhail Semyonovich Tsvet* durante alcune valutazioni empiriche sui pigmenti contenuti nei cloroplasti. Dalla sua teorizzazione fino ai nostri giorni, la tecnica cromatografica è stata cospicuamente sviluppata ed ottimizzata, principalmente grazie alla continua evoluzione che si è avuta nei settori della strumentazione e dei materiali.

Due sono i principi teorici sui quali si basa la cromatografia: la distribuzione di un molecola, detta analita, tra una fase mobile e una fase stazionaria e la diversa velocità di migrazione dei vari analiti presenti nel campione in analisi (*Fig. 1*). In particolare, nella cromatografia liquida (LC) la fase mobile è un liquido e la fase stazionaria è generalmente un solido incluso nella colonna cromatografica.

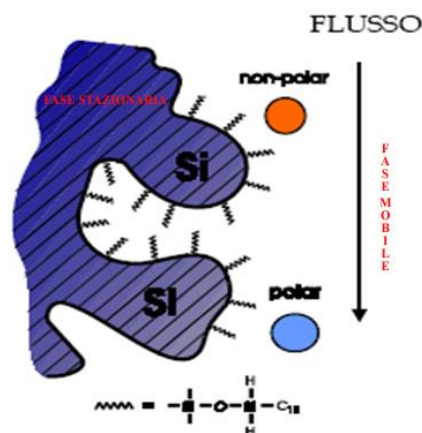


Figura 1: Distribuzione dell'analita tra fase mobile e fase stazionaria.

Gli analiti, data la specifica affinità che ogni molecola ha con la fase stazionaria, passeranno attraverso la fase colonna analitica con velocità differenti e verranno pertanto eluiti con tempi diversi: tanto è alta è l'affinità di una molecola per una data fase stazionaria, tanto maggiori saranno le interazioni, tanto più tempo sarà necessario perché tale molecola si distacchi dalla stessa. Attualmente esistono varie combinazioni di fase mobile e fase stazionaria, tali combinazioni definiscono i vari tipi di cromatografia liquida (*Fig. 2*):

- **Cromatografia ad adsorbimento:** utilizzata per la separazione di composti non ionici insolubili in acqua; la fase stazionaria è un solido, sulla cui superficie si trovano dei siti chimicamente attivi in grado di formare una serie di legami non covalenti con le varie molecole contenute nel campione in analisi.
- **Cromatografia a scambio ionico:** si basa sul principio di attrazione tra gli ioni caricati diversamente; la fase stazionaria è costituita da macromolecole contenenti dei siti attivi ionizzati, in cui i controioni possono essere scambiati con altri aventi carica uguale, presenti nella fase mobile. Si instaura così una competizione fra i controioni della fase stazionaria e quelli della miscela in fase di separazione, nei confronti dei siti attivi ionizzati della fase stazionaria.
- **Cromatografia di ripartizione:** esistono due tipi principali di cromatografia di ripartizione, che si differenziano per la relativa polarità della fase stazionaria e della fase mobile: la cromatografia di ripartizione in fase normale e la cromatografia di ripartizione in fase inversa. Nel primo caso, la fase stazionaria è polare e la fase mobile è apolare; i diversi componenti del campione vengono quindi eluiti in ordine di polarità crescente. Nel caso della cromatografia in fase inversa, la fase stazionaria è apolare, mentre quella mobile è polare. I primi composti ad essere eluiti saranno quelli più polari seguiti da quelli meno polari.

Cromatografia ad esclusione molecolare: la cromatografia per esclusione molecolare fa uso di particolari materiali come il destrano; la funzionalità di tali sostanze, consiste nel fatto che le catene di questi polimeri, connesse tra loro tramite ramificazioni e legami crociati, formano una particolare rete tridimensionale. Questo tipo di cromatografia è definita anche gel filtrazione poiché le resine impregnandosi di acqua, diventano dei veri e propri gel comportandosi come un filtro e consentendo alle molecole più piccole di penetrare nelle maglie della rete, mentre le molecole le cui dimensioni siano maggiori delle maglie del gel vengono eluite.

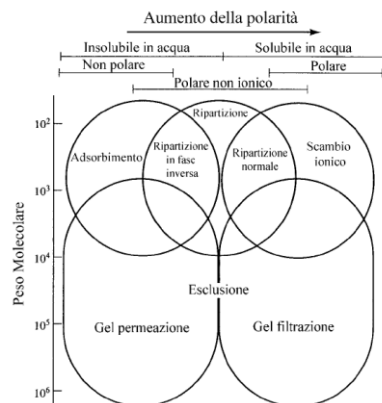


Figura 2: tipi di cromatografia liquida in relazione alla natura chimica dell'analita target.

-CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA EFFICIENZA-

La cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) è una tecnica analitica che rappresenta la naturale evoluzione della cromatografia classica. In HPLC la fase stazionaria è impaccata all'interno di una colonna analitica. La fase mobile liquida passa attraverso la colonna analitica grazie all'elevata pressione che viene applicata da un sistema di pompaggio posizionato a monte della colonna.

Appare chiaro come l'efficienza e l'evoluzione tecnica della moderna cromatografia liquida dipenda dallo sviluppo ed evoluzione della strumentazione, alla quale vengono richieste pressioni operative di diverse centinaia di atmosfere, per permettere il raggiungimento di velocità di flusso tali da consentire una separazione efficiente in un tempo ragionevole.

I moderni sistemi per HPLC sono composti dai seguenti elementi: serbatoi per le fasi mobili, pompe, sistemi automatizzati per l'introduzione del campione, o autocampionatore, colonne analitiche equipaggiate con relative precolonne, e sistemi di rivelazione (*Fig.7*).

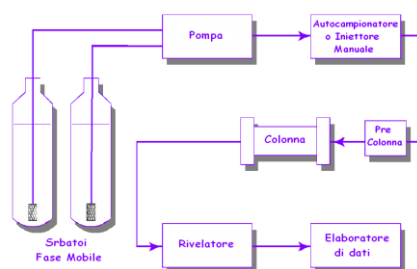


Figura 3: illustrazione schematica di un setting tipico da HPLC.

- COMPONENTI TIPICI DI UN HPLC-

Alloggiamento per le fasi mobili: sono costituiti da bottiglie di vetro adatte a contenere le fasi mobili; il sistema di pompe spinge le fasi mobili nelle linee aspirandole attraverso i pescanti posti sul fondo delle bottiglie. Sono presenti inoltre vari sistemi per eliminare le bolle d'aria che possono provocare alterazioni della continuità del flusso, definiti degasatori.

Pompe: il sistema di pompaggio aspira le fasi mobili dalle bottiglie e le immette nelle linee spingendole fino alla colonna analitica. Data l'elevata varietà dei solventi utilizzabili, è fondamentale che tale sistema di pompaggio sia chimicamente resistente alla maggior parte di essi; inoltre, deve essere capace di garantire un flusso costante e riproducibile, evitando quindi fenomeni di variazione della velocità del flusso dei liquidi, evento che altera la normale dinamica dei flussi, compromettendo quindi la riproducibilità della metodica. Le elevate contropressioni che si generano nel sistema HPLC, dipendono principalmente dalle caratteristiche dell'impaccamento della colonna analitica, dalla viscosità delle fasi e dal diametro dei tubi che collegano i vari elementi del sistema.

Autocampionatore: consente di automatizzare il processo di introduzione del campione durante l'analisi. Tale elemento è dotato di uno specifico alloggiamento termostato per contenere i campioni e di un sistema di iniezione ad ago in grado di garantire ripetibilità e precisione dell'iniezione di micro-volumi di campione (0.1 - 100 μ L).

Colonna analitica: la colonna analitica è l'elemento all'interno del quale avviene la separazione delle molecole che costituiscono il campione in analisi. Essa è costituita da un cilindro di varie lunghezze e diametri, riempito con differenti materiali d'impaccamento.

La prestazione della colonna può essere ottimizzata valutando la temperatura ottimale del suo alloggiamento, in modo da fornire le corrette condizioni per la massima interazione possibile tra gli analiti e i siti di legame della colonna analitica.

La colonna analitica, inoltre va periodicamente sostituita a causa dell'accumulo costante di sostanze al suo interno, evento che causa un aumento progressivo delle contropressioni di lavoro e una riduzione del potere risolutivo.

Pre-colonna: la funzione principale della pre-colonna è quella di proteggere la colonna analitica dall'accumulo delle sostanze. Essa consente quindi di prolungare la durata della colonna analitica; tale pre-colonna è impaccata con la stessa fase stazionaria della colonna analitica, possiede lo stesso diametro ma risulta essere più corta in lunghezza.

Rivelatore: questo elemento permette di rilevare il passaggio dell'analita e di generare un segnale che sia proporzionale alla quantità di analita che passa nell'unità di tempo, inoltre permette, grazie all'interfaccia con un computer, di quantificare tali eventi al fine di desumere la concentrazione dell'analita nel campione. Esistono varie tipologie di rivelatori: spettrofotometrici (UV, IR ecc.), fluorimetrici e ad indice di rifrazione. Negli ultimi anni, l'utilizzo delle tecniche separative HPLC in accoppiamento con gli spettrometri di massa usati come rivelatore stanno avendo sempre maggior riscontro.

-ANALISI QUANTITATIVA-

Come per tutte le altre tecniche cromatografiche, l'analisi quantitativa di molecole in campioni complesse si basa su diversi approcci; tutte le metodiche utilizzate si basano sull'assunto che la misura del segnale, l'area del picco, sia proporzionale alla concentrazione dell'analita di interesse.

Area del picco: definiamo area del picco l'area sottesa la curva che descrive un dato picco. Nell'analisi quantitativa tale area viene misurata tra l'inizio e la fine del picco di ciascun analita. L'area del picco è un parametro teoricamente indipendente sia dalle condizioni cromatografiche che dalle prestazioni della colonna, in condizioni di flusso costante di fase mobile.

Metodo dello standard interno (IS): tale metodica prevede l'aggiunta di una molecola, a concentrazione nota, non presente nel campione da dosare. L'IS deve avere caratteristiche fisico-chimiche quanto più possibile rappresentative della molecola in analisi. La sua aggiunta ai campioni incogniti ed ai calibratori deve essere effettuata prima di qualunque trattamento preanalitico, in modo da poter mettere in evidenza eventuali alterazioni a carico del campione che siano subentrate durante le molteplici fasi di preparazione e analisi del campione. Ogni variabile influenzerà, infatti, l'analita e l'IS nella stessa entità, ed il rapporto analita / IS rimarrà costante durante tutto il processo. Durante la selezione della molecola da utilizzare come IS sarà necessario considerare alcune caratteristiche specifiche che essa dovrà necessariamente possedere: non deve essere già presente

nel campione da dosare né deve poter reagire chimicamente con altri analiti presenti nel campione; inoltre, esso dovrà eluire dalla colonna ed avere un picco completamente risolto da tutti gli altri analiti; deve inoltre mantenere la stabilità durante le varie fasi dell'analisi preanalitica ed infine, deve possedere alto grado di purezza ed essere preferibilmente poco tossico.

INTRODUZIONE ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica che permette di effettuare sia indagini di tipo quantitativo che indagini di tipo qualitativo; tale metodica applica alle molecole una quantità di energia tale da determinarne la ionizzazione (+ / -), e tali ioni in vengono separati e identificati in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

Si definisce "spettro di massa" un diagramma che include in asse x i rapporti m/z e in asse y le intensità dei segnali generati da ciascuno ione rivelato (Fig. 4).

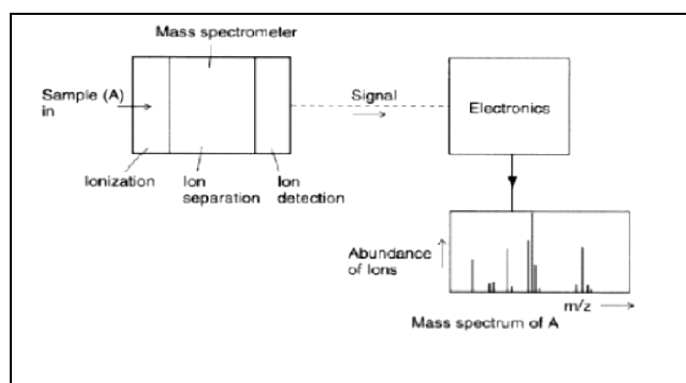


Figura 4: schema generale di funzionamento di uno spettrometro di massa.

Tutti gli spettrometri di massa hanno una struttura abbastanza simile. La struttura tipica è composta solitamente da: una sorgente, un analizzatore, un rivelatore ed un computer con uno specifico *software* atto all'elaborazione dei dati. (Fig. 5).

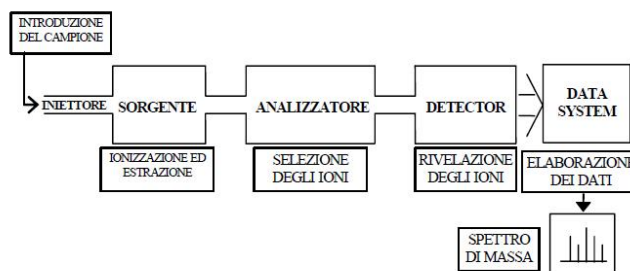


Fig. 5: Struttura generale di uno spettrometro di massa.

Sono presenti in commercio diversi tipi di spettrometro di massa, tra i quali ricordiamo il tempo di volo, la trappola ionica e il quadrupolo: sebbene basate su tecnologie molto diverse tra loro, tutte queste tipologie sfruttano le specifiche proprietà elettromagnetiche degli ioni a diverso m/z . I differenti approcci analitici rendono ciascuno spettrometro adatto a scopi diversi: ad esempio, la trappola ionica viene impiegata per l'identificazione strutturale delle molecole, il tempo di volo per il calcolo della massa esatta, mentre il quadrupolo, in modalità singola o in modalità triplo quadrupolo, è lo strumento ideale per condurre analisi quantitative. In questo studio sarà proprio l'ultima tipologia, lo spettrometro a triplo quadrupolo, ad essere impiegato per l'analisi quantitativa. Brevemente, la molecola di interesse dovrà in primo luogo subire un processo di ionizzazione, in una regione dello spettrometro detta sorgente. A seguito della ionizzazione, la molecola, ora in fase gassosa, entra nello spettrometro di massa tramite un apparato detto "interfaccia" o "sorgente", mentre tutte le altre molecole non ionizzate vengono disperse nel sistema senza essere rivelate; all'interno dell'analizzatore, gli ioni, subiscono un processo di frammentazione che rompe la molecola carica in frammenti più piccoli, quindi rivelati e quantificati (Fig. 6).

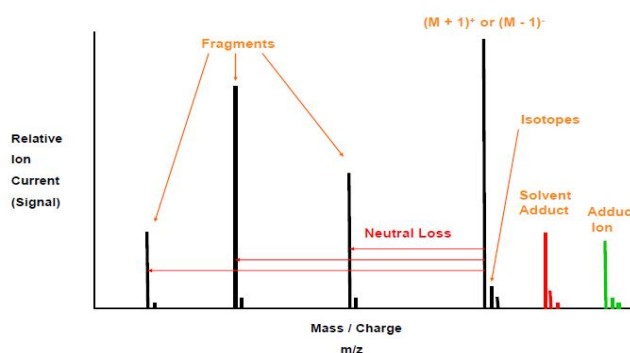


Figura 6: spettro di massa dello ione pseudomolecolare e relativi frammenti.

Gli ioni si muovono all'interno dell'analizzatore sia per interazione elettromagnetica che per gradiente di vuoto crescente. Il *pattern* di frammentazione di una data molecola è costante e

riproducibile e dipende solo dalla struttura molecolare e dalla quantità di energia utilizzata per indurre tale rottura; appare chiaro che ogni molecola genererà frammenti di struttura e abbondanze riconducibili alla sua natura della sua struttura molecolare; per condurre analisi quantitative sarà necessario selezionare quelli più abbondanti e più rappresentativi della molecola in analisi. L'abbondanza relativa di un frammento è quindi una caratteristica intrinseca della molecola mentre l'abbondanza assoluta è funzione della quantità totale di analita presente nel campione. Dopo che la molecola in analisi è stata ionizzata e frammentata, tali frammenti giungono al rivelatore, che converte la corrente determinata dal flusso di ioni in un flusso di elettroni in grado di trasmettere un segnale ad computer (Fig. 7). La spettrometria di massa è attualmente utilizzata in molti ambiti diversi, grazie alla molteplicità di analisi che permette di svolgere e grazie alla capacità di misurare sia macromolecole come peptidi e proteine che piccole molecole biologiche come gli ormoni steroidei. E' inoltre possibile ottenere informazioni qualitative sulla natura di composti ignoti attraverso l'uso di frammentazioni controllate ed analisi dei frammenti caratteristici. Quando utilizzata in accoppiamento con LC, la spettrometria di massa consente di analizzare miscele complesse di molecole in matrici biologiche, come il siero, tessuti ecc. grazie all'efficienza separativa garantita dalle metodiche cromatografiche.

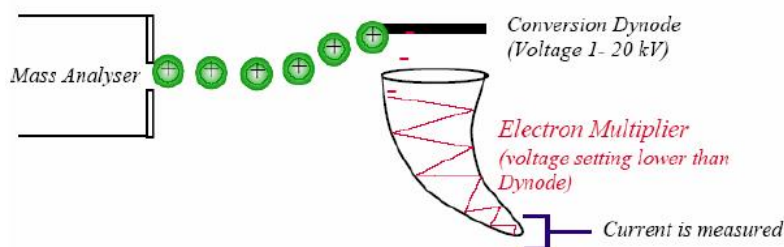


Figura 7: schema di funzionamento di un elettromoltiplicatore.

-LA SORGENTE API-

Una delle sfide tecniche che maggiormente hanno influito sullo sviluppo dell'accoppiamento tra sistemi LC e spettrometri di massa è rappresentata dalla necessità combinare volumi elevati di liquido erogato ad alta pressione dai sistemi HPLC, con un sistema che lavora ad alto vuoto quale lo

spettrometro di massa. Tale accoppiamento è reso possibile dall'ideazione di interfacce che lavorano a pressione atmosferica e che operano desolvando e contemporaneamente ionizzando le molecole in uscita dal sistema HPLC, in modo che possano essere introdotte nell'analizzatore. La tecnologia API comprende due tipi di tecniche: la ionizzazione elettrospray (*elettrospray ionization*, ESI) e la ionizzazione chimica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Entrambe queste tecniche di ionizzazione sono definite "soft", in quanto in grado di preservare integra la struttura della molecola, ovvero generano ioni pseudomolecolari. A seconda della modalità di ionizzazione in cui si opera, positiva o negativa, condurrà alla formazione di molecole cariche, gli ioni pseudo molecolari $[M + x]^+$ o $[M - x]^-$ mediante la perdita di un elettrone o l'acquisto di un protone.

- INTERFACCIA ESI-

Nella ionizzazione di tipo ESI l'eluato in uscita dall'HPLC viene direzionato in un elettrodo capillare riscaldato e, grazie all'utilizzo di un gas di nebulizzazione, esso fuoriesce sotto forma di fine spray; al capillare è inoltre applicata una differenza di potenziale che determina la ionizzazione. Il processo di ionizzazione è quindi garantito dell'azione combinata del gas di nebulizzazione e del campo elettrico applicato (*Fig. 8*). Il liquido in uscita dall'elettrodo capillare risulta disperso in microgocce cariche; il campo elettrico applicato nella regione di interfaccia causa lo spostamento degli ioni con una certa polarità verso la superficie esterna della goccia, provocando un aumento della densità di carica superficiale; tale dinamica va avanti fino a quando la densità di carica della goccia raggiunge il limite di Rayleigh, oltre il quale essa si disgrega in microgocce dalle dimensioni sempre più ridotte (≤ 10 nm), fino a che l'analita viene rilasciato sotto forma di ione desolvato, fenomeno indicato come esplosione Coloumbiana (*Fig. 9*). Tale modello è stato proposto da Fenn e colleghi agli inizi degli anni novanta ed è stato per lungo tempo al centro di numerosi dibattiti [Fenn J. 1993].

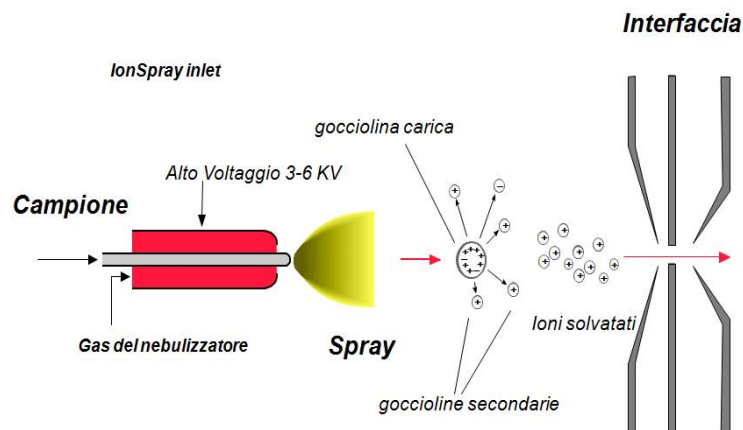


Figura 8: schema di funzionamento ESI.

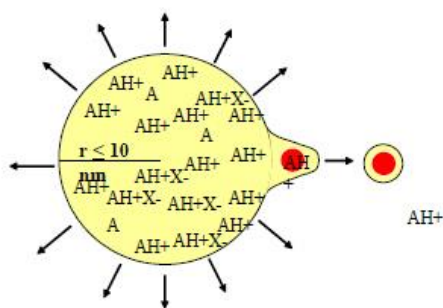


Figura 9: modello di evaporazione ionica (Coulomb explosion).

-INTERFACCIA APCI-

Questa tipologia di interfaccia prevede che l'eluente, in uscita dal sistema LC, venga nebulizzato mediante il passaggio in un capillare metallico riscaldato detto ago nebulizzatore; un gas nebulizzatore, che scorre parallelamente al campione ma in un compartimento separato, viene a contatto con il flusso liquido alla fine del capillare, favorendo la conversione del flusso liquido in un fine *spray* carico composto da una miscela gas / vapore. La miscela così formata in uscita dal capillare si trova in prossimità di un ago a cui viene applicata una differenza di potenziale (3 - 5.5 Kv) che determina una scarica a corona. La carica viene inizialmente acquisita dalle molecole di solvente che circondando l'analita all'esterno, successivamente tale carica passa dal solvente all'analita, che si ionizza; l'intero il processo è favorito dal calore fornito da appositi dispositivi definiti riscaldatori posti ai lati dell'ago nebulizzatore (Fig. 10 e 11). Questa modalità di ionizzazione viene preferita per composti dal peso molecolare inferiore a 1000 Da e poco polari; inoltre. Risulta quindi idonea per

tutti quei composti che sono poco volatili o troppo termolabili per essere analizzati in GC-MS oppure troppo poco polari per l'ESI.

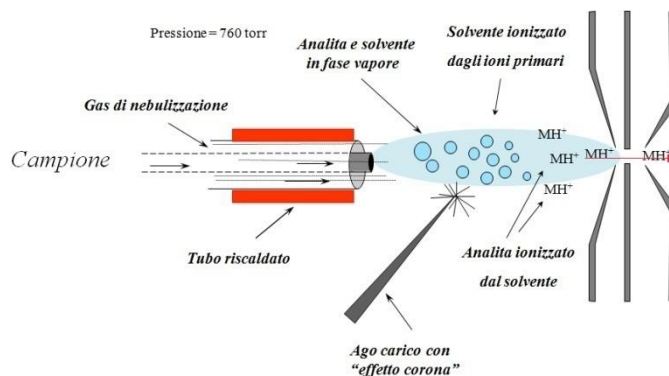


Fig. 10: schema di funzionamento APCI.

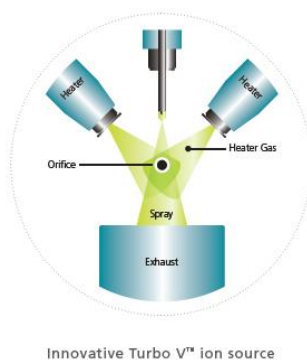


Fig. 11: rappresentazione dei riscaldatori.

-IL CROMATOGRAMMA E LO SPETTRO DI MASSA-

La LC-MS/MS è data dall'accoppiamento tra un sistema LC ed uno strumento a triplo quadrupolo operante in modalità MRM (*multiple reaction monitoring*, MRM), definito anche spettrometro di massa tandem, o MS/MS. L'accoppiamento tra la separazione cromatografica e l'analisi MRM si traduce nell'elaborazione di cromatogrammi, contenenti il segnale in funzione del tempo. L'informazione rappresentata dal picco cromatografico ad uno specifico tempo di ritenzione, viene arricchita dall'informazione, strutturale ed identificativa al contempo, della transizione MRM. Ne deriva che la misura del segnale relativo alla molecola in analisi è garantita da tre livelli di specificità: il tempo di ritenzione, la selezione dello ione padre e la selezione dello ione figlio. Qualora si scelga di monitorare due transizioni MRM per una sola molecola, scegliendo due diversi frammenti da essa

prodotti, si ottiene un ulteriore livello di specificità, dato dal rapporto tra le due transizioni: il rapporto ionico (*ion ratio*, IR). In condizioni di frammentazione costanti, il rapporto delle abbondanze con cui i frammenti vengono prodotti è costante ed è specifico delle proprietà termodinamiche della molecola. Il monitoraggio dell'IR nei campioni biologici, la cui variabilità di composizione può essere critica, è di grande aiuto nello scongiurare contributi di segnale da parte di molecole estremamente simili a quella di interesse (Fig. 12).

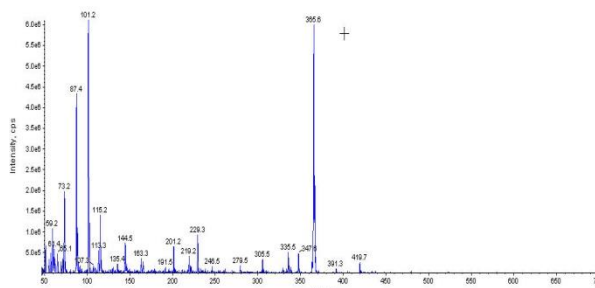


Figura 12: esempio di spettro di massa.

L'EFFETTO MATRICE E LA QUANTIFICAZIONE MEDIANTE DILUIZIONE ISOTOPICA

L'effetto matrice è un fenomeno che si osserva quando il segnale di un analita risulta ridotto o aumentato a causa della eluzione simultanea di componenti presenti nella matrice del campione. Tale fenomeno non è solitamente visibile in un cromatogramma, ma ha un effetto evidente sul segnale dell'analita oggetto della misura, e, pertanto, sulla robustezza ed affidabilità generale del metodo analitico. Nello specifico della LC-MS/MS, risolvere il problema dell'effetto matrice è uno degli scopi che richiede gli sforzi maggiori. Nel più frequente dei casi, l'effetto matrice causa una ridotta ionizzazione della molecola di interesse dovuta alla competizione per le cariche con le molecole coeluenti per la ionizzazione. Per eliminare o ridurre tali fenomeni occorre una buona risoluzione cromatografica, tale da separare la molecola di interesse dalle molecole interferenti più abbondanti, quali sali e lipidi. Inoltre, per evitare fenomeni di interferenza campione-specifici, l'impiego di IS isotopici è fondamentale. Gli standard interni isotopici sono marcati con isotopi stabili dell'idrogeno, solitamente ^2H e del carbonio, ^{13}C . Grazie al fatto che presentano un differente peso molecolare rispetto all'analita, gli isotopi stabili verranno distinti dall'analita da parte dello spettrometro di massa, pur preservando identiche proprietà fisico-chimiche: gli isotopi stabili hanno lo stesso tempo di ritenzione della molecola in analisi e subiscono quindi le stesse interferenze

dell'analita. L'utilizzo del rapporto dei segnali di analita e IS per la costruzione della curva di calibrazione e per l'interpolazione dei valori osservati nei campioni, garantisce elevata accuratezza e precisione [Monaghan PJ et al. 2013].

2-GLI ORMONI STEROIDEI

-BIOSINTESI E TRASPORTO-

Gli ormoni steroidei sono in gran parte sintetizzati nella zona corticale del surrene e in percentuali minori nelle gonadi, nel tessuto adiposo, nel sistema nervoso centrale e nella placenta. Molteplici enzimi risultano coinvolti nel processo di sintesi e sono caratterizzati da diversi profili di espressione in relazione al tessuto o all'organo in cui operano. Tutti gli ormoni steroidei sono sintetizzati a partire da un precursore comune, il pregnenolone (P5), che viene prodotto a partire dal colesterolo, e tutti, ad eccezione degli estrogeni che posseggono un anello aromatico detto anello A, sono caratterizzati dall'anello del ciclopentanoperidrofenantrene, in cui è presente un gruppo insaturo a doppio legame carbonio-carbonio. Gli ormoni steroidei vengono classificati in tre categorie: i glucocorticoidi, prodotti nella regione fascicolata della zona corticale del surrene, i mineralcorticoidi, prodotti nella zona glomerulare e gli steroidi sessuali, prodotti dalla zona reticolare del surrene e dalle gonadi. Glucocorticoidi e mineralcorticoidi sono steroidi C-21 in quanto dotati di struttura a 21 atomi di carbonio, mentre androgeni ed estrogeni hanno 19 atomi di carbonio e quindi vengono definiti C-19.

-Biosintesi-

Il colesterolo rappresenta il precursore comune per la sintesi di tutti gli ormoni steroidei, esso deriva per l'80 % dagli introiti alimentari, circola complessato alle lipoproteine di trasporto e viene immagazzinato in goccioline lipidiche contenute negli adipociti, dopo essere stato esterificato nel reticolo endoplasmatico con gli acidi grassi polinsaturi dall'enzima Acil-CoAcolesterolo-aciltransferasi; tale enzima catalizza il passaggio di un acido grasso dal coenzima A al gruppo ossidrilico del colesterolo. Il colesterolo libero viene rilasciato tramite l'enzima colesteril-esterasi che produce colesterolo libero e esteri degli acidi grassi. Il colesterolo non può attraversare né la membrana mitocondriale esterna né lo spazio inter-membrana, pertanto il suo passaggio è garantito da un trasportatore specifico, detto *traslocator protein*, che agisce assieme ad altre proteine trasportatrici ed è regolato dalla proteina *steroidogenic acute regulatory protein* (STAR) (Fig. 13). La prima tappa del processo di sintesi degli ormoni steroidei è la conversione del colesterolo in P5 ad opera di citocromo P450_{scc} (CYP11A1) a livello della membrana interna del mitocondrio. P5 può fuoriuscire dal mitocondrio, e fungere da precursore per le catene biosintetiche

tessuto specifiche all'interno del complesso della P450 ossidasi, che comprende sei citocromi P450 distinti, espressi a differenti livelli a seconda della localizzazione. Questa specificità giustifica le differenze degli steroidi prodotti nei vari compartimenti e tessuti: nei distretti che maggiormente esprimono P450C17 (CYP17) avremo la produzione di DHEA, testosterone (T), estradiolo (E2) e cortisolo (F); quando invece un determinato tessuto esprime maggiormente 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi (*3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase*, 3 β -HSD), l'attività biosintetica sarà indirizzata verso la produzione di progesterone (P4) ed aldosterone (aldo).

-Trasporto-

Gli ormoni steroidei si trovano in circolo sia in forma libera sia legati a proteine trasportatrici; l'avidità di legame dei vari ormoni con le diverse proteine di trasporto è tale per cui essi hanno alta affinità per le globuline specifiche e minore affinità per le proteine trasportatrici aspecifiche come l'albumina. In tal senso, esempi di proteine caratterizzate da un'elevata affinità sono la proteina legante i corticosteroidi (transcortina, *corticosteroid binding globulin*, CBG) che trasporta F e P4, e la globulina legante gli ormoni sessuali (*sex hormon binding globulin*, SHBG) dedicate invece al trasporto del T ed dell'E2. L'aldo non è dotato di proteine di trasporto specifiche e di conseguenza solo circa la metà dell'ormone in circolo risulta complessato a proteine trasportatrici. Tale regolazione prevede che all'aumentare dei livelli di ormoni circolanti, aumenterà la frazione libera e quindi attiva, capace di mediare l'azione biologica. Infatti, nella maggior parte dei casi è la forma libera ad essere dotata sia dell'attività biologica sia della capacità di determinare la regolazione a *feedback*, inoltre, è la quota libera ad essere soggetta alle modificazioni, quali solfatazioni e glucuronazioni, che ne determinano la *clearance* e l'escrezione.

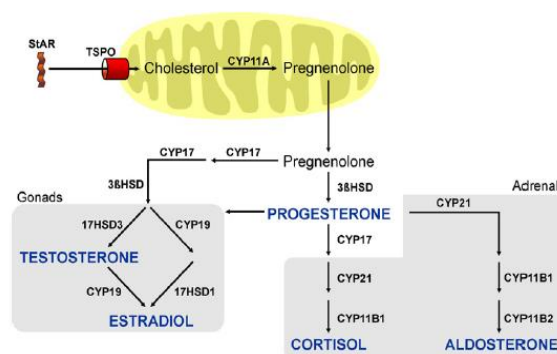


Figura 13: biosintesi dei principali steroidi surrenalici cortisolo, aldosterone ed estradiolo nelle gonadi (gli intermedi sono omessi).

RECETTORI STEROIDEI E MODALITA' DI AZIONE

I recettori che mediano l'azione ormonale degli steroidi appartengono alla sottofamiglia dei recettori nucleari (*nuclear receptor*, NR) di tipo 3 e comprendono due recettori per gli estrogeni α e β (*estrogen receptor*, ER α e ER β), due recettori orfani per gli estrogeni α e β (*estrogen related receptors*, ERR α ed ERR β), un recettore per i glucocorticoidi, (*glucocorticoid receptor*, GR), un recettore per i mineralcorticoidi (*mineral corticoid receptor*, MR), un recettore per i progestinici (*progesterin receptor*, PR) ed un recettore per gli androgeni (*androgen receptor*, AR). In forma inattiva, tali recettori sono localizzati nel citosol in forma monometrica. In presenza del ligando, i recettori per gli ormoni steroidei si attivano, dimerizzano e traslocano nel nucleo dove agiscono da attivatori o inibitori della trascrizione, agendo sia in forma monomerica sia in forma etero/omodimerica. Tutti i recettori per gli ormoni steroidei mostrano un dominio centrale (*DNA-binding domain*, DBD) che lega il DNA a livello dell'elemento responsivo all'ormone (*hormone responsive element*, HRE), e un dominio che lega il ligando (*ligand binding domain*, LBD) (fig. 14) che funge da dominio attivatore. Sono stati fino ad oggi descritti più di 60 recettori nucleari, molti dei quali mancano di un ligando specifico e pertanto vengono detti recettori "orfani"

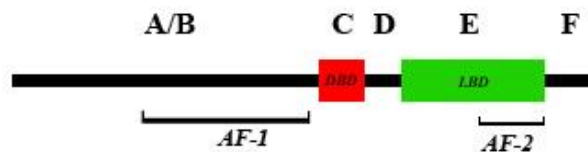


Figura 14: illustrazione della struttura del recettore per gli ormoni steroidei.

Sia la regione C che include il dominio che lega il DNA, sia la regione E che comprende il dominio che interagisce con il ligando presentano delle sequenze altamente conservate, mentre per le altre regioni A/B, D ed F non si riscontrano particolari omologie tra recettori paraloghi. La regione D, essendo collocata tra la regione C e la regione E sembra agire da regione cerniera altamente flessibile, inoltre, parte della sua sequenza NH₂-terminale è integralmente contenuta nel dominio DBD e coinvolta nelle dinamiche di dimerizzazione del recettore. La regione F risulta essenziale nel

legame con il ligando in tutti i sottotipi recettoriali tranne che per il sottotipo ER α . La distribuzione intracellulare dei recettori steroidei è il risultato di due dinamiche differenti: la diffusione passiva nucleo-citoplasma ed il trasporto attivo citoplasma-nucleo ATP mediato. All'equilibrio la maggior parte dei recettori ER, AR e PR è localizzata nel nucleo grazie all'azione dei segnali di localizzazione nucleare (*nuclear localization signal*, NLS). Tutti i recettori steroidei, quando non interagiscono con il ligando, sono associati con complessi multi-proteici costituiti da proteine *heat shock protein*, Hsp90, Hsp70 e Hsp56, che mantengono il recettore nella forma inattiva ma al tempo stesso lo rendono capace di legare l'ormone. Il legame con il ligando determina l'attivazione del recettore che diviene quindi capace di indurre la trascrizione dei geni bersaglio. Tale capacità è garantita dalle attività di due zone, dette *activation function 1* (AF-1) ed AF-2, localizzate rispettivamente nella regione A/B e a valle della regione E, che, agendo sinergicamente, connettono il recettore all'apparato trascrizionale mediante fattori di trascrizione basali, fattori trascrizionali sequenza-specifici e coattivatori trascrizionali. Dopo aver effettuato il legame con l'HRE, i recettori nucleari inducono la trascrizione dei geni target tramite il reclutamento da parte di AF-1 ed AF-2 di alcune proteine o complessi di proteine che consentono l'apertura della cromatina e dei componenti dell'apparato trascrizionale, e che risultano infine nella formazione del complesso di preinizio [Rosenfield MG 2006]. Oltre a promuovere l'attivazione della trascrizione dei geni bersaglio, i recettori nucleari possono anche reprimere l'espressione di geni specifici attraverso alcuni complessi multi proteici definiti corepressori. Tra gli elementi di regolazione della steroidogenesi maggiormente studiati ricordiamo il fattore steroidogenico 1 (*steroidogenic factor*, SF-1) che risulta essere altamente espresso nei tessuti steroidogenici come i surreni e le gonadi, ma anche nell'ipotalamo ventromediale, nella pelle e nella milza [Ramayya MS, 1997]; tale fattore è stato inizialmente descritto come regolatore trascrizionale degli enzimi steroidogenici, CYP11B1, CYP21, CYP17 e CYP19 mediante il legame diretto con i promotori di tali geni [Rice DA, 1996], successivamente esso è anche stato correlato alla regolazione della trascrizione dei geni codificanti per 3 β -HSD, StAR, e SULT2A1 [Sugawara et al. 1996].

MINERALCORTICOIDI E CENNI DI FISIOPATOLOGIA

I principali ormoni steroidei ad azione mineralcorticoide sono l'aldo ed il DOC, anche F può mediare una debole attività mineralcorticoide, benché la sua inattivazione a cortisone (E) nel distretto renale ad opera dell'enzima 11 β -HSD II ne limita gli effetti. L'aldo è sintetizzato nella zona glomerulare della corticale del surrene a partire dal DOC mediante l'attività dell'enzima 18-HSD (CYP11B2) (Fig. 15). Il sistema renina-angiotensina risulta essere il maggior induttore della secrezione di aldo (Fig. 16) sia in risposta alla ipoperfusione renale sia in risposta alle variazioni fisiologiche del volume plasmatico dovute alla postura eretta; anche la dopamina, il potassio e l'ormone adrenocorticotropo (*adrenocorticotropin hormone*, ACTH) concorrono a tale regolazione [Greenspan e Strewler, 1997].

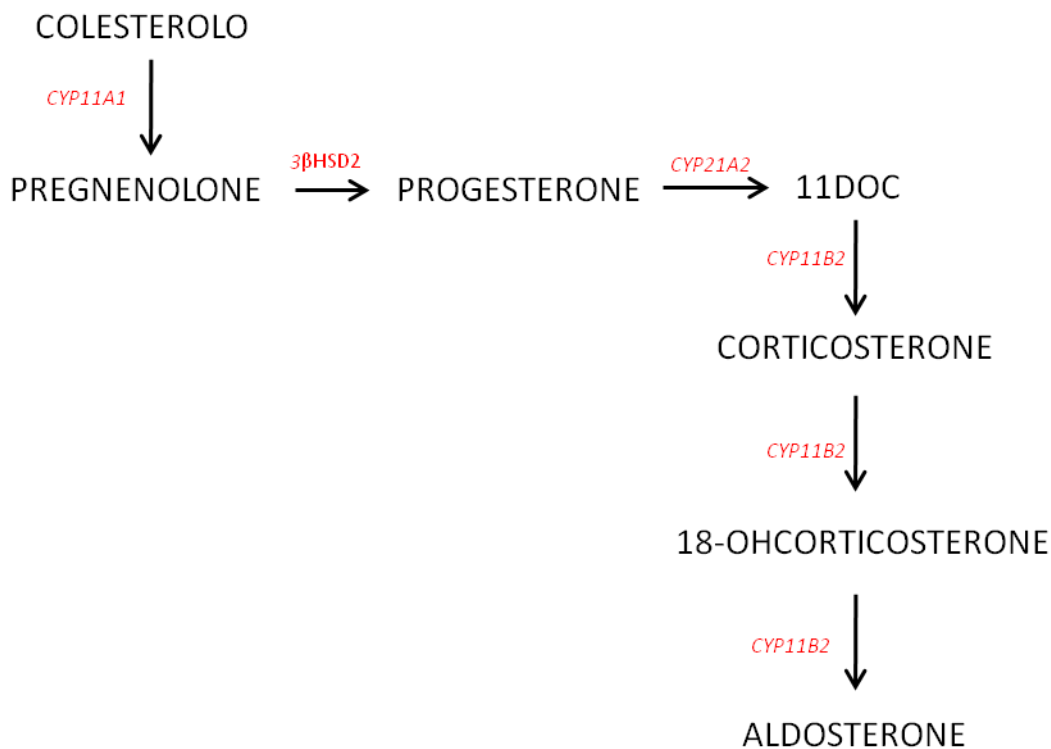


Figura 15: illustrazione semplificata della biosintesi surrenalica degli ormoni mineralcorticoidi.

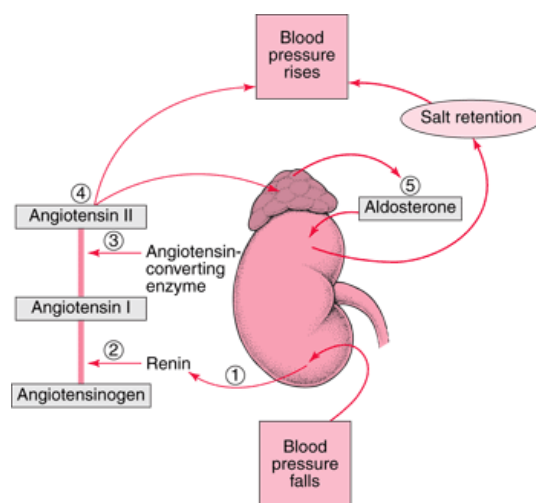


Figura 16: regolazione della secrezione di aldosterone mediante sistema renina-angiotensina.

L'aldo è caratterizzato da un'emivita media di circa 15-20 minuti, dopodiché viene velocemente inattivato dal fegato, con la formazione di tetraidroaldosterone, e dal rene, mediante la formazione di aldosterone-18-glucuronide. Il DOC circolante è quasi completamente legato alla CBG, anche esso viene metabolizzato nel fegato tramite la produzione di tetraidrodeossicorticosterone, coniugato con acido glucuronico ed eliminato tramite le urine. Gli ormoni mineralcorticoidi agiscono mediante la regolazione del riassorbimento di sali a livello renale al fine di regolare il volume plasmatico ed extracellulare e quindi la pressione arteriosa [Greenspan e Strewler, 1997].

-Ipertensione da mineralcorticoidi-

L'aumento dei livelli attivi di aldo circolante provoca inizialmente un aumento della ritenzione di sodio e di liquidi causando aumento del peso corporeo, del volume extracellulare e della gittata cardiaca. Se le alterazioni perdurano per un periodo significativo, tale stato patologico diventa cronico provocando un aumento delle resistenze vascolari periferiche.

-Iperaldosteronismo primitivo-

Quando a livello della zona glomerulare sono presenti iperplasie o adenomi, questi possono causare l'aumento della produzione di aldo e generare stati patologici. Il 75% dei casi di iperaldosteronismo

primitivo è provocato dalla presenza di un adenoma secernente aldo. L'aumento del volume plasmatico e del volume extracellulare è avvertito dai recettori di stiramento a livello dell'apparato juxtaglomerulare, mentre l'aumento del flusso di sodio è avvertito dalle cellule della macula densa; tale quadro si conclude con l'inibizione del sistema renina-angiotensina, la riduzione delle riserve di potassio, ed un'aumentata escrezione di ioni H^+ con conseguente alcalosi metabolica.

-Deficit di 17α -idrossilasi/ $17,20$ liasi-

Tale deficit causa un eccesso di produzione di DOC, B, 18-OH-B e 18-OH-DOC causato dalla mancanza dell'attività 17α -idrossilante ed dall'impossibilità di sintetizzare androgeni ed estrogeni; viene spesso riscontrato durante la pubertà in base alla presenza di ipertensione, ipopotassemia, ed amenorrea primaria nelle donne e pseudoermafroditismo nei maschi.

-Deficit di 11β -idrossilasi-

Detta anche "sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi (AME)" tale deficit enzimatico causa iperplasia surrenalica congenita, viene diagnosticata nel neonato o nel bambino a causa della chiara virilizzazione e dalla presenza di ipertensione ipocaliémica. Risultano aumentati gli androgeni, l' $11S$, il 17-OHP4, i 17-chetosteroidi urinari ed i 17-idrossicorticosteroidi

-Deficit di 11β -HSD tipo II-

Tale isoenzima è altamente espresso a livello del tubulo renale, il suo deficit determina l'incapacità di disattivare F mediante la conversione in E; tale evento provoca l'accumulo di F ed il suo conseguente legame ai recettori dei mineralcorticoidi. La sintomatologia tipica comprende ipertensione, ipopotassemia, renina soppressa in concomitanza con bassi valori di DOC e aldo.

-Deficit di 21α -idrossilasi-

L'assenza totale dell'attività di tale enzima compromette anche la via di sintesi dell'aldo, causando la comparsa della sintomatologia da perdita di sali, quali iponatriemia ed ipokaliemia durante i primi giorni di vita del neonato. Nel caso di deficit parziali di 21α -idrossilasi si avranno soltanto la riduzione dei livelli di F con conseguente mancanza del *feedback* negativo sulla secrezione dell'ACTH e quindi sovra stimolazione della corteccia surrenale che esita nell'iperplasia dall'organo. Inoltre, vi è una

deviazione dei precursori di F verso la via di sintesi degli androgeni, che conduce ad una precocità dello sviluppo somatico e sessuale nei maschi e ad una virilizzazione nelle femmine.

-GLUCOCORTICOIDI E CENNI DI FISOPATOLOGIA-

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei che svolgono moltissimi processi biologici fondamentali quali la crescita, la riproduzione, il metabolismo intermedio, le reazioni immunitarie infiammatorie, la funzionalità del SNC e del sistema cardiovascolare. F rappresenta il principale ormone ad azione glucocorticoide; esso viene prodotto nella zona fascicolata della corticale del surrene mediante la 17 α -idrossilazione del P5 mediata dall'enzima 17 α -idrossilasi (CYP17A1, P450c17) all'interno del reticolo endoplasmatico a formare 17 α -idrossipregnenolone (17OHP5) (Fig. 17). L'ormone ipofisario ACTH rappresenta lo stimolo più importante alla secrezione di F, e il suo rilascio è a sua volta regolato dall'ipotalamo mediante l'ormone stimolante il rilascio di corticotropine (*corticotropin release hormone*, CRH) e dalla vasopressina (Fig. 18). L'ACTH agisce sulla corteccia surrenale stimolandone sia il trofismo sia l'attività secretoria, un deficit prolungato di ACTH causa atrofia surrenalica, mentre una iperstimolazione conduce all'ipertrofia surrenalica. I livelli di F circolanti sono finemente regolati mediante l'inibizione a *feedback* della secrezione di ACTH da parte di F [Greenspan e Strewler, 1997].

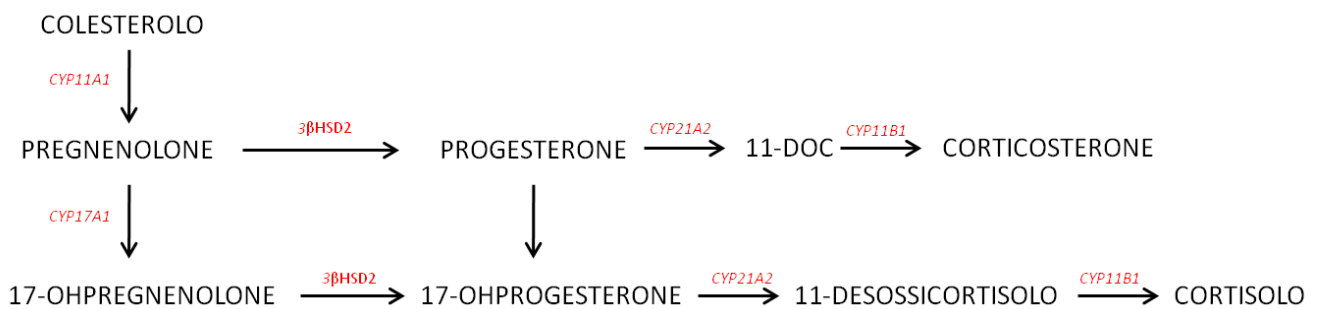


Figura 17: illustrazione semplificata della biosintesi surrenalica degli ormoni glucocorticoidi

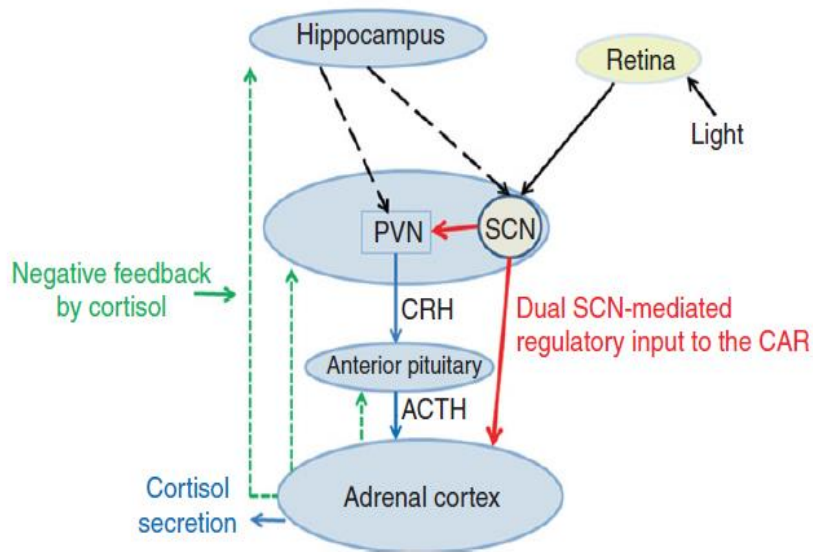


Figura 18: regolazione dell'asse HPA (Hypothalamic–pituitary–adrenal axis).

-Ritmo circadiano-

I livelli circolanti di F risultano ridotti nella tarda serata e continuano a ridursi durante le prime ore della notte fino a raggiungere valori molto bassi; nelle prime ore del giorno invece, si verificano gli episodi secretori principali, che culminano nel momento del risveglio, quando si ha un picco secretivo, oltre il quale la concentrazione di F si abbassa nuovamente. La secrezione si riduce progressivamente durante il giorno con aumenti in corrispondenza dell'assunzione di cibo e dell'esercizio fisico; vi sono tuttavia importanti differenze intra e inter-individuali, inoltre il ritmo circadiano risente di notevoli influenze e può essere facilmente modificato attraverso variazioni nel modo di dormire, dall'esposizione al buio e alla luce e dalla periodicità dei pasti [Oster H et al. 2017].

-Risposta allo stress-

Una delle situazioni parafisiologiche che altera maggiormente la periodicità circadiana della secrezione di F è lo stress; ACTH ed F sono rilasciati in circolo in risposta ad eventi stressanti, come l'ipoglicemia, i traumi fisici ecc. Tali risposte originano nel SNC e modulano la funzionalità dell'asse HPA mediante la produzione e rilascio del CRH da parte dell'ipotalamo e quindi dell'ACTH da parte dell' ipofisi [Russell et al. 2019].

-Regolazione della secrezione mediante *feedback*-

Tale regolazione coinvolge due meccanismi distinti: l'inibizione a *feedback* rapida e l'inibizione a *feedback* ritardata. L'inibizione rapida dipende dalla variazione della quota di glucocorticoidi e non dalla concentrazione assoluta di glucocorticoidi, è una fase transitoria e dura meno di 10 minuti. L'inibizione a *feedback* ritardata sopprime ulteriormente la secrezione di CRH ed ACTH mediante meccanismi dipendenti sia dalla durata temporale della somministrazione sia dalla dose, quindi, in seguito ad una somministrazione prolungata di glucocorticoidi, i livelli di ACTH continuano a scendere fino a diventare non responsivi ad ulteriori stimolazioni.

F si lega alla proteina plasmatica CBG per circa il 75 % della sua quota totale, all'albumina per il 15%, mentre il restante 10% circola in forma libera. Il metabolismo epatico provvede alla coniugazione di circa il 95% dei metaboliti di F che vengono in seguito eliminati tramite le urine. F viene inattivato anche a livello renale ad opera dell'enzima 11β -HSD II. Nell'uomo F è lo steroide ad azione glucocorticoide più significativa, i glucocorticoidi sintetici, come il prednisone ed il desametasone, possiedono un'affinità più alta per il recettore dei glucocorticoidi e quindi un'attività biologica maggiore; anche gli steroidi endogeni B ed aldosterone fungono da agonisti ma, circolando a concentrazioni molto basse, tali steroidi non sono in grado di mediare una significativa attività glucocorticoide. F ed in generale gli agonisti glucocorticoidi hanno un forte impatto su molte funzioni biologiche fondamentali: per quel che concerne il metabolismo, gli effetti sono minimi sul soggetto che si alimenta regolarmente; durante il digiuno, invece, i glucocorticoidi contribuiscono al mantenimento di livelli di glucosio circolante stimolando la gluconeogenesi sostenuta dagli aminoacidi ottenuti da un aumento del catabolismo proteico. F antagonizza gli effetti dell'insulina inibendo la captazione periferica del glucosio sia nel muscolo sia nel tessuto adiposo, in quest'ultimo stimola anche la lipolisi con rilascio di glicerolo e acidi grassi liberi. Le sindromi da eccesso di cortisolo sono caratterizzate da iperglicemia, iperinsulinemia, perdita di tessuto muscolare con alterazioni nella distribuzione del grasso corporeo e aumento di peso [Greenspan e Strewler, 1997].

-Effetti su altri tessuti e funzioni-

L'eccesso di glucocorticoidi circolanti inibisce i fibroblasti determinando perdita di collagene e di tessuto connettivo. Quando tale eccesso permane nel tempo si determina un assottigliamento della

pelle con formazione di strie rubre e lenta guarigione delle ferite. I glucocorticoidi inibiscono anche la deposizione di osso, promuovendone il riassorbimento attraverso il paratormone e la vitamina- D_3 ; l'eccesso di glucocorticoidi causa un bilancio negativo del calcio, determinato dall'aumento dell'escrezione urinaria e da una diminuzione dell'assorbimento intestinale. In tale situazione le concentrazioni sieriche di calcio sono mantenute a livelli omeostatici solo a spese di un riassorbimento netto di osso con conseguente osteopenia invalidante. Il cortisolo e tutti gli agonisti glucocorticoidi regolano molteplici aspetti delle reazioni immunitarie ed infiammatorie; essi agiscono aumentando il numero delle cellule polimorfonucleate intravasali prodotte dal midollo osseo e diminuendo il numero di linfociti, dei monociti e degli eosinofili circolanti, inibiscono inoltre la fosfolipasi A_2 , un enzima implicato nella sintesi delle prostaglandine, il rilascio di molecole effettrici della risposta infiammatoria come le interleuchine, la produzione e la *clearance* degli anticorpi. Il sistema immunitario, a sua volta, modula l'asse HPA attraverso le interleuchine. Infine, i glucocorticoidi influenzano anche l'attività cardiaca, renale, gonadica, tiroidea ed alcune attività del SNC. Nel distretto cardiaco i glucocorticoidi modulano l'espressione dei recettori adrenergici, possono quindi influenzare la risposta alle catecolamine al fine di aumentare la gittata cardiaca e le resistenze periferiche. Nel rene tali steroidi determinano un aumento della filtrazione glomerulare e della ritenzione idrica. Per quel che concerne la funzione gonadica, i glucocorticoidi inibiscono la secrezione di gonadotropine, nella donna sopprimono anche la risposta dell'ormone luteizzante LH all'ormone stimolante il rilascio di gonadotropine GnRH, che determina una riduzione degli estrogeni e del progesterone, inibizione dell'ovulazione ed amenorrea.

Considerando la molteplicità delle interazioni mediate dal cortisolo con numerose funzioni biologiche fondamentali, appare chiaro come la regolazione fine della quantità di ormone circolante sia il presupposto essenziale per il mantenimento dell'omeostasi e quindi dello stato di salute. Alterazioni in uno o più punti chiave di tale regolazione determina l'instaurarsi di vari stati patologici caratterizzati dall'aumento o dalla diminuzione della concentrazione di cortisolo circolante [Greenspan e Strewler, 1997].

-Sindrome di Cushing-

E' una sindrome caratterizzata dall'eccesso cronico di glucocorticoidi che vengono secreti al di fuori del controllo circadiano a causa di anomalie a livello dell'ipofisi o del surrene o a causa di tumori

extraipofisiari che secernono ACTH. La causa più frequente è quella farmacologica, come conseguenza della terapia con glucocorticoidi; il quadro clinico comprende una serie di segni e sintomi caratteristici [Greenspan e Strewler, 1997]:

- **Obesità:** è il sintomo che si riscontra per primo e più frequentemente, è detta obesità di tipo centrale in quanto coinvolge per lo più il volto, il dorso, il tronco e la zona addominale. L'accumulo di grasso sul volto causa la tipica faccia a luna piena (*facies lunare*) mentre l'accumulo nella zona dorsocervicale causa la cosiddetta gobba di bufalo.
- **Ipertensione:** anche l'ipertensione è un sintomo tipico della sindrome di Cushing; la pressione diastolica risulta superiore a 100mmHg in circa il 50% dei casi, tale sintomo rappresenta il fattore di maggiore morbilità e mortalità a lungo termine per tali pazienti.
- **Manifestazioni cutanee:** l'atrofia del connettivo e dell'epidermide provoca assottigliamento della pelle e pletora facciale, un'aumentata suscettibilità a traumi minimi in concomitanza di una ritardata guarigione delle ferite ed aumento della frequenza delle infezioni fungine. Strie rubre addominali sono riscontrabili nella metà dei pazienti, più raramente si riscontra iperpigmentazione della pelle o la presenza di acne dovuta a stati di iperandrogenismo.
- **Osteoporosi:** segni evidenti di osteopenia significativa sono spesso riscontrati nei pazienti affetti da sindrome di Cushing; ogni osteopenia in giovani adulti non spiegabile, come fratture dei piedi, delle coste e delle vertebre, è spesso segno della presenza di alterazioni della secrezione e dei livelli dei glucocorticoidi.
- **Alterazioni gonadiche:** le disfunzioni gonadiche sono causate, nella donna, dall'aumento degli androgeni circolanti, e nei maschi dall'aumento del cortisolo circolante. Nelle donne in età premenopausale spesso si verifica amenorrea ed infertilità, mentre

negli uomini i sintomi sono la riduzione della libido accompagnata dalla riduzione del volume testicolare e perdita dei peli corporei.

- **Irsutismo:** è presente in circa l'80% delle donne affette, di solito l'aumento della crescita dei peli è preponderante nella zona facciale ma può verificarsi anche al torace alle cosce ed ai seni. L'irsutismo è causato dall'aumento della quota di androgeni surrenalici circolanti.
- **Alterazioni neurologiche:** la comparsa di disturbi neurologici lievi si riscontrano nella maggioranza dei pazienti. I sintomi più frequentemente riscontrati sono l'aumentata irritabilità e l'instabilità emotiva, spesso si accerta la presenza di ansia e depressione, difficoltà a concentrarsi e riduzione della performance mnemonica.
- **Tromboembolismo venoso:** l'ipercoagulabilità è determinata da elevati livelli di fattore VIII, fattore IX e fattore di Von Willebrand in associazione ad aumentata produzione di trombina.
- **Infezioni opportunistiche:** a causa della depressione del sistema immunitario, i pazienti con sindrome di Cushing sono soggette ad aumentato rischio di sviluppare infezioni da germi opportunisti ed infezioni fungine alle mani e piedi.

ORMONI SESSUALI E CENNI DI FISIOPATOLOGIA

Gli ormoni sessuali vengono sintetizzati in gran parte nelle gonadi, ovaie e testicoli, ed in piccola quantità nelle cellule della zona reticolata nella corticale del surrene. Le principali molecole ad azione androgenica del surrene sono: il DHEA, precursore primario degli estrogeni naturali, il DHEA solfato (DHEAS), e l'androstenedione (A4). Le ghiandole surrenali sintetizzano inoltre minime quantità di T ed E2 (Fig. 19).

Nell'uomo il T è prodotto principalmente dalle cellule del Leydig situate nel testicolo dall'enzima 17β -HSD ed i suoi effetti possono esser divisi in due grandi categorie: gli effetti legati alla funzione riproduttiva ed allo sviluppo dei caratteri secondari maschili e gli effetti legati alla stimolazione della crescita e della maturazione dei tessuti non riproduttivi. Nella donna il P4, il principale ormone sessuale femminile insieme agli estrogeni, non è prodotto dalle cellule del surrene, bensì viene secreto dalle ovaie in quantità minime durante la prima parte del ciclo mestruale; i livelli dell'ormone aumentano dopo l'ovulazione nella fase progestinica del ciclo, durante la quale il P4 svolge il suo ruolo principale: creare le condizioni adatte per la fecondazione della cellula uovo ed il suo successivo annidamento nella mucosa uterina. Il P4 ha poi funzioni secondarie riguardanti modificazioni strutturali e funzionali della ghiandola mammaria e delle tube [Greenspan e Strewler, 1997].

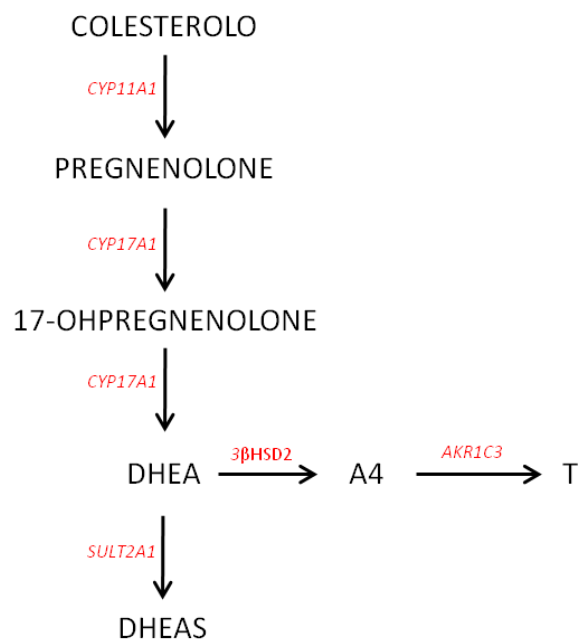


Figura 19: illustrazione semplificata della biosintesi surrenalica degli ormoni sessuali.

Anche la via di sintesi degli ormoni sessuali può essere compromessa a vari livelli, sia a causa di alcuni deficit enzimatici, sia per alterazioni della funzionalità degli organi coinvolti nel processo di sintesi. I difetti a livello delle prime tappe della sintesi steroidea comportano alterazioni gravi come lo pseudoermafroditismo e la sindrome androgenitale con associata perdita di sali nel caso venga interessata anche la via di sintesi degli altri steroidi.

Il deficit di C-17,20 liasi: causa accumulo di 17-OHP4 e di 17-OHpregnenolone (17-OHP5) che non possono essere convertiti in DHEA ed A4 inibendo così la sintesi di T. Il sintomo clinico più evidente della mancanza di T sarà l'ambiguità dei genitali esterni. Può verificarsi anche un accumulo di androstenedione che non può essere convertito in T a causa di un deficit dell'enzima 17 β -HSD; in questa condizione patologica si verifica la totale assenza dei genitali esterni maschili.

Un deficit dell'enzima 5 α -reduttasi porta ad una carenza di diidrotestosterone (DHT), conseguenza di un difetto nella riduzione di T. Tale deficienza è causa di una specifica forma di pseudoermafroditismo maschile, l'ipospadia perinscrotalepsuedovaginale [Greenspan e Strewler, 1997].

VIE BIOSINTETICHE E METABOLICHE NON TRADIZIONALI

Androgeni C19 11-ossidati

Il T è considerato il principale androgeno attivo circolante. Il DHT, che è il più potente ormone androgeno conosciuto viene sintetizzato, a partire dal T, al livello intracellulare dall'enzima 5 α -reduttasi. Nell'uomo i testicoli rappresentano la principale fonte di T, mentre nelle donne sia le gonadi che il surrene producono le maggiori quantità di androgeni a partire da A4 e dal DHEA. Tutti gli androgeni C19 11-ossidati sono prodotti dall'enzima CYP11B1 (*Fig. 20*) che risulta maggiormente espresso nella zona fascicolata e nella zona reticolare del surrene. La funzione principale di tale enzima è catalizzare la tappa finale della sintesi di F mediante la conversione dell'intermedio 11S. CYP11B1 può anche utilizzare A4 e T come precursori e dare luogo alla sintesi di 11 β -idrossiandrostenedione (11-OHA4) e 11 β -idrossitestosterone (11-OHT). In alternativa 11-OHA4 può essere anche prodotto a partire da F, sebbene tale via biosintetica sia relativamente minore [Axelrod LR. et al. 1973]. A loro volta 11-OHA4 e 11-OHT possono essere ossidati dall'enzima 11 β -

HSD II, reazione che porta alla formazione di 11-ketoandrostendione (11-KA4) ed 11-ketotestosterone (11-KT); tale reazione avviene sia nel surrene che in periferia. Sebbene sia nota da tempo, la capacità del surrene di convertire A4 in 11 β -OHA4 mediante l'enzima CYP11B1, tale ormone è stato tuttavia etichettato come metabolita inattivo fino agli ultimi anni, in cui il suo ruolo di precursore steroidogenetico è stato rivalutato; esso viene infatti prodotto dal surrene in risposta all' ACTH [Rege J. et al. 2013] e al pari di A4 e DHEA, precursori non androgenici che conducono alla sintesi di T, il metabolismo periferico dell'11-OHA4 conduce alla sintesi di 11-KT e 11-KDHT [Storbeck KH et al. 2013], i quali legano il recettore AR con un'affinità ed una potenza simile a quella del T e del DHT, rispettivamente [Pretorius E. et al. 2016]. Tali presupposti hanno portato alla rivalutazione del ruolo fisiopatologico di tali androgeni soprattutto nel contesto della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) [O'Reilly MW et al. 2017], del deficit di 21-idrossilasi [Turcu AF et al. 2016] ed del cancro alla prostata resistente alla castrazione [Pretorius E. et al. 2016]. Ciò nonostante il ruolo fisiopatologico degli androgeni C19 11-ossidati rimane largamente poco compreso. Inoltre, non ci sono attualmente studi che abbiano valutato tali steroidi in pazienti con alterazioni della steroidogenesi ascrivibili alla presenza di lesioni surrenaliche.

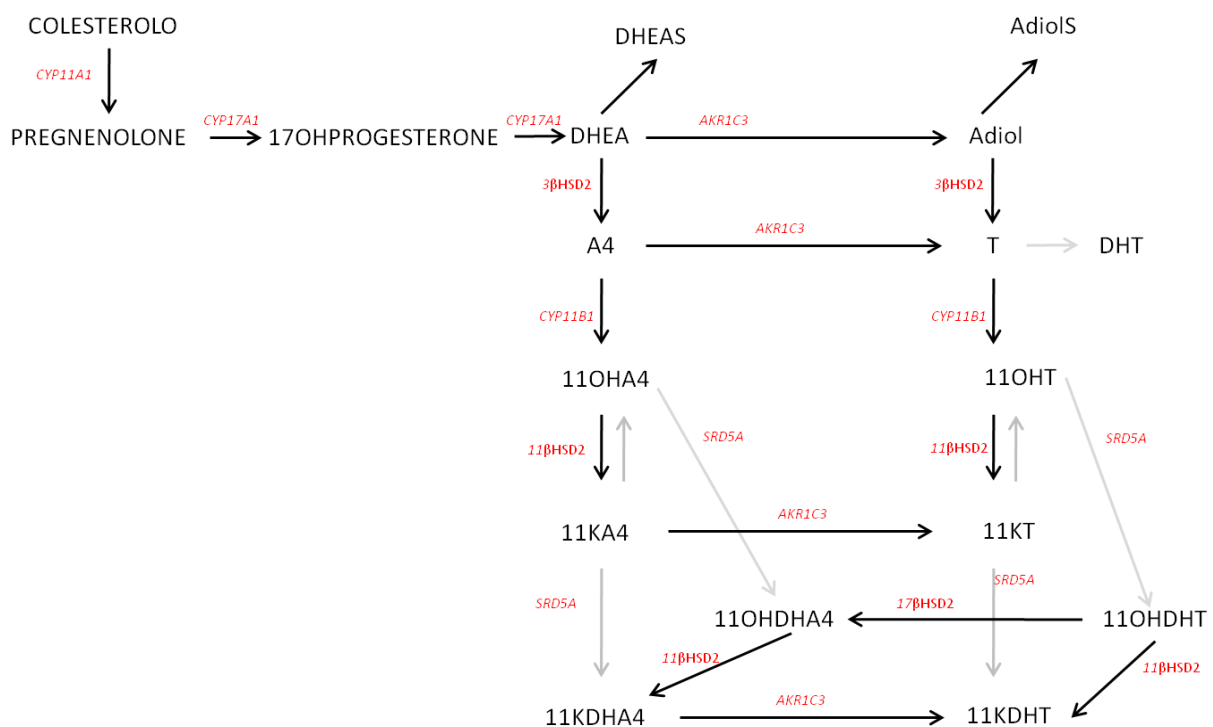


Figura 20: illustrazione della biosintesi degli androgeni C19 11-ossidati

Metabolismo del progesterone

Il P4 ricopre un ruolo centrale nella steroidogenesi surrenalica, quindi anche il suo metabolismo impatterà in maniera importante tutti gli eventi biosintetici a valle. Il P4 viene idrossilato dall'enzima CYP17A1 con conseguente produzione di 16-OHP4 e 17-OHP4 con rapporto costante di 2:1 [Storbeck KH. et al. 2008]. P4 e 17-OHP4 entrano poi nella via mineralcorticoide e glucocorticoide, rispettivamente, impattando quindi su tutta la produzione steroidea surrenalica (Fig. 21). Il 16-OHP4 è localizzato maggiormente al livello del surrene, delle ovaie e dei testicoli. Esso non subisce ulteriori trasformazioni e dopo essere stato rilasciato in circolo potrebbe sia agire al livello intracellulare mediante il recettore steroideo dei tessuti target o legarsi a recettori plasmatici ed effettuare un signaling rapido di tipo non genomico. Tale metabolita può anche accumulare nel tessuto dove viene prodotto e mediante il legame al recettore steroideo indurre risposte fisiologiche. Evidenze sperimentali hanno rivelato che il 16-OHP4 viene secreto ciclicamente durante il ciclo mestruale ed aumenta proporzionalmente in circolo durante la gravidanza, parallelamente al P4, per poi declinare rapidamente *post-partum* [Stiefel e Ruse, 1969]. Inoltre alcune evidenze sperimentali ad oggi disponibili hanno indicato che la conversione, operata dal rene, del P4 in 16-OHP4, possa limitare l'effetto anti-mineralcorticoide del P4. Tale reazione potrebbe quindi indicare una funzione protettiva del metabolita 16-OHP4. Livelli elevati di 16-OHP4 sono stati riportati nei pazienti con sindrome di Cushing [Vilae et al. 1964] ed in caso di iperplasia surrenalica congenita con perdita di sali [Janoski et al. 1969]. Sebbene il ruolo fisiologico del 16-OHP4 non è stato chiarito del tutto, i dati ad oggi disponibili suggeriscono un ruolo nella regolazione del bilancio elettrolitico, della funzionalità del sistema riproduttivo maschile e femminile [Storbeck KH. et al. 2008]. Inoltre, non ci sono attualmente studi che abbiano valutato tale steroidi in pazienti con alterazioni della steroidogenesi ascrivibili alla presenza di lesioni surrenaliche.

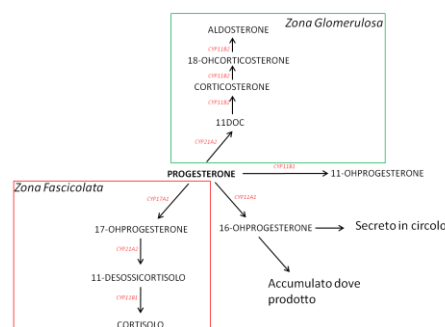


Figura 21: illustrazione semplificata del metabolismo surrenalico del progesterone

Metabolismo del cortisolo

Il metabolismo di F è finemente regolato in maniera tessuto-specifica. La principale via metabolica di F è la disattivazione con conversione in E, operata al livello renale. Inoltre sia F che E vengono idrossilati con la formazione di 6 β -OHF e 6 β -OHE al livello epatico. Segue poi l'escrezione urinaria dei metaboliti idrossilati tetraidrocortisone (THE), 5 β -tetraidrocortisolo (THF) e 5 α -tetraidrocortisolo (allo-THF).

Per molti anni il processo metabolico di F è stato principalmente relegato al fegato. Tuttavia, negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali hanno indicato come il metabolismo di F possa avvenire in numerosi organi e tessuti diversi. Inoltre, il recettore GR è presente nel surrene stesso [Briassulis et al. 2011]. Sebbene i meccanismi di feedback negativo siano stati ampiamente descritti e caratterizzati al livello centrale, la regolazione intra-surrene della produzione dei glucocorticoidi rimane piuttosto misconosciuta. A livello molecolare, è noto che i glucocorticoidi mediano un segnale di feedback negativo intra-surrene attraverso la regolazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel processo biosintetico dei glucocorticoidi: mentre l'ACTH induce SF-1 e reprime DAX-1 [Gummow et al. 2006], il segnale glucocorticoide può indurre la trascrizione di DAX-1 e reprimere StAR attraverso il recettore nucleare Nur11 [Martin e Tremblay 2008]. Tali evidenze suggeriscono che la secrezione pulsatile dei glucocorticoidi venga regolata dall'equilibrio tra il segnale stimolatorio ACTH-mediato ed il segnale inibitorio glucocorticoidi-mediato intra-surrene. Tuttavia, quando la secrezione dei glucocorticoidi risulta elevata, come al mattino o in situazioni di stress, la regolazione intra-surrene potrebbe essere bypassata [Spiga F. et al. 2015]. Non sono disponibili evidenze riguardo il ruolo del metabolismo di F intra-surrene in pazienti con incidentaloma surrenalico.

Gli step metabolici principali sono illustrati in figura 22.

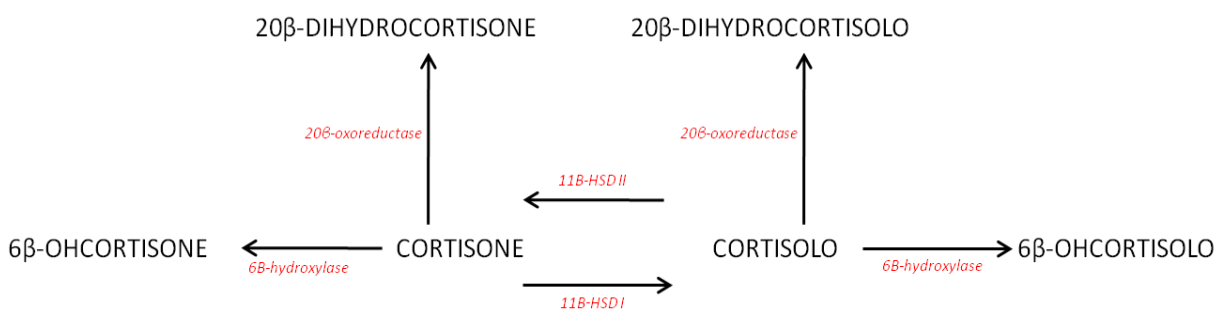


Figura 22: illustrazione semplificata del metabolismo del cortisolo. Le reazioni al livello renale sono omesse.

3-INCIDENTALOMA SURRENALICO

Definizione - Epidemiologia - Eziologia

Si definisce incidentaloma surrenalico una massa del surrene individuata durante esami di *imaging* che non venivano eseguiti per sospetta patologia surrenalica. Tali lesioni hanno un' eziologia variabile che include masse di tipo maligno o benigno che possono originare dalla zona corticale, dalla zona midollare o avere un'origine extra-surrenale.

Gli incidentalomi surrenalici sono estremamente rari nei bambini. Negli adulti, gli studi basati sull'*imaging* riportano una prevalenza di circa 4-5%, mentre gli studi basati sulle autopsie riportano una prevalenza di circa il 2%. Tutti gli studi sottolineano l'aumento di prevalenza con l'età avanzata [Bovio S et al. 2006].

Management Clinico degli Incidentalomi Surrenalici

- Stato Dell'Arte -

Durante gli ultimi dieci anni sono state riportate numerose evidenze cliniche e sperimentali che hanno consentito la definizione delle attuali linee guida sulla diagnosi, gestione e percorso terapeutico ottimale dei pazienti con incidentaloma surrenalico [Fassnacht M et al. 2016]. Le principali problematiche cliniche legate alla presenza di una massa del surrene sono essenzialmente quattro: la valutazione della potenziale malignità della massa, la definizione e la gestione delle masse a secrezione subclinica di glucocorticoidi, la valutazione della necessità della rimozione chirurgica e la definizione del follow-up più appropriato in caso di non rimozione.

La valutazione del potenziale di malignità della massa surrenalica scoperta incidentalmente dovrebbe avvenire contestualmente alla sua individuazione. La valutazione mediante *imaging* della omogeneità interna e della quantità di lipidi può fornire un'indicazione utile sulla natura benigna della massa. La tecnica di elezione per tale valutazione risulta essere la tomografia computer guidata senza contrasto (*non contrast CT-SCAN*). Per le masse con valore Hounsfield ≤ 10 unità (CT), e diametro < 4 cm non è necessario effettuare ulteriori valutazioni di *imaging*. Qualora non si riesca a determinare tali caratteristiche mediante CT-SCAN e la massa non mostri chiari segni di secrezione autonoma di ormoni è possibile valutare tra tre opzioni: la rivalutazione immediata dell'*imaging* con

tecniche alternative, la rivalutazione dell'imaging a 6 - 12 mesi o la rimozione chirurgica immediata [Fassnacht M et al. 2016].

La valutazione dell'attività secretoria della massa avviene in seguito alla valutazione clinica di eventuali segni e sintomi di eccesso ormonale. Per una valutazione dinamica dell'attività secretoria disregolata viene effettuato il test di soppressione mediante la somministrazione di desametasone (DST). Le masse che mostrano livelli di F post test DST ≤ 50 nmol/L (1.8 $\mu\text{g/dL}$) vengono classificate come "non secernenti". Per livelli di F tra 51 e 138 nmol/L (1.9-5.0 $\mu\text{g/dL}$) le masse surrenaliche vengono considerate come "probabili secernenti". Se i livelli di F post DST risultano >138 nmol/L le lesioni vengono definite "secernenti". Per tali pazienti è necessario effettuare la valutazione della pressione arteriosa e del metabolismo glucidico al fine di escludere la presenza di ipertensione e diabete mellito di tipo II. Per tutti i pazienti in valutazione per la rimozione chirurgica è necessario la conferma che la secrezione autonoma di F sia ACTH indipendente. Risulta inoltre fondamentale la valutazione delle metanefrine plasmatiche libere o urinarie per l'esclusione del feocromocitoma. Nei pazienti con ipertensione o ipokaliemia è necessaria la valutazione del rapporto renina / aldo al fine di escludere l'aldosteronismo primario [Fassnacht M et al. 2016].

La rimozione chirurgica risulta mandatoria in presenza di secrezione ormonale autonoma da massa surrenalica unilaterale, mentre la rimozione di masse unilaterali benigne senza secrezione ormonale viene attualmente sconsigliata. Anche l'approccio chirurgico ottimale cambia a seconda delle caratteristiche del paziente: per le masse unilaterali ≤ 6 cm con sospetta malignità e senza evidenze di invasione locale si raccomanda la rimozione mediante laparoscopia. Qual ora siano presenti segni di invasione locale si consiglia un approccio "open". Per tutte le altre situazioni si consiglia un approccio personalizzato in base alle caratteristiche del paziente.

Il *follow-up* dei pazienti che non vengono sottoposti ad adrenalectomia prevede che nel caso di masse chiaramente benigne non siano effettuare ulteriori valutazioni mediante *imaging*.

In pazienti con masse surrenaliche indeterminate all'imaging che non vengono sottoposti a chirurgia si consiglia la rivalutazione dell'imaging a 6 - 12 mesi per escludere un'eventuale aumento delle dimensioni della massa.

Non risulta necessario effettuare ulteriori valutazioni della secrezione ormonale in aggiunta a quella iniziale se non nel caso della comparsa di nuovi segni e sintomi di eccesso ormonale, o del peggioramento di eventuali comorbidità. Nei pazienti con secrezione autonoma di F che non vengono sottoposti a chirurgia si consiglia la rivalutazione annuale della presenza di segni e sintomi

di eccesso di F. In base a tale criterio, per tali pazienti, si devono valutare i potenziali benefici della rimozione chirurgica della massa [Fassnacht M et al. 2016].

Tale situazione clinica può essere ulteriormente complicata in alcune circostanze particolari.

In presenza di masse bilaterali è necessario valutare entrambe lesioni mediante lo stesso protocollo di imaging e di valutazione biochimica. In aggiunta a quanto descritto in precedenza per la massa monolaterale si consiglia di effettuare la valutazione dei livelli di 17-OHP4 al fine di escludere la presenza di iperplasia surrenalica congenita ad insorgenza tardiva. Inoltre è utile valutare la presenza di insufficienza surrenalica qualora sussista un sospetto di alterazioni bilaterali di tipo infiltrative ed emorragiche. In tali pazienti si sconsiglia la rimozione bilaterale della masse se non in presenza di segni di sindrome di Cushing.

Nel caso di massa surrenalica in bambini e giovani adulti <40 anni la rapidità della valutazione della lesione risulta fondamentale in quanto sussiste un elevata probabilità di potenziale maligno. In tali casi è consigliabile la valutazione dell'imaging mediante MRI [Fassnacht M et al. 2016].

-Rischio cardiovascolare in pazienti con incidentaloma surrenalico-

Durante gli ultimi 20 anni, numerose evidenze sperimentali hanno mostrato come pazienti con lesioni surrenaliche secernenti presentino un aumentato rischio di insorgenza dell'ipertensione e di alterazioni cardiovascolari [Di Dalamzi G. et al. 2019, 2014; Arruda M. et al. 2017; Morelli V et al. 2017]. L'insorgenza dell'ipertensione è l'alterazione più frequente in pazienti con secrezione autonoma di F con una prevalenza di circa il 60 %. Inoltre alcuni studi hanno riportato anche l'aumento significativo dello spessore intima - media in tali pazienti rispetto ai soggetti che presentavano una massa non secernente [Yener S et al. 2009].

Nonostante il ruolo dei glucocorticoidi nello sviluppo delle alterazioni cardiache sia stato studiato già in passato, le recenti tecnologie hanno consentito la definizione precisa delle variazioni trascrizionali e dell'outcome fenotipico del signaling glucocorticoide sulle cellule cardiache. Recentemente, lo studio di Severinova E. e colleghi ha rivelato una serie di nuovi targets cardiaci dei glucocorticoidi che possono essere implicati nello sviluppo dell'ipertrofia dei cardiomiociti da eccesso di glucocorticoidi [Severinova et al. 2019].

Anche l'alterazione del ritmo circadiano di F è stato riconosciuto come un fattore in grado di contribuire negativamente allo sviluppo di eventi cardiovascolari avversi. Alcuni studi hanno rivelato

che l'appiattimento del ritmo circadiano di F è associato con un aumento della mortalità cardiovascolare nella popolazione generale [Di Dalmazi G. 2019].

Una recente valutazione del cortisolo salivare circadiano mediante LC-MS/MS in 106 pazienti con incidenataloma surrenalico ha rivelato che i soggetti con massa secernente mostravano un'area sotto la curva di F salivare più elevata nei confronti dei soggetti con massa non secernente. Tale differenza era tuttavia dovuta principalmente ad elevati valori della mattina, mentre risultavano non significative le differenze nella sera [Ceccato F. et al. 2018].

-Trattamento farmacologico dell'ipercortisolismo-

Data la complessità clinica di tale scenario, il trattamento farmacologico dell'ipercortisolismo ricopre un ruolo centrale nella riduzione dei livelli circolanti di F quando la rimozione chirurgica risulta inefficace e/o controindicata. Tra le opzioni farmacologiche efficaci nell'inibire la steroidogenesi vi è il metirapone, un potente inibitore dell'enzima CYP11B1 la cui azione è in grado di bloccare la conversione dell'11S in F. Il metirapone esercita una potente inibizione della steroidogenesi consentendo una riduzione dei livelli di F entro 30 minuti dall'assunzione di una singola dose orale. La dose di partenza è compresa tra i 500-1000 mg/die e può essere incrementata in seguito alla valutazione dei livelli di F [Nieman LK. Et al. 2015]. Il trattamento farmacologico con metirapone può causare l'aumento compensatorio dei livelli di ACTH, accumulo del precursore di F, dell'11S, dell'DOC e di alcuni androgeni. In conseguenza di tali alterazioni biochimiche possono presentarsi alcuni eventi avversi correlati sia all'aumento del tono mineralcorticoide quali ipertensione, edema ed ipokaliemia o all'elevazione degli androgeni circolanti quali acne ed irsutismo.

Un recente studio multicentrico retrospettivo ha riportato una riduzione media della secrezione di F nel 50 % dei casi dopo una media di 8 mesi di trattamento [Daniel E et. al 2015].

Tuttavia in tali pazienti, oltre alla riduzione generale dei livelli circolanti di F, è auspicabile anche la regolarizzazione del ritmo circadiano di tale ormone. Non sono presenti dati in letteratura riguardo i livelli di F salivare alla mezzanotte durante la terapia con metirapone in quanto la maggior parte degli studi hanno valutato i livelli di UFC come *outcome* principale.

L'accumulo dei livelli di alcuni precursori di F come l'11S pone un'ulteriore limitazione al dosaggio routinario di F, in particolare per le piattaforme di dosaggio immunometriche, basate sulla reazione antigene-anticorpo, principalmente a causa della cross-reattività di tali precursori, che presentano

una struttura molecolare molto simile a F stesso [Owen et al 2010]. I metodi di dosaggio basati sulla spettrometria di massa sono all'oggi considerati il gold-standard per il dosaggio degli steroidi nella pratica clinica. Data l'elevata sensibilità garantita dalle moderne piattaforme analitiche basate su MS è oggi possibile dosare gli steroidi anche in matrici biologiche alternative al siero quali saliva, capelli ecc., espandendo di fatto le applicazioni cliniche di tale dosaggio.

Altra opzione terapeutica per la riduzione di F circolante è rappresentata dal ketoconazolo, un agente antifungino che inibisce la steroidogenesi. Esso si è dimostrato efficace come monoterapia in pazienti con sindrome di Cushing garantendo un miglioramento biochimico nel 75% dei casi con evidenze di regressione dei sintomi nel 60% dei casi [Tritos NA e Biller BMK, 2018]. Inoltre è anche possibile utilizzare il trattamento combinato di metirapone e ketoconazolo, in particolare per un controllo rapido della cortisolemia.

4-SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo principale di tale elaborato è stato quello di analizzare retrospettivamente il profilo circolante steroideo in un'ampia coorte di pazienti con incidentaloma surrenalico, mediante l'utilizzo di un metodo LC-MS/MS precedentemente sviluppato e pubblicato dal nostro gruppo [Fanelli F. et al. 2011], sia in condizioni basali che dopo test di soppressione con DST. Abbiamo poi valutato l'impatto delle variazioni di tali profili sulla salute cardiovascolare dei pazienti durante il periodo di *follow-up*, al fine di identificare nuovi predittori del rischio cardiovascolare in tali pazienti.

Lo scopo secondario è stato lo studio preliminare della steroidogenesi intra-lesione, attraverso il confronto dei livelli di steroidi presenti nella lesione rispetto al tessuto normale corrispondente, mediante lo sviluppo ed applicazione di un metodo di dosaggio per gli steroidi da tessuto surrenalico, utilizzando la tecnologia della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem. In tal senso verranno studiati anche alcuni steroidi non "tradizionali" quali i metaboliti finali di F: 20 α -diidro cortisone (20 α -DHE) e 20 β -diidro cortisone (20 β -DHE); i metaboliti del P4: 11-OHprogesterone (11-OHP4) e 16-OHprogesterone (16-OHP4) ed alcuni intermedi della sintesi degli androgeni (back-door): 11-idrossiandrostenedione (11-OHA4), 11-ketoandrostenedione (11-KA4), 11-idrossitestosterone (11-OHT) e 11-ketotestosterone (11-KT).

5-MATERIALI E METODI

COMPOSTI, REAGENTI E STRUMENTAZIONE

Gli standard puri in forma liofila: aldo, 20 α -DHE, 20 β -DHE, E, F, 11S, B, A4, 11-OHA4, 11-KA4, 11-OHT, 11-KT, 21S, T, DOC, 11-OHP4, 16-OHP4, 17-OHP4, 17-OHP5, DHEA, P4 e P5, sono stati forniti dalla ditta Steraloids Inc. Ltd. (Newport USA). Gli IS deuterati d7-aldo, d7-E, d4-F, d8-B, d5-T, d5-A4, d9-P4, d8-17OHP4, sono stati invece forniti dalla ditta CDN Isotope (Pointe Claire, Canada). Le polveri sono state pesate con una bilancia di precisione Mettler-Toledo AG (Greifensee, Svizzera). Tutte le soluzioni sono state conservate a -30°C. Per il test di soppressione con DST è stato utilizzato Decadron 1 mg in compresse (Visufarma, Roma, Italia). Per la cromatografia e per la fase preanalitica sono stati utilizzati solventi grado gradiente: metanolo (MeOH) e diclorometano (DCM) Licrosolv® Merck (Darmstadt, Germania). Acqua ultra pura è stata ottenuta tramite il sistema MilliQ Gradient A10 Millipore (Volketswil, Svizzera). Per la soluzione di deproteinizzazione è stato utilizzato zinco solfato eptaidrato ZnSO₄(H₂O)₇ fornito dalla ditta Merck. L'albumina sierica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) utilizzata come matrice per la preparazione delle curve di calibrazione ed il fluoruro d'ammonio (NH₄F), utilizzato nella fase mobile acquosa, sono stati fornita dalla Sigma – Aldrich (St.Louis, USA). L'estrazione in fase solida è stata effettuata mediante l'uso di colonnine Isolute SPE Columns C18 100 mg 1 mL fornite dalla ditta Biotage (Uppsala, Svezia). Sono stati utilizzati tubi di vetro 12x75 mm forniti dalla ditta Laboindustria SPA (Arzergrande, Italia) e tubi in PIREX® 13x100 mm (Sigma Aldrich). Per la sonicazione dei pezzi chirurgici sono state utilizzate provette FALCON in polipropilene 15 mL (Sarstedt AG & Co. KG, Germany). Per l'analisi del campione in LC-MS/MS sono state utilizzate provette da autocampionatore in vetro 12x32 mm, 2 mL, con inserti in vetro da 300 μ L (Agilent USA). Sono state utilizzate pipette Gilson, Inc. (Middleton, USA) a spostamento negativo di range 20-200 μ l e 100-1000 μ l, con precisione ed accuratezza periodicamente revisionate; pipette a spostamento positivo per solventi Microman Gilson di range 5-50 μ L, 10-100 μ L e 100-1000 μ L. I tessuti surrenalici sono stati dissolti mediante l'utilizzo di un sonicatore manuale U50 control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany).

L'HPLC modulare Serie 200 composto da due micropompe, una pompa quaternaria, un alloggiamento per colonna termoregolato, un autocampionatore con alloggiatore per provette termostatato di tipo *peltier*, è stato fornito dalla PerkinElmer® (Shelton, USA). Le colonne analitiche utilizzate sono state una Luna C8 100x4.6 mm 5 μ m ed una Kinetex C8 100x3.0 mm 2.6 μ m con la precolonna C8 4x2 mm, 5 mm fornite dalla Phenomenex (Torrance, CA, USA). La colonna preparativa

POROS R1/20 2.1x30 mm è stata prodotta da Applied Biosystems (Foster city, CA, USA). La valvola a dieci vie utilizzata è stata fornita dalla VICI Valco Instruments Co. Inc. AG International (Schenkon, Svizzera). Il metodo è stato sviluppato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo 4000 Q-Trap fornito dalla ditta AB-SCIEX abbinato ad una sorgente APCI per l'analisi degli steroidi sierici e una sorgente ESI per l'analisi degli steroidi tissutali. La piattaforma informatica è costituita dal software Analyst® 1.6.1 su computer Dell Precision M390 (Dell Computer Corporation 2001, USA)

SOGGETTI

I soggetti inclusi nello studio, maggiorenni e di razza caucasica, giungevano all'unità di Endocrinologia del S.Orosola-Malpighi nel periodo di tempo tra il 2009 e il 2017, con diagnosi di incidentaloma surrenalico, ricevuta mediante tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (RM), effettuate per motivi clinici non riguardanti il surrene. Abbiamo escluso i pazienti con lesioni con sospetto di malignità, lesioni di tipo infiltrativo e le cisti. Sono stati inoltre esclusi i soggetti con storia di assunzione di steroidi o di farmaci che potevano interferire con la steroidogenesi. Dopo l'esclusione dei soggetti con feocromocitoma, iperaldosteronismo primario ed iperplasia surrenalica congenita ad esordio tardivo abbiamo potuto analizzare 302 soggetti. Come gruppo di controllo abbiamo utilizzato una coorte di 214 soggetti arruolati per uno studio precedente [Fanelli et al. 2013] appaiati per età (mediana e range interquartile (IQR) 61.9 [56.0-66.9] e 64.2 [55.1-71.0] anni per i controlli ed i pazienti rispettivamente, $P=0.130$) e per il sesso (prevalenza delle femmine 57.9% e 66.1% per i controlli ed i pazienti, rispettivamente, $P=0.06$). Dalla coorte dei controlli abbiamo escluso i soggetti con diabete, ipertensione, dislipidemia, pregressa patologia surrenalica, ipercortisolismo e terapia farmacologica potenzialmente interferente con la steroidogenesi. Tutti i soggetti hanno firmato il consenso informato e lo studio è stato approvato dal comitato etico.

VALUTAZIONE RADIOLOGICA

Tutte le immagini radiologiche sono state valutate dallo stesso radiologo. In accordo con le correnti linee guida, abbiamo definito adenoma surrenalico una massa del surrene con margini regolari e valore di Hounsfield (HU) pre-contrasto <10 , o con un valore HU pre-contrasto ≥ 10 , associato ad un *washout* assoluto $>60\%$ o ad un *washout* relativo $<40\%$ dopo l'infusione del mezzo di contrasto [Fassnacht M et al. 2016]. L'iperplasia surrenalica è stata definita come un nodulo surrenalico

monolaterale o bilaterale associato ad un aumento dello spessore del *limb* surrenalico > 5 mm o come noduli bilaterali multipli [Schneller J et al. 2014]

VALUTAZIONE ORMONALE

Le valutazioni ormonali sono state effettuate dopo tre mesi di *washout* dalla terapia ormonale sostitutiva o da contraccettivi orali. Per le donne fertili le stesse valutazioni sono state effettuate durante la fase follicolare del ciclo mestruale. Il prelievo di sangue veniva effettuato al mattino tra le 08:00 e le 09:00, in condizioni di digiuno e dopo 15 minuti di infusione intra-venosa di soluzione salina. Il giorno precedente al prelievo di sangue tutti i pazienti hanno raccolto le urine delle 24 ore per il dosaggio del UFC. Le valutazioni basali includevano il dosaggio dell' ACTH, del glucosio e del metabolismo lipidico. Per la valutazione dello stato di funzionalità della massa è stato effettuato il test di soppressione con 1 mg DST su prelievo di sangue effettuato mediante le stesse procedure precedentemente descritte dopo che il paziente avesse assunto 1 mg di DST alle 23:00 della sera precedente.

VALUTAZIONE CLINICA

Abbiamo misurato e registrato l'indice di massa corporea (*body mass index*, BMI) e la circonferenza vita. I soggetti con pressione arteriosa >140/90 mmHg o in attiva terapia farmacologica dell'ipertensione sono stati definiti come ipertesi. Abbiamo diagnosticato il diabete di tipo II nei soggetti con glicemia a digiuno ≥ 7.0 mmol/L, emoglobina glicata ≥ 48.0 mmol/L o glicemia ≥ 11.1 mmol/L due ore dopo test da carico glicemico con 75.0 g di glucosio assunto per via orale. [American Diabetes Association, 2010]. Abbiamo definito dislipidemici i soggetti con livelli di colesterolo totale ≥ 5.2 mmol/L e/o trigliceridi ≥ 1.7 mmol/L o in attiva terapia per dislipidemia. Abbiamo inoltre acquisito e registrato eventuali eventi cardiovascolari durante il *follow-up*.

CLASSIFICAZIONE DEI PAZIENTI

I pazienti sono stati categorizzati utilizzando le caratteristiche radiologiche della lesione e mediante la valutazione del livello di F post DST. 166/302 (55 %) soggetti presentavano un adenoma unilaterale mentre 136/302 (45 %) soggetti presentavano un iperplasia. Applicando le indicazioni delle linee guida correnti abbiamo definito non-secernenti (NS) le lesioni con cortisolo post-DST <50 nmol/L (204/302, 67 %) mentre le lesioni con cortisolo post-DST ≥ 50 nmol/L sono state definite a secrezione autonoma di glucocorticoidi (ACS) [Fassnacht M et al. 2016]. Utilizzando

contemporaneamente i criteri radiologici ed ormonali i soggetti sono stati raggruppati in adenomi NS (n=120), iperplasie NS (n=84), adenomi ed iperplasie associate ad ACS (n=46 and n=52, rispettivamente).

PROTOCOLLO DELLO STUDIO

Abbiamo analizzato retrospettivamente i dati di 121/302 (40 %) pazienti con minimo 6 mesi di *follow-up*. Il tempo di *follow-up* medio è stato di 39 mesi (IQR 6 - 106). Dopo l'ultimo *follow-up*, il peggioramento del controllo pressorio è stato definito come l'aumento del numero di farmaci antipertensivi assunti dal soggetto o in caso di pressione sanguigna >140/90 mmHg (misurata in orario di lavoro) senza l'aumento del numero dei farmaci. Nella valutazione degli eventi cardiovascolari abbiamo considerato: l'infarto acuto del miocardio (non fatale), l'angioplastica coronarica ed il bypass chirurgico in seguito ad ischemia o ictus ischemico.

STANDARD ASSAYS

L' ACTH e F post-DST sono stati misurati dal Laboratorio Centralizzato del Policlinico S. Orsola-Malpighi mediante una metodica chemoluminescente immunoenzimatica (Immulite 2000; Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germania). L'imprecisione intra- ed inter-day era 6% e 10%, rispettivamente. UFC è stato misurato dopo l'estrazione liquido-liquido con DCM mediante elettrochemiluminescenza (Elecsys E170, Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Svizzera) con una imprecisione intra- ed inter-day di 12% e 18%. I livelli di UFC sono stati corretti con la creatinina urinaria.

LC-MS/MS ASSAYS

Il pannello di 10 steroidi sierici quantificati mediante LC-MS/MS includeva: F, 11S, 21S, B, DOC, 17OHP4, A4, DHEA, T e P4. Il metodo analitico è stato precedentemente sviluppato e pubblicato dal nostro gruppo [Fanelli et al. 2011].

Brevemente, dopo la precipitazione delle proteine da 900 µL di siero e l'aggiunta degli standard interni, il campione, dopo essere stato purificato mediante estrazione in fase solida, veniva iniettato nel sistema cromatografico bidimensionale, purificato attraverso una colonna preparativa a perfusione e separato mediante la colonna analitica Luna RP-C8 100×4.6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, California) in un tempo di analisi totale di 21 minuti. Gli analiti vengono poi ionizzati mediante la sorgente di ionizzazione a pressione atmosferica di tipo APCI e quantificati mediante la modalità analitica MRM (*multiple reactions monitoring*), mediante lo spettrometro di massa

API4000 QTrap (AB-Sciex). Ogni analita veniva quantificato monitorando una transizione ione padre / ione frammento per la quantificazione ed una seconda transizione ione padre / ione frammento per la valutazione della specificità. Le transizioni utilizzate ione padre / ione frammento massa / carica (m/z) per F, 11S, B, T, A4, DHEA, 17OHP4, e P4 erano le seguenti: 363.2/121.2 and 363.2/267.4, 347.2/109.1 and 347.1/97.0, 347.1/121.0 and 347.1/97.1, 289.2/97.1 and 289.2/109.1, 287.4/97.0 and 287.4/109.0, 271.3/197.2 and 271.3/213.3, 331.1/97.0 and 331.1/109.3, and 315.6/97.1 and 315.6/109.1, rispettivamente. Il rapporto ionico tra la transizione quantificante e quella qualificante è stato monitorato in ogni campione; il dato veniva escluso se tale rapporto eccedeva >20 % del valore IR atteso. La processazione dei dati e la quantificazione degli analiti veniva effettuata mediante il software Analyst 1.6.1 (AB-Sciex). L'imprecisione Intra- and inter-day erano <10 % e <11 %, rispettivamente. La sensibilità in siero era: 0.244, 0.078, 0.078, 0.310, 0.019, 0.039, 0.781, 0.078, and 0.049 ng/mL for F, 11S, B, T, A4, DHEA, 17OHP4, and P4, rispettivamente.

Il metodo analitico LC-MS/MS per il dosaggio di 21 steroidi da tessuto surrenalico è stato sviluppato specificamente per gli scopi di questa tesi ed includeva: aldo, 20 α -DHE, 20 β -DHE, F, 21S, B, 11S, DOC, T, 11-KT, 11-OHT, DHEA, A4, 11-KA4, 11-OHA4, 11-OHP4, 16-OHP4, 17OHP4, 17-OHP5, P4 e P5.

Il protocollo per l'estrazione di tali steroidi dal tessuto surrenalico è stato sviluppato specificamente per gli scopi di questa tesi mediante l'utilizzo di surreni murini.

Il protocollo sviluppato era il seguente:

- Pesare i pezzi su bilancia analitica. Nel caso fosse necessario, tagliare con un bisturi monouso, su piastra Petri sterile, i pezzi più grandi fino ad un massimo di 100 mg/pezzo. Annotare la pesata di ogni pezzo.
- Inserire ogni pezzo in un tubo FALCON 15 mL precedentemente siglato. Tutti i tubi devono essere posizionati in ghiaccio.
- Aggiungere 200 μ L di MIX IS MeOH 50 % con multipette e punta dedicata.
- Aggiungere 800 μ L di MeOH 50 % con multipette e punta dedicata e tappare tutti i tubi.
- Mediante sonicatore omogenare ogni tubo con 3 minuti di sonicazione (cycle 1 sec, amplitudine 80 %).

- lavare con cura la punta del sonicatore tra un tubo ed il successivo mediante abbondante EtOH 70 % e carta.
- Centrifugare i tubi 15 minuti a 3500 RPM 4°C.
- Trasferire il sovrantante in provetta Eppendorf 1.5 mL e centrifugare 15 minuti, 13000 RPM, 4 °C.
- Trasferire il volume di sovrantante desiderato (200 µL) in tubi PIREX® 13x100 mm. Trasferire il restante volume in Eppendorf 1.5 mL e stoccare a -80°C per ulteriori analisi.
- Aggiungere 1 mL di DCM ad ogni tubo PIREX®, tappare tutti i tubi e vortexare in multivortex per 5 minuti.
- Centrifugare i tubi 15 minuti, 3500 RPM, 4°C.
- Mediante pipetta *Pasteur* di vetro 2 mL raccogliere il DCM e trasferirlo in tubi 12x75 mm.
- Portare a secco tutte le provette mediante flusso di N₂.
- Ricostituire tutti le provette mediante l'aggiunta di 200 µL MeOH 50%.

-Composizione della MIX IS-

La MIX IS viene preparata in MeOH 50 % (V/V %) e contiene i seguenti standard interni deuterati: d7-aldo, d7-E, d4-F, d8-B, d2-11S, d5-T, d5-A4, d8-17OHP4 e d9-P4.

Si noti che non essendo disponibili IS isotopici per tutti gli analiti in analisi alcuni IS vengono utilizzati per la quantificazione di più analiti.

-Costruzione della curva di calibrazione-

La curva di calibrazione viene preparata il giorno della seduta analitica per diluizione seriale (*Tab. 1*). Vengono dispensati 1 mL di MIX IS nel punto più alto della curva, ed 0.75 mL nei punti successivi. La miscela di analiti standard viene aggiunta alla concentrazione opportuna nel primo punto. Dopo aver vortexato per 2 minuti, 1 mL di questa soluzione viene trasferito nel successivo punto della curva e così via. L'ultimo punto, ovvero il bianco, che varrà come punto a concentrazione zero, viene preparato con la sola MIX IS.

Tabella 1: schema di costruzione della curva di calibrazione

N	CODICE LIVELLO	ng/mL	Vol mL tubo	Vol mL pt prec
1	A	1000.0	1.00	
2	C	250.0	0.75	0.25
3	E	62.5	0.75	0.25
4	G	15.6	0.75	0.25
5	I	3.91	0.75	0.25
6	M	0.977	0.75	0.25
7	O	0.244	0.75	0.25
8	Q	0.061	0.75	0.25
9	zero	0.000	0.75	/

-Condizioni cromatografiche-

La scelta delle migliori condizioni cromatografiche per effettuare l'analisi simultanea di 21 analiti (Fig. 23) si è basata soprattutto sulla necessità di risolvere cromatograficamente alcuni analiti rivelati in spettrometria di massa con lo stesso ione precursore e che generano spettri di frammentazione ampiamente sovrapponibili. Ad esempio DOC e 17-OHP4 sono analiti isobari, ovvero condividono lo stesso peso molecolare e lo stesso rapporto m/z dello ione precursore, e presentano uno spettro di frammentazione altamente sovrapponibile. La separazione cromatografica dei due analiti è quindi indispensabile. Esempio è anche il caso di B e dell'11S, anch'essi analiti isobari e con uno spettro di frammentazione sovrapponibile. La separazione cromatografica risulta, pertanto, indispensabile per una analisi quantitativa specifica ed accurata. Caso diverso ma ugualmente rilevante è quello del "cross-talk" a livello di sorgente. Analiti simili tendono infatti ad avere pesi molecolari molto vicini; quando la differenza di m/z è di solo 2 amu, come per le coppia A4 e T e E ed F, la naturale distribuzione isotopica delle molecole può generare una sovrastima aspecifica reciproca; ciò è possibile perché tali steroidi generano spettri di frammentazione molto simili, e i frammenti selezionati per le transizioni quantitative e qualitative sono condivisi. Anche in questo caso, l'elevata sovrapposizione dei due spettri di frammentazione rende necessaria la separazione cromatografica di questi steroidi. Inoltre è stato necessario utilizzare condizioni cromatografiche che consentissero anche la separazione degli isomeri 20 α -20 α -DHE e 20 β -DHE in quanto tali metaboliti di F posseggono lo stesso rapporto m/z e quindi vengono monitorate mediante lo stesso ione padre (361.0) .

La fase mobile acquosa (A) utilizzata per la separazione cromatografica è stata MeOH 20% 0.05 mM NH₄F, mentre la fase organica era costituita da MeOH 100%. Per la separazione degli analiti abbiamo utilizzato una colonna Kinetex C8 100x3.0mm 2.6µm (Phenomenex). Il gradiente risultato più adatto per la nostra analisi è illustrato nella seguente tabella (Tab. 2).

Tabella 2: schema del gradiente cromatografico utilizzato

Tempo (min.)	Flusso (µL/min.)	A (%)	B (%)
0.0	300	98	02
0.3	300	98	02
0.4	300	55.1	44.9
6.5	300	55.1	44.9
10.5	300	0	100
12.5	300	0	100
12.6	300	98	02
18.0	300	98	02

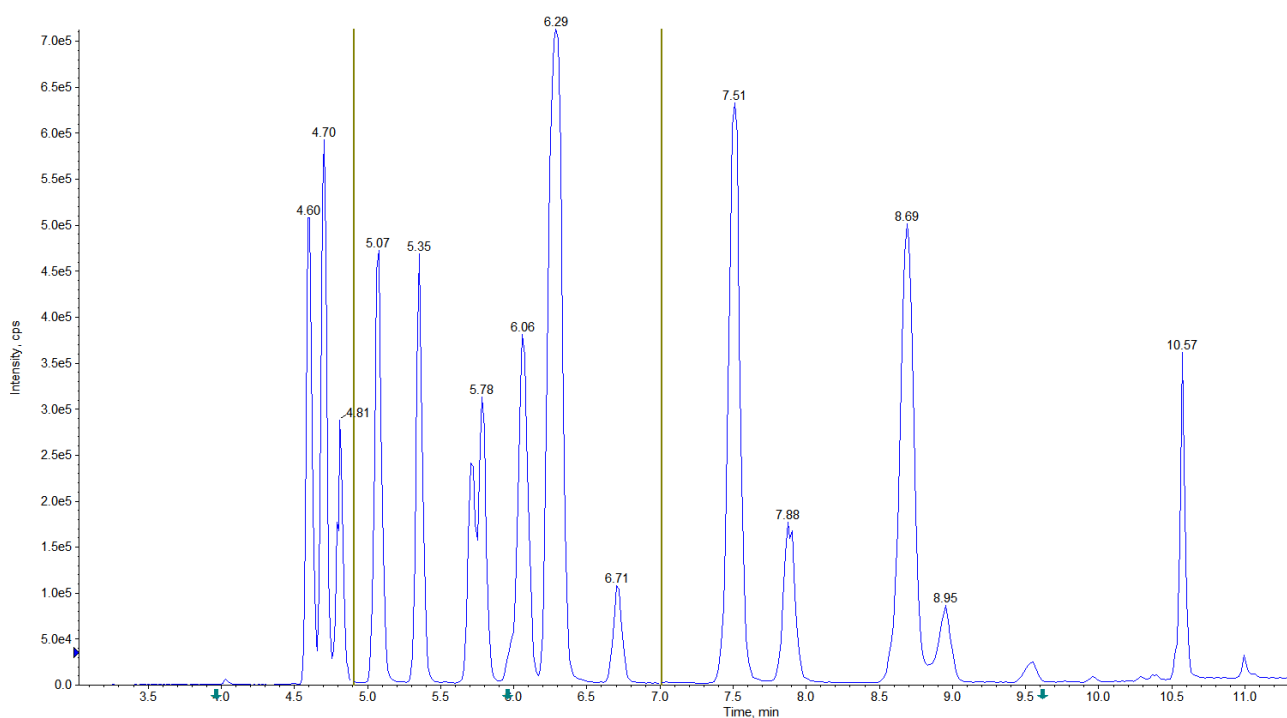


Figura 23: rappresentazione del cromatogramma contenente gli steroidi in analisi

ANALISI TESSUTO SURRENALICO

L'analisi dei tessuti surrenalici mediante spettrometria di massa è stata effettuata mediante l'uso di uno spettrometro API 4000-QTRAP® (AB-SCIEX). I parametri riguardanti le transizioni MRM sono stati ottimizzati, per ciascun analita e ISs, mediante l'infusione nella sorgente di standard puri in soluzioni le cui concentrazioni variavano da 100 ng/mL a 10 µg/mL, attraverso l'utilizzo di un infusore automatico impostato a 5 µL/min.

Nell'arco di un secondo lo spettrometro effettua un ciclo di scansione di tutte le transizioni inserite. La frazione di tempo assegnata a ciascuna transizione è detta "*dwell time*" (DWT): essa deve essere abbastanza ampia da permettere che un numero sufficiente di ioni possa giungere al rivelatore, ma allo stesso tempo deve consentire un avvicinarsi delle diverse transizioni sufficientemente rapido da permettere una definizione del picco di almeno 20 punti. Data la necessità di monitorare numerose transizioni, 2 per ogni analita e 1 per ogni ISs introdotto nel metodo, affinché ogni transizione disponga di un DWT sufficiente, l'intera corsa cromatografica è stata suddivisa in tre periodi, ovvero delle finestre temporali all'interno delle quali solo le transizioni degli analiti eluiti nel dato intervallo vengono monitorate.

La sorgente di tipo ESI è stata utilizzata in modalità di ionizzazione negativa (1 periodo) e positiva (2 e 3 periodo). I parametri di sorgente sono stati ottimizzati dapprima mediante l'analisi di standard puri ed in seguito mediante l'analisi di estratti di surrene murino cortesemente donati dal gruppo di ricerca del prof. Paolo Caraceni. Tali surreni sono stati prelevati durante le normali procedure di sacrificio ed espanto effettuate alla fine dello studio.

Il gas CAD utilizzato è stato l'azoto ad una pressione di 10 mTorr, gli altri parametri utilizzati sono: temperatura dell'elettrodo 650 °C, curtain gas (CUR), 30 psi, gas nebulizzatore 50 psi, gas di riscaldamento 30 psi. I parametri elettrici, specifici per ogni analita ed ISs sono stati determinati sperimentalmente e sono elencati in tabella n. 3. La ripartizione dei vari analiti nei tre periodi è stato il seguente:

I periodo: 0 - 4.9 minuti: 20α-DHE, 20β-DHE, Aldo.

II periodo: 4.9 - 7.0 minuti: F, 21S, B, 11S, 16OHP4, 11OHP4, 11KA4, 11OHA4, 11KT, 11OHT.

III periodo: 7.0 - 18 minuti: A4, DOC, T, 17OHP4, DHEA, 17OHP5, P4, P5.

Tabella 3: parametri strumentali utilizzati per l'analisi in spettrometria di massa per ogni steriode e relativo IS

ANALITA	Q1	Q3	DWT	DP	EP	CE	CXP
	m/z	m/z	ms	V	V	eV	V
Aldo 331	359.2	331.3	60	-70	-10	-20	-18
Aldo 189	359.2	189.1	60	-70	-10	-30	-10
20a-DHE 331	361.0	331.1	60	-105	-10	-25	-4
20a-DHE 271	361.0	271.1	60	-105	-10	-25	-3
20b-DHE 331	361.1	331.2	60	-130	-10	-25	-9
20b-DHE 315	361.1	315.5	60	-130	-10	-40	-7
E 301	359.0	301.0	60	-65	-10	-22	-11
E 329	359.0	329.0	60	-65	-10	-13	-9
d7-ALDO 193	366.2	193.0	60	-100	-10	-27	-4
d7-E 336	366.1	336.2	60	-90	-10	-15	-4
21S 121	347.1	121.1	35	70	10	35	10
21S 311	347.1	311.1	35	70	10	20	10
B 121	347.5	121.4	35	85	10	32	10
B 97	347.5	97.1	35	85	10	33	4
11S 109	347.3	109.3	35	100	10	35	5
11S 97	347.3	97.2	35	100	10	38	7
16OHP4 97	331.4	97.1	35	110	10	40	2
16OHP4 109	331.4	109.1	35	110	10	40	2
11OHP4 121	331.3	121.0	35	110	10	32	3
11OHP4 97	331.3	97.1	35	110	10	40	2
d2-11S 109	349.3	109.2	35	120	10	40	5
d8-B 125	355.3	125.2	35	130	10	35	3
11OHA4 121	301.3	121.2	35	90	10	35	3
11OHA4 257	301.3	257.2	35	90	10	31	13
11KT 121	303.3	121.2	35	100	10	35	3
11KT 259	303.3	259.3	35	100	10	30	12
11OHA4 121	303.3	121.1	35	90	10	35	3
11OHA4 267	303.3	267.4	35	90	10	25	13
11OHT 121	305.3	121.2	35	90	10	35	3
11OHT 105	305.3	105.2	35	90	10	60	5
F 121	363.4	121.3	35	100	10	35	3
F 145	363.4	145.4	35	100	10	45	4
d4-F 121	367.3	121.1	35	90	10	35	3
DOC 109	331.3	109.3	40	140	10	30	4
DOC 97	331.3	97.1	40	140	10	30	4
17OHP4 97	331.3	97.1	40	150	10	40	4
17OHP4 109	331.3	109.1	40	150	10	40	4
DHEA 271	271.3	213.3	40	70	10	30	11
DHEA 197	271.3	197.3	40	70	10	30	10
A4 109	287.2	109.1	40	70	10	35	7
A4 97	287.2	97.1	40	70	10	35	4
T 109	289.2	109.0	40	90	10	35	10
T 97	289.2	97.0	40	90	10	35	4
17OHP5 297	315.3	297.4	40	55	10	15	6
17OHP5 159	315.3	159.2	40	55	10	35	9
P4 97	315.2	97.1	50	150	10	32	8
P4 109	315.2	109.1	50	150	10	32	4
P5 159	317.4	159.3	50	30	10	30	11
P5 281	317.5	281.4	50	30	10	15	13
d5-A 100	292.3	100.3	40	110	10	30	2
d5-T 100	294.3	100.2	40	110	10	35	2
d8-17OHP4 113	339.4	113.2	40	100	10	40	3
d9-P4 100	324.4	100.2	40	110	10	35	2

lone precursore (Q1 mass, m/z), ione frammento (Q3 mass, m/z), *dwell time* (DWT, ms) declustering potential (DP, V), collision energy (CE, eV), cell exit potential (CXP, V) sono riportati per ogni analita.

ANALISI STATISTICHE

La coorte in analisi è stata descritta mediante l'uso della mediana, IQR e frequenza %. Le variabili categoriche sono state confrontate mediante il test χ^2 . Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante l'ANOVA ad una via o mediante Welch-ANOVA in caso di varianza non-uguale tra i gruppi. I confronti *post-hoc* sono stati effettuati mediante il test di Games-Howell. I risultati sono stati corretti per età e BMI mediante ANCOVA. Al fine di identificare il miglior valore soglia (*cut-off*) di F e B post-DST, con il miglior compromesso tra sensibilità e specificità per la diagnosi di ACS, abbiamo utilizzato le curve ROC (*receiver operating characteristic*). L'incidenza del peggioramento dell'ipertensione e degli eventi cardiovascolari è stata calcolata mediante le curve di Kaplan-Mayer. Per analizzare l'incidenza cumulativa degli eventi cardiovascolari e calcolare il rapporto di rischio (*hazard ratios*) è stato utilizzato il modello *Backward-stepwise Cox proportional-hazards model* con le seguenti variabili: eventi cardiovascolari precedenti, età, BMI, F, B, 11S, DHEA, A4 ed F post-DST. Il confronto tra i livelli di steroidi nel tessuto tumorale e nel tessuto sano corrispondente è stato effettuato mediante il calcolo della variazione % (tumore vs. tessuto normale). Sono state considerate significative le variazioni $\geq \pm 50$ %. Le analisi sono state effettuate mediante SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6-RISULTATI

CARATTERISTICHE BASALI E PROFILO STEROIDEO CIRCOLANTE

I dati antropometrici, le co-morbidità ed il profilo ormonale dei pazienti con lesioni NS e ACS sono mostrate in dettaglio in tabella 4.

I pazienti con ACS risultavano più anziani ($P=0.002$) e con delle dimensioni delle lesioni maggiori ($P<0.001$) rispetto alla coorte NS. Non vi sono differenze nella prevalenza dell'ipertensione tra i due gruppi. Considerando il sottogruppo con ipertensione, la prevalenza dei pazienti che assumevano tre o più farmaci antiipertensivi era significativamente più elevata nel gruppo ACS ($P<0.001$). I livelli di ACTH basale risultavano più bassi nei pazienti con ACS ($P<0.001$) mentre F post test di soppressione risultava più elevato in tale coorte ($P<0.001$), come atteso dalla definizione di ACS. Non sono emerse differenze significative sia nei livelli di ACTH post soppressione sia nei livelli di UFC, tra ACS ed NS (tabella 4).

Il profilo steroideo circolante dei controlli e dei pazienti è mostrato in dettaglio in tabella 5. In particolare, i pazienti con ACS mostravano livelli più elevati di F ($P=0.039$) e 11S ($P=0.004$) rispetto ai pazienti NS ed ai controlli. I livelli di DHEA in entrambi i sessi e di P4, solo nelle femmine, erano più bassi nei pazienti con adenoma con ACS. Inoltre abbiamo riscontrato, nei pazienti con iperplasia ACS, livelli più elevati di F e ridotti livelli di DHEA ed A4, solo nelle donne.

Il profilo steroideo circolante post-DST dei pazienti con incidentaloma surrenalico è mostrato in dettaglio in tabella 6. Il gruppo ACS è caratterizzato da livelli più elevati di F, 11S e B ($P<0.001$ per tutti), nei confronti del gruppo NS.

EVENTI CARDIOVASCOLARI E PROFILO STEROIDEO CIRCOLANTE

Per valutare la relazione tra gli eventi cardiovascolari e la secrezione disregolata degli ormoni glucocorticoidi in studio, la coorte dei pazienti è stata divisa in terzili di valori post DST di F, 11S e B. La prevalenza di eventi cardiovascolari e dell'ipertensione non è risultata differente tra i terzili per i tre ormoni (dato non mostrato). La prevalenza di pazienti che assumevano tre o più antiipertensivi aumentava progressivamente tra i terzili di F ($P=0.002$) e di B ($P=0.031$), ma non dell' 11S ($P=0.132$) (Fig. 24). Mediante l'analisi delle curve ROC abbiamo stabilito che il *cut-off* con il migliore compromesso tra sensibilità (se) e specificità (sp) per identificare i soggetti ACS mediante la valutazione di F e B post DST è 18.3 ng/mL (AUC 0.95, $P<0.001$, Se 89.6%, Sp 87.1%) e 0.33 ng/mL (AUC 0.80, $P<0.001$, Se 79.1%, Sp 72.8%), rispettivamente.

Abbiamo quindi utilizzato tali valori *cut-off* per riclassificare i pazienti in quelli che sopprimevano o meno F (+/-) (n=111 e n=28, rispettivamente) e quelli che sopprimevano o meno B (+/-) (n=17 e n=68, rispettivamente). Come mostrato in figura 25, la prevalenza dei pazienti che prendevano più di tre antipertensivi aumentava progressivamente tra i quartili (P=0.003). Inoltre, la prevalenza dei pazienti con ipertensione resistente al trattamento mostrava lo stesso andamento (P=0.033) (Fig. 25).

VALUTAZIONE DI PREDITTORI DI SALUTE CARDIVASCOLARE DURANTE IL FOLLOW-UP

Nel corso del follow-up (3.3 anni media, range 6-106 mesi), 40 pazienti hanno subito un peggioramento del controllo pressorio e 5 pazienti hanno avuto un evento cardiovascolare avverso. Le curve Kaplan-Meier per il peggioramento del controllo pressorio e l'insorgenza di eventi cardiovascolari avversi è mostrato in figura 26 .

L'incidenza di tali eventi non risultava differente tra i pazienti NS ed ACS (51.9 % vs 58.2 %, rispettivamente; P=0.284). Tuttavia, considerando solo i pazienti con adenoma, tale incidenza è risultata più elevata nei pazienti ACS rispetto a quelli NS (100 % vs 46 %, rispettivamente; P=0.004). Non sono emerse differenze in tale incidenza tra pazienti con iperplasia NS rispetto a quelli con iperplasia ACS (P=0.247). Il modello di rischio proporzionale di Cox ha evidenziato come i livelli di F post-DST (Hazard Ratio [HR] per 1 nmol/L di incremento 1.02, 95 % CI 1.01-1.03, P<0.001) ed i livelli basali di B (HR per 1 ng/mL di incremento 1.06, 95 % CI 1.01-1.12, P=0.031) siano tra i principali fattori predicienti lo sviluppo di nuovi eventi cardiovascolari del peggioramento del controllo pressorio, con un contributo indipendente del BMI (HR per 1 kg/m² incremento 1.07, 95%CI 1.00-1.15, P=0.045).

Tabella 4. Caratteristiche antropometriche, co-morbidità e caratteristiche ormonali dei pazienti con incidentaloma surrenalico.

	NS, n=204 mediana (IQR)	ACS, n=98 mediana (IQR)	P value
Caratteristiche antropometriche			
Età, anni	62.7 (53.7-70.0)	66.4 (59.1-72.3)	0.002
BMI, kg/m ²	28.5 (24.6-32.3)	27.8 (23.7-31.9)	0.345
Femmine, n/tot (%)	129/204 (63.2)	70/98 (71.4)	0.160
Menopausa, n/tot(%)	105/125 (84.0)	60/68 (88.2)	0.700
Fumatori, n/tot (%)	60/193 (31.1)	42/92 (45.7)	0.042
diametro lesione, mm	19 (14-25)	30 (21-36)	<0.001
Co-morbidità e terapie			
Ipertensione, n/tot (%)	127/204 (62.3)	69/98 (70.4)	0.165
≥3 farmaci ipertensione, n/tot (%)	29/127 (15.7)	31/69 (44.9)	<0.001
Patologia cardiaca da ipertensione, n/tot (%)	24/127 (18.9)	14/69 (20.3)	0.814
Patologia cardiovascolare, n/tot (%)	20/204 (9.8)	16/98 (16.3)	0.101
Infarto del miocardio, n/tot (%)	13/204 (6.4)	12/98 (12.2)	0.083
Ictus, n/tot (%)	7/204 (3.4)	4/98 (4.1)	0.778
Alterato metabolismo glucidico, n/tot (%)	64/204 (31.4)	36/98 (36.7)	0.177
Diabete tipo II, n/tot (%)	38/204 (18.6)	27/98 (27.6)	
Ridotta tolleranza glucosio, n/tot (%)	26/204 (12.7)	9/98 (9.2)	
Dislipidemia, n/tot (%)	84/204 (41.2)	42/98 (42.9)	0.782
Farmaco ipertensione, n/tot (%)	107/127 (84.3)	68/69 (98.6)	0.002
Farmaco antidiabetico, n/tot (%)	27/38 (71.1)	19/27 (70.4)	0.952
Farmaco dislipidemia, n/tot (%)	56/84 (66.7)	31/42 (73.8)	0.414
Caratteristiche Ormonali			
ACTH basale, pg/mL	13 (9-21)	10 (6-13)	<0.001
Cortisolo post-DST, nmol/L	33.1 (24.8-41.4)	71.7 (63.5-98.6)	<0.001
ACTH post-DST, pg/mL	4.9 (4.9-4.9)		0.102
UFC, µg/die	51.5 (37-74)	58.0 (40.7-98.7)	0.150

I dati sono espressi come mediana e range interquartile o frequenza.

BMI: indice di massa corporea (*body mass index*). DST: test di soppressione al desametasone

La prevalenza dei pazienti sottoposti a trattamento antiipertensivo, antidiabetico e ipolipemizzante è stata calcolata tra i pazienti con ipertensione, diabete e dislipidemia, rispettivamente.

Tabella 5. Caratteristiche e profilo steroideo circolante nei controlli e nei pazienti con incidentaloma surrenalico.

	Controlli n=214	NS n=204	ACS n=98	P value	P Value*
Caratteristiche generali					
Età, anni	61.9 (56.9-66.8)	62.7 (53.7-70.0)	66.4 (59.1-72.3)	0.002	
BMI, kg/m ²	25.6 (23.7-28.1)	28.5 (24.6-32.3)	27.8 (23.7-31.9)	<0.001	
Femmine, n/tot (%)	124/214 (57.9)	129/204 (63.2)	70/98 (71.4)	0.071	
Steroidi Sierici					
Cortisolo, ng/mL	118.4 (96.2-149.8)	114.0 (86.9-142.1)	128.7 (196.9-163.8) ^{c,b}	0.002	0.039
11-desossicortisolo, ng/mL	0.34 (0.22-0.54)	0.33 (0.23-0.55)	0.43 (0.28-0.69) ^{a, d}	0.005	0.004
Corticosterone, ng/mL	3.32 (1.94-5.30)	2.82 (1.60-4.35)	2.86 (1.74-4.87)	0.061	0.512
17-idrossiprogesterone, ng/mL	0.44 (0.24-0.91)	0.48 (0.24-0.97)	0.36 (0.24-0.68)	0.415	0.488
Progesterone, ng/mL					
<i>femmine</i>	0.048 (0.048-0.050)	0.053 (0.048-0.087) ^a	0.053 (0.048-0.084) ^a	<0.001	<0.001
<i>maschi</i>	0.058 (0.048-0.079)	0.066 (0.048-0.103)	0.067 (0.048-0.123)	0.201	0.021
Desidroepiandrosterone, ng/mL					
<i>femmine</i>	2.60 (1.44-4.04)	1.65 (0.08-2.77) ^a	0.90 (0.17-0.43) ^{a, b}	<0.001	<0.001
<i>maschi</i>	2.60 (1.92-4.00)	2.12 (1.12-3.90)	1.19 (0.80-1.99) ^{a, b}	<0.001	<0.001
Androstenedione, ng/mL					
<i>femmine</i>	0.33 (0.22-0.43)	0.41 (0.25-0.67)	0.29 (0.17-0.43) ^d	0.001	0.714
<i>maschi</i>	0.50 (0.40-0.67)	0.68 (0.49-1.11) ^a	0.68 (0.43-0.85)	<0.001	<0.001
Testosterone, ng/mL					
<i>femmine</i>	0.16 (0.13-0.24)	0.17 (0.10-0.24)	0.14 (0.09-0.22)	0.196	0.073
<i>maschi</i>	4.53 (3.58-5.52)	4.07 (3.04-5.28)	3.87 (3.45-4.52)	0.122	0.159

I dati sono espressi come mediana e range interquartile o frequenza.

BMI: indice di massa corporea (*body mass index*).

Game-Howell post-hoc:

^aP<0.01 vs I controlli

^bP<0.01 vs NS

^cP<0.05 vs I controlli

^dP<0.05 vs NS

*Corretto per età e BMI

Tabella 6. Caratteristiche e profilo steroideo post DST nei controlli e nei pazienti con incidentaloma surrenalico.

	NS n=147	ACS n=67	P value	P Value*
Caratteristiche generali				
Età, anni	63.7 (53.9-70.7)	66.9 (59.4-72.2)	0.035	
BMI, kg/m ²	28.9 (24.7-32.5)	27.5 (23.6-31.8)	0.289	
Femmine, n/tot (%)	85/147 (57.8)	46/67 (68.7)	0.131	
Steroidi Sierici				
Cortisolo, ng/mL	12.2 (9.8-15)	25.8 (21.8-30.5)	<0.001	<0.001
11-desossicortisolo, ng/mL	0.08 (0.08-0.1)	0.14 (0.09-0.19)	<0.001	<0.001
Corticosterone, ng/mL	0.30 (0.30-0.34)	0.44 (0.33-0.73)	<0.001	<0.001
17-idrossiprogesterone, ng/mL	0.23 (0.08-0.82)	0.16 (0.08-0.7)	0.286	0.710
Desidroepiandrosterone, ng/mL				
<i>femmine</i>	0.77 (0.77-1.18)	0.77 (0.77-0.80)		
<i>maschi</i>	0.94 (0.77-1.42)	0.81 (0.77-1.01)	0.264	0.243
Androstenedione, ng/mL				
<i>femmine</i>	0.19 (0.12-0.28)	0.16 (0.11-0.25)	0.271	0.759
<i>maschi</i>	0.38 (0.29-0.53)	0.38 (0.32-0.57)	0.948	0.394
Testosterone, ng/mL				
<i>femmine</i>	0.14 (0.07-0.19)	0.11 (0.06-0.19)	0.420	0.468
<i>maschi</i>	4.50 (3.32-5.49)	4.32 (3.52-5.42)	0.537	0.586

I dati sono espressi come mediana e range interquartile o frequenza.

BMI: indice di massa corporea (*body mass index*).

* Corretto per età e BMI

Figura 24. Confronto della percentuale (%) di pazienti con tre o più farmaci antipertensivi nei terzili di valori post DST di cortisolo, corticosterone e 11-desossicortisolo.

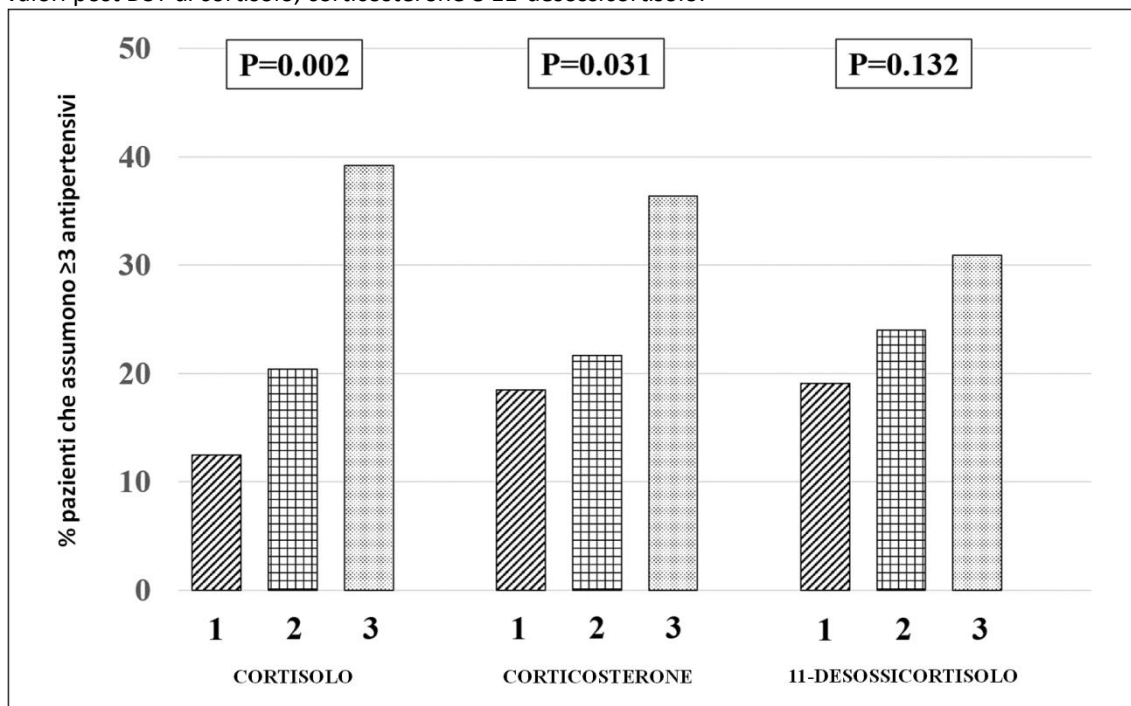
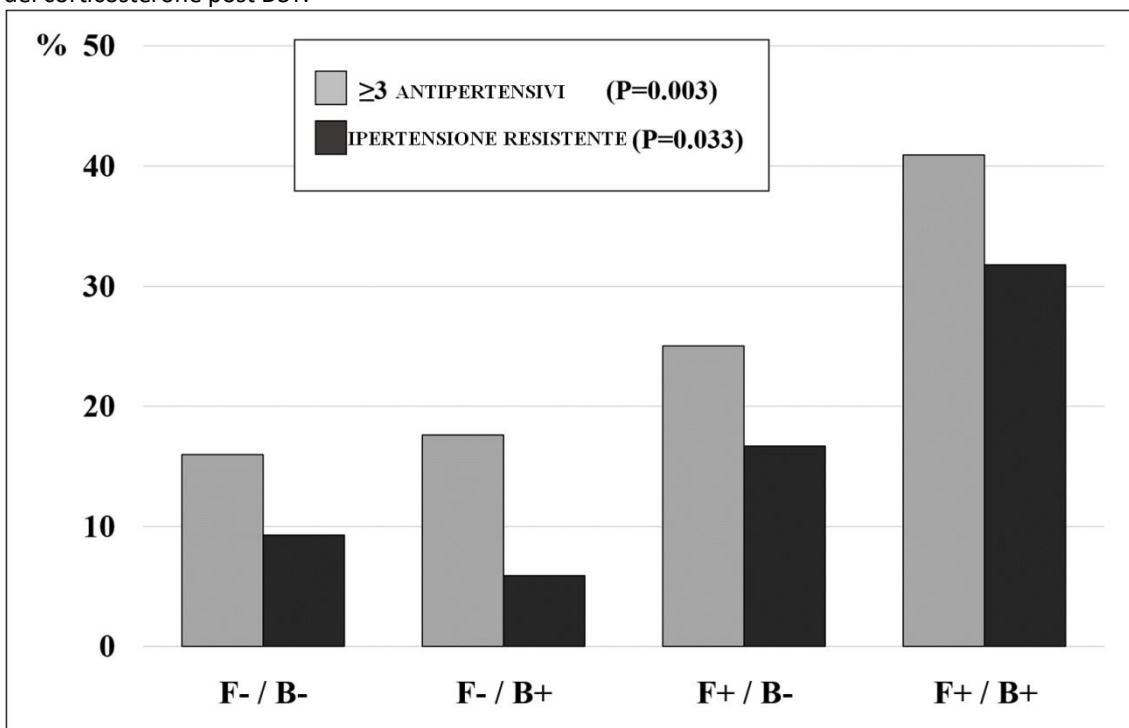


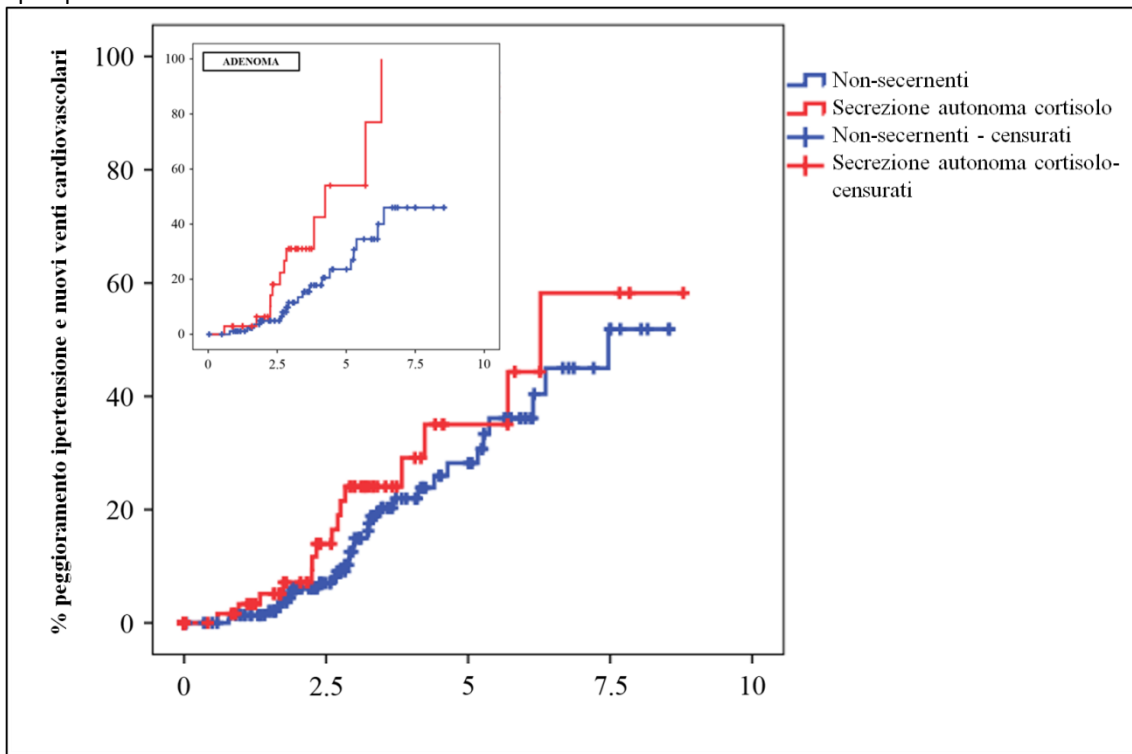
Figura 25. Confronto della prevalenza (%) di pazienti con tre o più farmaci antipertensivi o ipertensione resistente tra i pazienti con incidentaloma surrenalico divisi in categorie di soppressione del corticolo e del corticosterone post DST.



F-: normale soppressione del cortisolo. F+: mancata soppressione del corticolo.

B-: normale soppressione del corticosterone. B+: mancata soppressione del corticosterone.

Figura 26. Incidenza del peggioramento dell'ipertensione e nuovi eventi cardiovascolari durante il follow-up in pazienti con incidentaloma del surrene.



I soggetti sono stati divisi in NON-secrenti (linea BLU) e secrezione autonoma di cortisolo (linea ROSSA). La figura principale indica l'analisi del rischio su tutta la coorte in analisi: (51.9 vs. 58.2 %, $P=0.284$, rispettivamente). La figura secondaria indica l'analisi del rischio nei pazienti con adenoma unilaterale divisi in NON-secrenti (linea BLU) e secrezione autonoma di cortisolo (linea ROSSA): (46 vs. 100 %, $P=0.004$).

PROFILO STEROIDEO TISSUTALE: CONFRONTO TRA TESSUTO NORMALE E TESSUTO TUMORALE

Abbiamo quantificato 21 ormoni steroidei nel tessuto tumorale e tessuto surrenalico normale corrispondente proveniente da 13 pazienti sottoposti a chirurgia nel biennio 2018-2019. Data l'elevata variabilità delle condizioni pre operatorie (orario e durata dell'intervento, anestesia, caratteristiche antropometriche del paziente, terapie farmacologiche in atto, ecc.) un confronto dei livelli di steroidi tra diversi pazienti risulta metodologicamente errato [Prete A et al. 2018]. Tali risultati verranno quindi valutati caso per caso, limitandosi al confronto della variazione % della concentrazione di steroidi tra il tessuto normale ed il tessuto tumorale.

I casi analizzati sono elencati nella seguente tabella:

Caso	Sesso	Età	TEST DST	IPERTENSIONE	ISTOLOGICO
I	F	58	+	+	IPERPLASIA / ADENOMA
II	F	25	-	+	ADENOMA (Conn)
III	F	62		+	ADENOMA
IV	F	45	-	+	IPERPLASIA (Conn)
V	M	57	+	+	IPERPLASIA
VI	F	70	+	+	ADENOMA
VII	F	41	-	-	CISTI
VIII	M	60		+	MIELOLIPOMA
IX	M	61		+	NEOPLASIA+MIELOLIPOMA
X	F	64		-	CARCINOMA CORTICO-SURR
XI	M	33	-	-	CARCINOMA CORTICO-SURR
XII	F	25	-	-	METASTASI
XIII	M	66	+	-	METASTASI

Test DST: (+) indica valori di F post DST ≥ 50 nmol/L. (-) indica valori di F post DST < 50 nmol/L.

IPERTENSIONE: (+) indica valori di pressione $> 140/90$ mmHg o paziente con terapia farmacologica.

Cella vuota indica dato non disponibile.

Caso I

Femmina, 58 anni. Ipertensione arteriosa insorta a 36 anni.

Nel maggio 2016 individuate due masse del surrene sinistro, 25x20 e 11x10 mm durante TC addome per rottura spontanea della milza. Caratteristiche non tipiche per adenoma ad elevato contenuto lipidico. Nell'aprile 2017 interruzione dei farmaci antipertensivi per dosaggio aldo e renina. Dosaggio fallito per insorgenza di cardiopalmo. Esclusa la presenza di feocromocitoma. Ipertensione trattata mediante Telmisartan + idrocloratiuzide. Test DST 1 mg conferma la secrezione subclinica di glucocorticoidi: F post-DST 195 nmol/L. Sottoposta a chirurgia in marzo 2018. Diagnosi mediante istologico: adenoma cortico-surrenalico. Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 27.

Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi aumentati principalmente nella via glucocorticoide, con incremento % dei precursori, rispetto al tessuto normale, quali: P5 (+218 %), P4 (+500 %), 17-OHP5 (+192 %), 17-OHP4 (+443 %), 21S (+852 %). Il prodotto finale della via, F, era lievemente aumentato nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (+132 %). Anche i livelli del precursore mineralcorticoide B risultavano lievemente aumentati nel tessuto tumorale rispetto a quello normale (+68 %). La via biosintetica degli androgeni risultava più attiva nel tessuto tumorale: DHEA (+344 %), A4 (+385 %) rispetto al tessuto normale. Il prodotto finale della via, T, era notevolmente elevato nel tessuto tumorale rispetto a quello normale (+1222 %). Erano inoltre elevati i prodotti finali del metabolismo di F, 20 α -DHE (+97 %) e 20 β -DHE (+321 %) rispetto al tessuto normale. Infine risultava aumentato il metabolita del P4, il 16-OHP4 (+319 %) e l'intermedio della via back door della sintesi degli androgeni, l'11-OHA4 (+931 %).

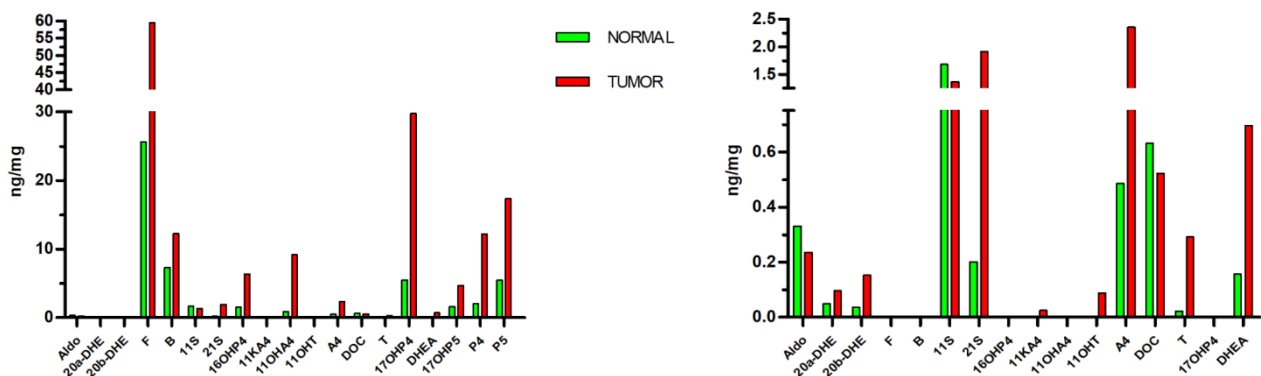


Figura 27: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso II

Femmina, 25 anni, ipertensione diastolica.

Catecolamine urinarie, eco doppler delle arterie renali, funzione tiroidea e metabolismo minerale nella norma. Test al Captopril positivo sebbene in concomitanza di ipokaliemia. Eccesso di aldosterone confermato. Nel 2016 riscontro di ovaio micropolicistico e iperinsulinemia: diagnosi di sindrome dell'ovaio policistico. Introdotta terapia estroprogestinica. Nel 2017 TC addome con riscontro di adenoma surrenalico destro 13x9 mm. Androgeni, ACTH e F nella norma.

Ipokaliemia. Insulinemia nella norma, DST test: F= 24.8 nmol/L. Sottoposta a chirurgia in marzo 2018. Diagnosi mediante istologico: adenoma cortico-surrenalico. Conclusione: Adenoma surrenalico destro associato a iperaldosteronismo primario.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 28.

Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi aumentati principalmente nella via mineralcorticoide, con incremento % dei precursori, rispetto al tessuto normale, quali: P4 (+107 %), DOC (+578 %) e B (+79 %). Il prodotto finale della via, aldosterone, risultava notevolmente elevato (+19036 %) nel tessuto tumorale. Anche la via glucocorticoide risultava più attiva nel tessuto tumorale: 11S (+299 %), 21S (+62 %) ed F (+63 %). Inoltre anche il metabolita finale di F, il 20β-DHE era elevato nel tessuto tumorale (+80 %) rispetto al tessuto normale. Infine risultava aumentato il metabolita del P4, il 16-OHP4 (+75 %) e l'intermedio della via back door della sintesi degli androgeni, l'11KA4 (+238 %).

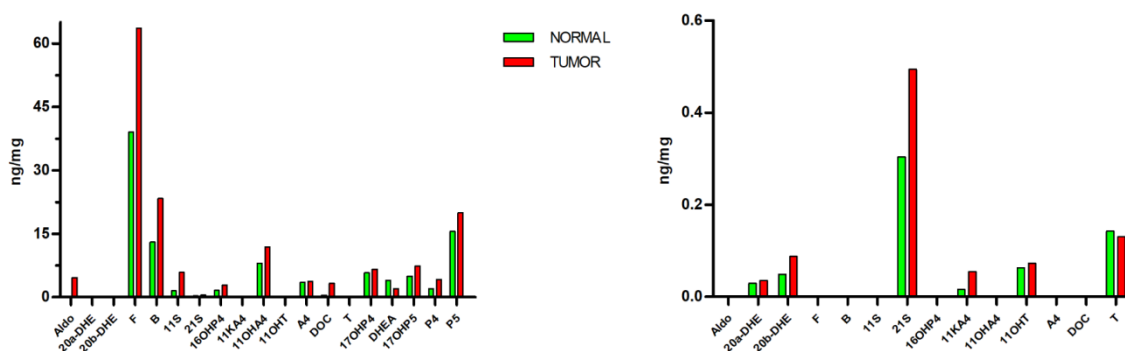


Figura 28: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso III

Femmina, 62 anni. Ipertensione arteriosa insorta a 15 anni. Habitus Cushingoide

Nel 2002 quadrantectomia sinistra per cancro alla mammella seguita da radioterapia, gozzo multinodulare eutiroideo a seguito. Nel 2007 primo riscontro ipokaliemia, da allora in terapia con KCL retard e Karenol senza beneficio. Nel 2011 diabete tipo II, in terapia insulino-sensibilizzante. Nel 2010 TC addome: surreni eumorfici. Nel 2012 escluso iperaldosteronismo primario mediante test Captopril (durante terapia con Karenol). Nel 2017 TC addome: quadro di iperplasia macronodulare bilaterale. Nel 2018 TC addome con mdc: surrene destro con formazione 18x10 mm con densità >10 HU con wash-out assoluto del 58 % e relativo del 46 % 15 minuti dopo mdc ev. PET-FDG negativa. PET-f-DOPA negativa. Sottoposta a chirurgia in novembre 2018. Diagnosi mediante istologico: adenoma cortico-surrenalico inclusi citoplasmatici tipo cd corpi di spironolattone. Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 29.

Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi aumentati nella via mineralcorticoide con incremento % del precursore DOC (+554 %) rispetto al tessuto normale. Il prodotto finale della via, l'aldo, era notevolmente aumentato nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (+5973 %). Al contrario i livelli di glucocorticoidi e precursori risultavano ridotti nel tessuto tumorale rispetto a quello normale: 17-OHP5 (-80 %), 17-OHP4 (-88 %), 21S (-78 %), F (-54 %). Inoltre il prodotto finale del metabolismo del cortisolo, 20 α -DHE, risultava ridotto (-55 %) rispetto al tessuto normale. Anche la via biosintetica degli androgeni risultava meno attiva nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale corrispondente: DHEA (-88 %), A4 (-63 %) e T (-72 %), mentre l'intermedio della via back-door 11-KA4 risultava aumentato (+71 %). Infine risultava ridotto il metabolita del P4, il 16-OHP4 (-78 %) nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale.

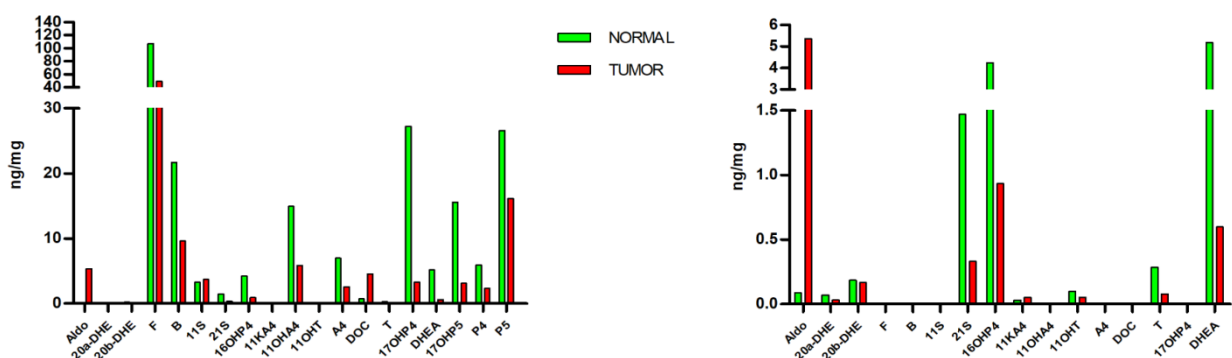


Figura 29: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore

Caso IV

Femmina, 45 anni. Familiarità per Ipertensione arteriosa.

Nel 2016 accesso al PS per crisi ipertensiva sintomatica per cefalea (PA 200/120 mmHg). Dosaggio di aldo e renina con rapporto suggestivo di iperaldosteronismo primario. Angio-TC arterie renali mostrava un iperplasia surrenalica macronodulare sinistra 10x15 mm. Catecolamine urinarie nella norma. Test DST 1 mg nella norma. Settembre 2017 inizio terapia antialdosteronica con Triatec. Test DST 1 mg negativo confermato (F post DST: 22.1 nmol/L). TC addome conferma noto quadro di iperplasia surrenalica sinistra. Sottoposta a chirurgia in giugno 2019. Diagnosi mediante istologico: iperplasia micro-macronodulare cortico-surrenalica.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 30.

Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi aumentati nella via mineralcorticoide, con lieve incremento % dei precursori, rispetto al tessuto normale, quali DOC (+96 %) e B (+142 %). Il prodotto finale della via, l'aldo, risultava invece ridotto nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (-92 %). Anche i livelli di steroidi glucocorticoidi risultavano aumentati nel tessuto tumorale rispetto a quello normale: 11S (+207 %), 21S (+73 %), F (+67 %). Inoltre il prodotto del metabolismo di F, 20 β -DHE risultava notevolmente aumentato nella lesione (+2052 %) rispetto al tessuto normale.

La via biosintetica degli androgeni risultava relativamente meno attiva nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale corrispondente: DHEA (+103 %) e T (-54 %), mentre l'intermedio della via back-door 11-KA4 risultava notevolmente ridotto (-99 %). Infine risultava aumentato il metabolita del P4, il 16-OHP4 (+64 %) nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale.

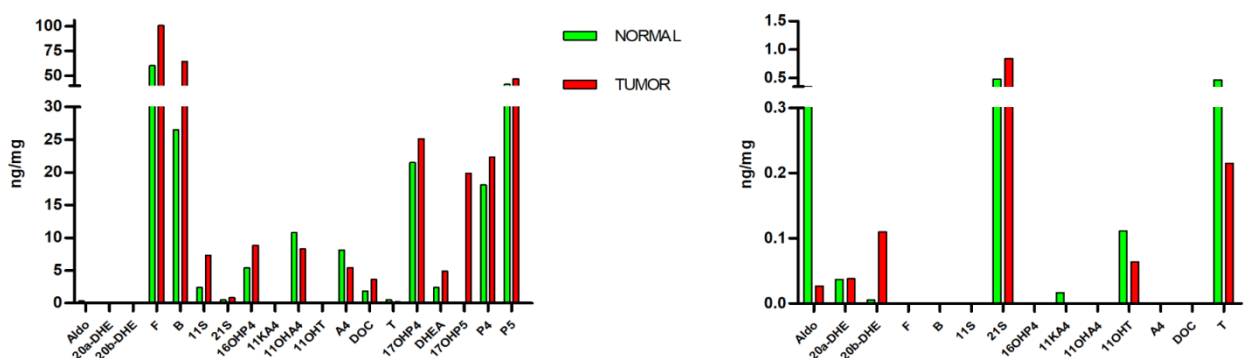


Figura 30: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore

Caso V

Maschio, 57 anni. Ipertensione arteriosa nota da circa 7 anni. Triplice terapia farmacologica.

Litiasi renale destra. Novembre 2018: ECO renale rivela calcolo al calice inferiore del rene destro.

Durante URO-TC riscontro incidentale di iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale. UFC

significativamente aumentato. Gennaio 2019: diagnosi di sindrome di Cushing. ACTH basale

soppresso con cortisolemia aumentata e F post-DST = 968 nmol/L. Aldo e renina ridotti come da

soppressione da eccesso di glucocorticoidi. Metanefrine urinarie nella norma. PET-FDG rivela

iperfissazione del tracciante a livello surrenalico bilateralmente senza altre captazioni patologiche.

Diagnosi mediante istologico: iperplasia macronodulare cortico-surrenalica con nodulo 4.5 cm compatibile con adenoma cortico-surrenalico.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 31. Il tessuto tumorale ha rivelato livelli di steroidi comparabili con quelli riscontrati nel tessuto normale.

Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi lievemente aumentati nella via mineralcorticoide, con incremento % dei precursori DOC (+69 %) e B (+76 %). Tuttavia, il prodotto finale della via, l'aldo, risultava invece ridotto nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (-77 %). Il P4, precursore comune a tutte le vie risultava aumentato nel tessuto tumorale (+133 %) rispetto al tessuto normale. Il prodotto finale del metabolismo di F, il 20 β -DHE, è risultato aumentato (+158 %), mentre il precursore degli androgeni, il DHEA risultava notevolmente ridotto (-99 %) nel tessuto tumorale rispetto a quello normale.

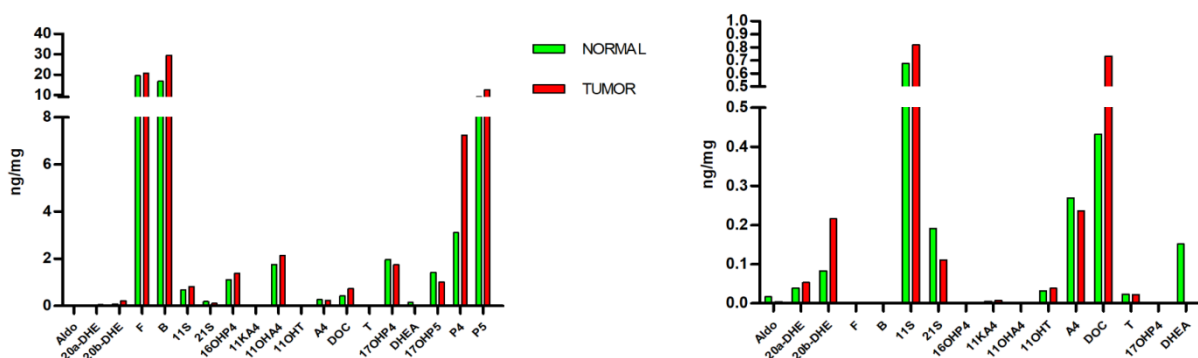


Figura 31: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso VI

Femmina, 70 anni. Ipertensione arteriosa

Dislipidemia e ateromasia carotidea con stenosi del 40 %. Osteopenia. Diverticolosi colica.

Nel 2016 tumore stromale gastrointestinale della grande curvatura. Durante la stadiazione TC riscontro di adenomi surrenalici bilaterali. Esclusa ipersecrezione di aldo. Catecolamine urinarie nella norma. Test DST 1 mg: F=148 nmol/L.

Nel 2017 RM ipofisi: nella norma. Micronodulo tiroideo sottoposto ad analisi citologica (Tir 2). Funzione della tiroide nella norma.

Rilettura delle indagini radiologiche ha mostrato la presenza di due masse al surrene sinistro di 27 e 32 mm ad elevato contenuto lipidico. Nel surrene di destra si conferma adenoma subcentrimetrico. Diagnosi mediante istologico: adenoma cortico-surrenalico.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 32.

L'analisi del tessuto tumorale ha rivelato la quasi totale assenza di attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -87 e -99 %. Al contrario il 20 α -DHE risultava aumentato nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (+298 %).

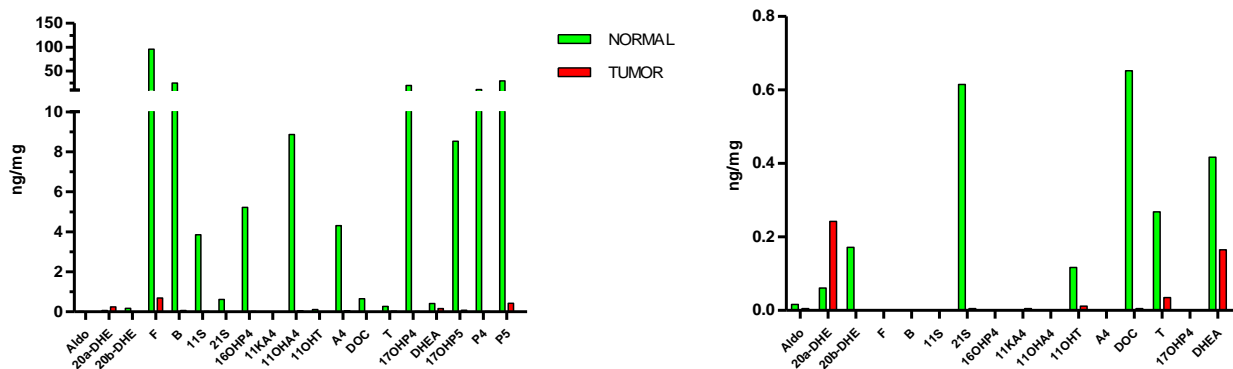


Figura 32: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

PROFILO STEROIDEO TISSUTALE: CONFRONTO TRA TESSUTO NORMALE E LESIONI DI TIPO NON TUMORALE.

Come controllo negativo abbiamo effettuato la quantificazione dei 21 steroidi surrenalici anche in quelle lesioni che successivamente alla diagnosi istologica sono state definite come cisti o mielolipomi. Essendo tali lesioni per definizione “non secernenti” vogliamo valutare se il contenuto steroideo rifletta tale caratteristica.

Caso VII

Femmina, 41 anni.

Diagnosi mediante istologico: lesione cistica surrenalica a contenuto necrotico-emorragico con aghi di colesterolo, parete spessa fibro-ialina. Quadro morfologico compatibile con pseudocisti surrenalica.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 33.

L'analisi del tessuto tumorale ha rivelato l'assenza di attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano notevolmente ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -72 e -97 %.

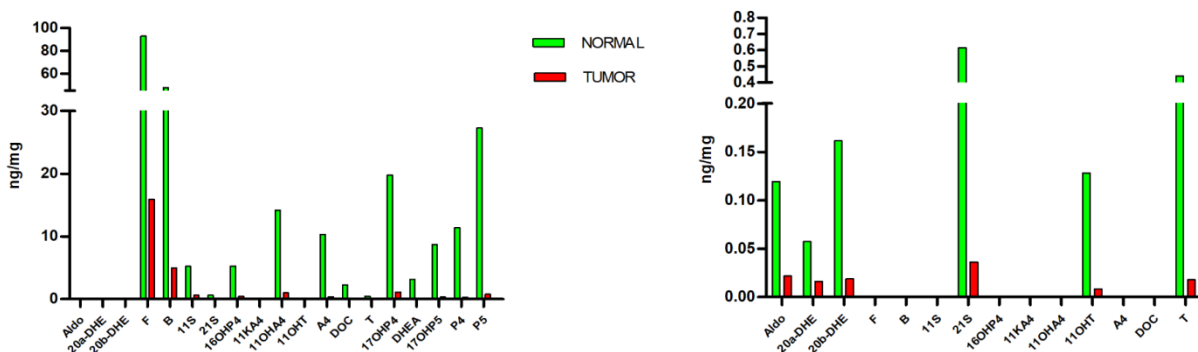


Figura 33: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso VIII

Maschio, 60 anni. Ipertensione arteriosa nota dal 2017. Dislipidemia nota da 10 anni associata a steatosi epatica.

Diagnosi mediante istologico: Mielolipoma

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 34.

L'analisi del tessuto tumorale ha rivelato l'assenza di attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -68 e -97 %.

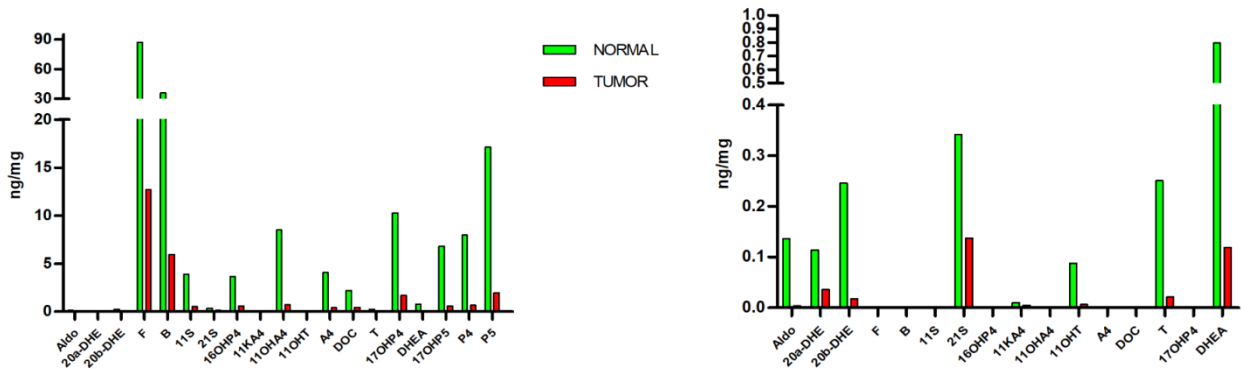


Figura 34: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

PROFILO STEROIDEO TISSUTALE: CONFRONTO TRA TESSUTO NORMALE E LESIONI DI TIPO NEOPLASTICO.

Per definire un'ulteriore livello di caratterizzazione, abbiamo effettuato la quantificazione dei 21 steroidi surrenalici anche in quelle lesioni che successivamente alla diagnosi istologica sono state definite di origine neoplastica.

Caso IX

Maschio, 61 anni. Cardiopatia ischemica cronica. Diabete tipo II. Ipertensione arteriosa sistemica. Nel 2018: angio-TC addome mette in evidenza formazione espansiva 36x24 mm a struttura disomogenea con comportamento dinamico prima e dopo mdc (*wash-out* assoluto 70 %). Surrene sinistro eumorfico. Due angiomi epatici. Aprile 2018: PET-F-DOPA non ha mostrato aree di accumulo patologiche. Diagnosi mediante istologico: neoplasia cortico-surrenalica a prevalente componente cellulare ossifila-oncocitica, compatibile con cd variante oncocitaria con aree emorragiche. Associato mielolipoma. Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale sono rappresentati nella figura 35. Il tessuto tumorale presentava livelli di steroidi notevolmente aumentati principalmente nella via glucocorticoide, con incremento % dei precursori, rispetto al tessuto normale, quali: P5 (+748 %), P4 (+1091 %), 17-OHP5 (+817 %), 17-OHP4 (+1549 %), 11S (+148 %), 21S (+8138 %). Il prodotto finale della via, F, risultava anche esso aumentato nel tessuto tumorale (+458 %). Inoltre anche i prodotti finali del metabolismo di F risultavano aumentati nel tessuto tumorale: 20 α -DHE (+428 %) e, in particolare, 20 β -DHE (+4908 %). Le vie biosintetiche degli androgeni risultavano più attive nel tessuto tumorale: DHEA (+420 %), A4 (+424 %), T (+317 %), 11-OHA4 (+774 %) e 11-OHT (+931 %). Infine il tessuto tumorale mostrava livelli più elevati del precursore mineralcorticoide B (+327 %) e del metabolita del P4, il 16-OHP4 (+1552 %).

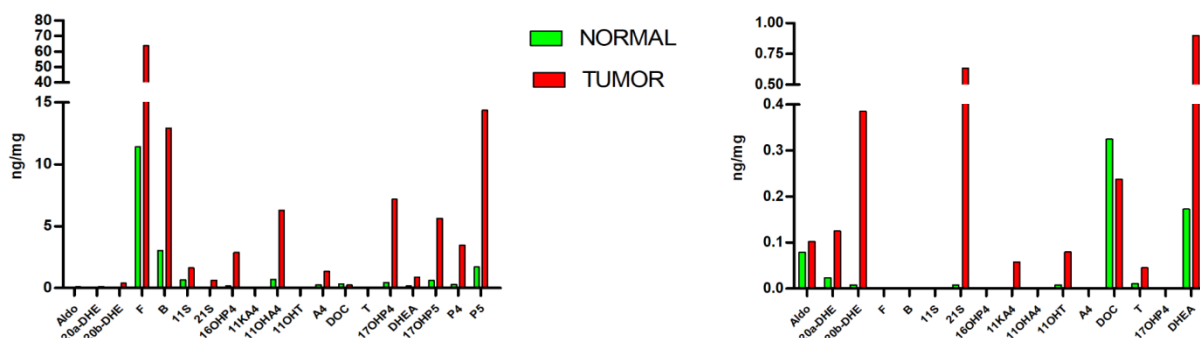


Figura 35: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso X

Femmina, 64 anni.

Diagnosi mediante istologico: neoplasia cortico-surrenalica a prevalente componente cellulare ossifila, associato ad aree emorragiche rimaneggiamenti trombotici, aspetti sclero-ialini e depositi calcifici. La neoplasia infiltra la capsula surrenalica ed il tessuto epatico. Quadro complessivo compatibile per carcinoma cortico-surrenalico di basso grado.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 36.

Il tessuto tumorale presentava livelli di alcuni steroidi glucocorticoidi e precursori aumentati: P5 (+815 %), P4 (+699 %), 17-OHP5 (+151 %) e 21S (+159 %), mentre altri risultavano ridotti rispetto al tessuto normale: 17-OHP4 (-64 %) e 11S (-50 %). Il prodotto finale della via, F, era presente in quantità comparabili tra tessuto tumorale e normale (18.7 vs 17.3 ng/mg, rispettivamente), mentre il metabolita finale di F, 20 β -DHE era più elevato nel tessuto tumorale (+121 %). Infine, i precursori della via mineralcorticoide erano elevati nel tessuto tumorale rispetto a quello normale: DOC (+323 %) e B (+368 %) mentre il prodotto finale della via, aldo, risultava ridotto nel tessuto tumorale (-98 %) rispetto a quello normale.

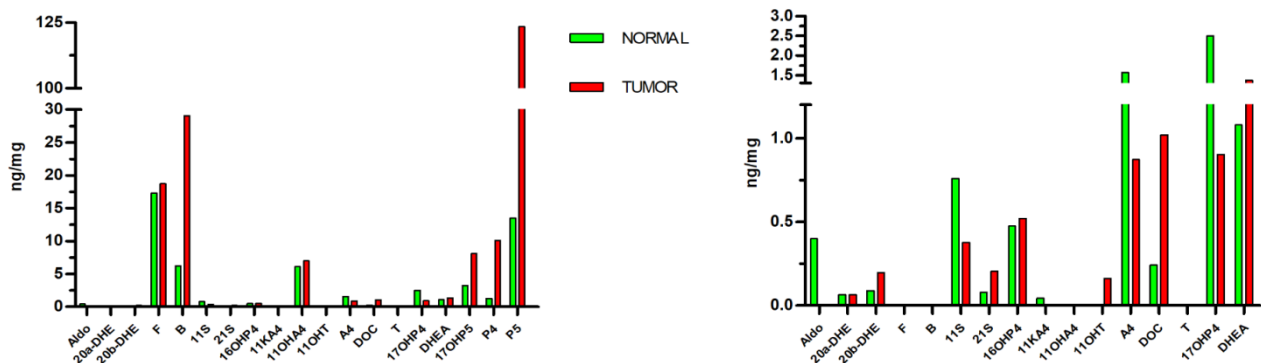


Figura 36: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso XI

Maschio, 64 anni.

Nel 2010 TC addome in seguito a trauma stradale evidenzia voluminosa massa surrene sinistro (10 cm). No ipertensione, no stigmati cushingoidi, escluso iperaldosteronismo primario. test-DST nella norma, androgeni nella norma. Catecolamine urinarie nella norma. Lieve aumento NSE, altri oncomarkers negativi. PET-FDG: massa ipercaptante con SUV max 32.9.

Diagnosi mediante istologico: neoplasia cortico-surrenalica a prevalente componente cellulare ossifila ed alterazione della trama reticolinica e necrosi. Quadro morfologico compatibile con carcinoma cortico-surrenalico.

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale sono rappresentati nella figura 37.

L'analisi del tessuto tumorale ha rivelato la marcata riduzione di attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -96 e -99%.

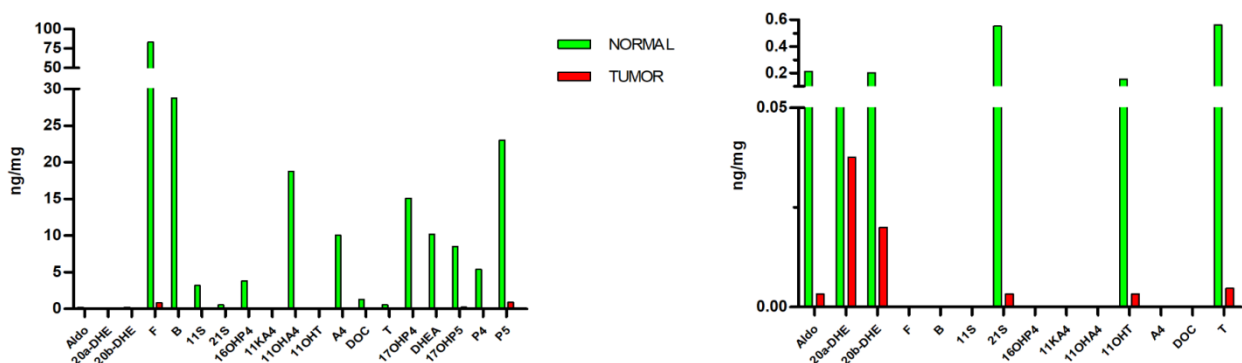


Figura 37: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso XII

Femmina, 25 anni.

2016: intervento per osteosarcoma seguito da chemioterapia. Successivi controlli regolari, nessuna evidenza di ripresa della malattia. In corso di TC torace di controllo individuata lesione surrenalica. La lesione viene rivalutata in agosto 2018. Successivo controllo a febbraio 2019 segnala un ulteriore ingrandimento (4 cm) della lesione surrenalica, ipercaptante al test PET-FDG.

No stigmate cushingoidi, no ipertensione. Eumenorrea senza segni clinici di iperandrogenismo. No edemi declivi, catecolamine urinarie nella norma. negativo il test di soppressione DST.

Diagnosi mediante istologico: neoplasia a piccole cellule rotonde infiltrante il surrene. presenza di invasione linfo-vascolare. Diagnosi differenziale tra sarcoma di Ewing e metastasi da osteosarcoma. Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 38.

L'analisi del tessuto tumorale ha rivelato la marcata riduzione di attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -60 e -99%.

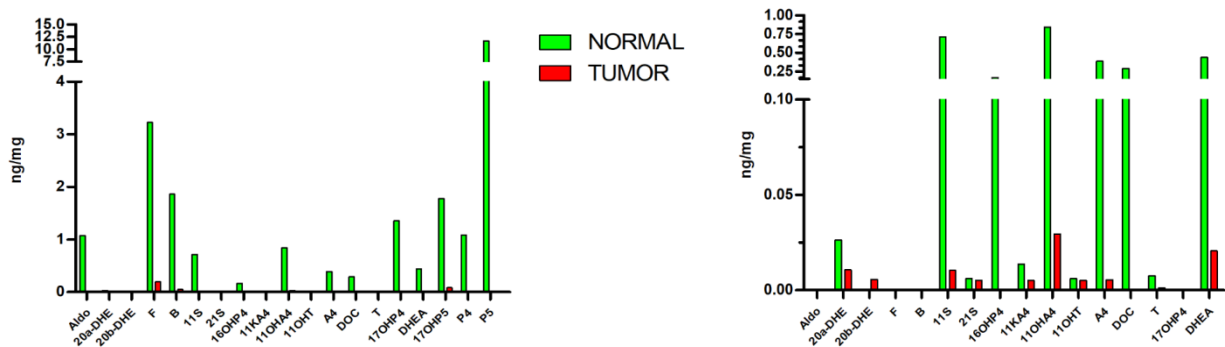


Figura 38: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. L'immagine di destra include lo stesso profilo, in cui sono stati eliminati i segnali più elevati per apprezzare le differenze tra gli analiti presenti a concentrazione notevolmente inferiore.

Caso XIII

Maschio, 66 anni.

Diagnosi mediante istologico: metastasi surrenalica da adenocarcinoma moderatamente differenziato. Quadro immunohistochimico depone, come prima ipotesi, per un'origine polmonare.

L'analisi del tessuto tumorale ha una marcata riduzione dell'attività steroidogenica rispetto al tessuto normale. Tutti gli steroidi analizzati erano ridotti nel tessuto tumorale con una differenza % compresa tra -67 e -96 %. Al contrario sia 20 α -DHE che 20 β -DHE risultavano aumentati nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (+75 e +384 %, rispettivamente).

Il confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale è illustrato in figura 39.

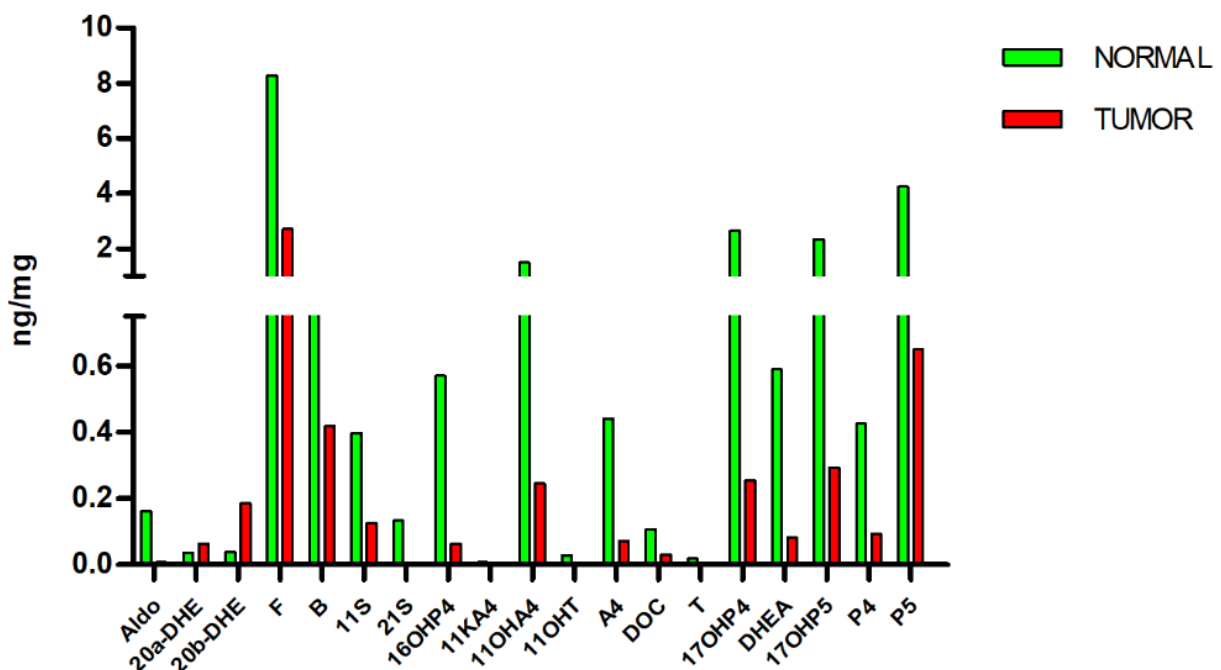


Figura 39: confronto dei livelli di steroidi rilevati nel tessuto tumorale e nel tessuto normale.

7-DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Con questo studio abbiamo fornito ulteriori evidenze rispetto all'ipotesi, che nei pazienti con incidentaloma surrenalico, sussista un profilo steroideo circolante caratteristico in relazione al sesso, allo status ormonale ed alla morfologia della lesione. Abbiamo inoltre fornito nuovi dati a supporto dell'utilità del dosaggio dell'11S, del DHEA e di B nei pazienti con lesioni ACS. In particolare, B è emerso come fattore contribuente all'aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti con incidentaloma surrenalico.

Dalla valutazione del profilo ormonale basale emerge un alto livello di eterogeneità del pattern secretorio degli incidentalomi surrenalici che raramente era stato descritto in precedenza. In generale, livelli aumentati di F ed 11S e valori ridotti di DHEA sono frequentemente riscontrati nei pazienti con ACS rispetto a quelli NS ed ai controlli, indipendentemente dal sesso e dalla morfologia del surrene.

La valutazione dell'11S è stata recentemente riconosciuta come ulteriore parametro di discriminazione dell'ipercortisolismo tra gli incidentalomi surrenalici. Ad esempio, i livelli circolanti di 11S in diversi sottotipi di sindrome di Cushing sono risultati aumentati proporzionalmente alla severità dell'ipercortisolismo [Eisenhofer G et al. 2018]. Inoltre, il dosaggio dell'11S aveva un valore predittivo della presenza della sindrome di Cushing superiore a tutti gli altri steroidi. Coerentemente con tali risultati, nella nostra coorte, l'aumento dei valori circolanti di 11S e F senza aumento dei valori di 17-OHP4 indica un iperattivazione di tutto il processo steroidogenetico e verosimilmente non indica alterazioni a carico del solo enzima 11 β -idrossilasi, come proposto dai primi studi sull'argomento [Dall'asta C et al. 2002]. Alcuni autori hanno riportato livelli ridotti di DHEA in maniera indipendente dall'età, nei pazienti con la sindrome di Cushing [Eisenhofer G et al. 2018; Di Dalmazi G. et al. 2015]. Sakai Y. e colleghi hanno proposto il deficit di stimolazione surrenalica dovuto alla soppressione dell'ACTH F-mediata o la ridotta attività 17,20-liasica dell'enzima CYP17A1, come possibili meccanismi causativi [Sakai Y. et al. 1994]. Tuttavia, anche se i livelli di DHEA sono stati associati all'ipercortisolismo già da molti anni, livelli ridotti di DHEA non sembrano avere un impatto clinico rilevante, fino ad oggi. Recentemente, Berr CM. e colleghi hanno proposto che bassi livelli di androgeni possano contribuire alla riduzione della massa muscolare, con conseguente sarcopenia e riduzione delle performance muscolari, nei pazienti Cushing [Berr CM et

al. 2017]. Alcuni studi [Delivanis DA et al. 2019; Di Dalmazi G. et al. 2018] hanno mostrato come anche pazienti con ACS possono presentare, al pari dei alcuni pazienti Cushing, alcune evidenze radiologiche di ridotta massa muscolare e alterato metabolismo degli aminoacidi, dando quindi supporto all'ipotesi che sarcopenia sub-clinica possa essere presente in tali pazienti. Si noti il fatto che i livelli di DHEA mostrano una riduzione progressiva nelle femmine ACS, NS e controlli sani, indipendentemente dall'età e dai livelli di ACTH, indicando che il profilo steroideo circolante di pazienti con normale soppressione di F post-DST è caratteristico del deficit di androgeni. La valutazione del profilo circolante steroideo dei pazienti con iperplasia ha mostrato esclusivamente un aumento dei livelli di F senza evidenziare ulteriori alterazioni ad eccezione di livelli ridotti di DHEA ed A4 nelle femmine. L'innalzamento dei valori circolanti di F, senza alcuna alterazione dei precursori risulta in accordo con l'ipotesi per cui l'ipercortisolismo nell'iperplasia surrenalica sarebbe causato dall'aumentata dimensione della ghiandola piuttosto che da alterazioni specifiche della steroidogenesi, come dimostrato per la iperplasia macronodulare causata da mutazione germinali del gene *ARMC5* [Faillot S et al., 2016]. Poiché nei pazienti con incidentaloma surrenalico non sono state, ad oggi, scoperte alterazioni genetiche che affliggono selettivamente la steroidogenesi risulta verosimile che possa sussistere un meccanismo epigenetico di regolazione della steroidogenesi negli adenomi ACS.

Il profilo steroideo circolante post-DST dei pazienti con incidentaloma surrenalico valutato in questo studio non era mai stato descritto prima d'ora. Dalla valutazione dei valori ormonali è emerso che, nei pazienti ACS, tre steroidi della *zona fasciculata* quali il F, l'11S e B risultano significativamente aumentati rispetto ai pazienti con lesioni NS. Considerando la regolazione a feedback negativo che sussiste tra corticosterone ed ACTH, trovare livelli aumentati di tale ormone in concomitanza di un ACTH soppresso farmacologicamente, rafforza l'ipotesi della secrezione autonoma di B da parte delle lesioni surrenaliche.

Inoltre, i pazienti con ACS hanno mostrato elevata variabilità nel livello di soppressione di B. Poiché non esistono dati di riferimento per la definizione dell'assenza di soppressione di F, dell'11S e di B misurati mediante LC-MS/MS, abbiamo prima diviso in gruppo in terzili della soppressione e dopo abbiamo utilizzato la curva ROC per calcolare il miglior *cut-off* diagnostico. Coerentemente con la nostra ipotesi, la mancanza di soppressione di F e di B, è associata proporzionalmente all'aumento della prevalenza del peggioramento del controllo pressorio, mentre non sono emerse associazioni tra la mancata soppressione di 11S e le alterazioni cardiovascolari. L'aumento della prevalenza di

pazienti con ipertensione resistente tra i terzi di B risulta in accordo con il ruolo di tale ormone nel controllo della pressione arteriosa in aggiunta a F.

Purtroppo, il ruolo di B nella patologia umana è ancora molto misconosciuto. I primi studi hanno stabilito che il recettore MR mostra affinità simile sia per B che per F, inoltre è noto che il recettore MR è circa 10 volte più espresso rispetto al recettore GR [Arriza JL. et al., 1987]. Risulta verosimile quindi che un aumento del livello circolante di B, prodotto dalla lesione surrenalica, possa contribuire al peggioramento del controllo pressorio attraverso l'attivazione periferica del recettore MR.

Le differenze nel profilo steroideo dei pazienti con adenoma ed iperplasia è risultato associato con la notevole differenza nell'*outcome* clinico. Durante il follow-up medio di 3.3 anni abbiamo registrato una maggiore incidenza del peggioramento del controllo pressorio e degli eventi cardiovascolari nei pazienti con adenoma ACS, mentre non è stata registrata nessuna differenza tra i pazienti con iperplasia ACS, rispetto ai NS. Tali risultati sono in accordo con lavori precedenti che mostravano una minore frequenza di complicazioni associate all'ipercortisolismo in pazienti con iperplasia macronodulare rispetto a quelli con adenoma nonostante l'elevata prevalenza di ACS, che viene confermata da questo studio (28% ACS tra gli adenomi vs. 39% tra le iperplasie). Inoltre, a supporto della relazione tra i livelli di B e l'ipertensione, dalla valutazione dei dati di *follow-up* è emerso che il B basale ed F post-DST sono i maggiori predittori del peggioramento del controllo pressorio e degli eventi cardiovascolari in maniera indipendente dal BMI, che tuttavia esercita un effetto significativo. Risulta verosimile quindi, che la valutazione di B basale potrebbe essere utile per l'individuazione dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare, che potrebbero mostrare un peggioramento dell'ipertensione durante il *follow-up* tra i pazienti con adenoma ed ACS.

La principale limitazione di tale studio consiste nella definizione dell'iperplasia esclusivamente mediante la valutazione dell'imaging. Nessun paziente con iperplasia è stato trattato chirurgicamente. Anche la natura retrospettiva dello studio rappresenta una possibile limitazione alla generalizzazione di tali risultati. Inoltre, a causa della indisponibilità del dosaggio del desametasone circolante, non abbiamo potuto confermare l'accuratezza diagnostica del test di soppressione. Infine, l'inclusione di pazienti con un tempo minimo di follow-up di 6 mesi potrebbe aver sottostimato il rischio cardiovascolare analizzato. Tuttavia il tempo medio di follow-up di 39 mesi risulta ampiamente sufficiente per fornire una valutazione accurata del rischio cardiovascolare in tali pazienti.

Tale studio viene avvalorato dalla definizione del profilo steroideo circolante post DST, effettuato mediante la tecnica gold-standard della LC-MS/MS, che non è mai stato descritto prima.

Obiettivo secondario di tale studio è stato quello di quantificare 21 ormoni steroidei nel tessuto tumorale e nel surrene sano corrispondente proveniente da pazienti sottoposti a chirurgia.

Sebbene siano state effettuate numerose indagini molecolari al fine di spiegare in parte la disregolazione della secrezione ormonale in pazienti con incidentaloma surrenalico, al meglio della nostra conoscenza, lo studio mediante LC-MS/MS, di un così ampio profilo steroideo intra-lesione, in tali pazienti, non era mai stato effettuato prima d'ora.

Data l'elevata variabilità delle condizioni pre-operatorie (orario e durata dell'intervento, anestesia, caratteristiche antropometriche del paziente, terapie farmacologiche in atto, ecc.) un confronto dei livelli di steroidi tra diversi pazienti risulta metodologicamente errato [Prete A et al. 2018]. Abbiamo quindi valutato il profilo steroideo in quattro casi di adenoma e due casi di iperplasia, confermati mediante analisi istologica.

Due pazienti (caso II e IV) sono stati descritti come morbo di Conn.

Il caso II veniva correttamente descritto anche dalla valutazione del profilo steroideo intra-lesione: la lesione mostrava elevata attività mineralcorticoide, sia dei precursori P4, DOC e B che dell'aldo risultato notevolmente aumentato nella lesione rispetto al tessuto sano, mentre la via glucocorticoide era solo lievemente più attiva nella lesione.

Il caso IV mostrava invece un aldo ridotto nella lesione in presenza dei precursori DOC e B elevati rispetto al tessuto sano. Tale profilo risulta coerente con l'assunzione di un ACE inibitore (Triatec) da parte del paziente.

Al pari del caso II, la via glucocorticoide era solo lievemente più attiva nella lesione. Tuttavia in tale paziente abbiamo osservato un notevole aumento del metabolismo di F, suggerito dal notevole aumento di 20β -DHE nel tessuto tumorale.

Entrambi i casi mostravano un aumento di pari entità del metabolita di P4, 16OHP4 (+75 e + 64%, rispettivamente). Il caso IV mostrava anche una lieve elevazione del DHEA con ridotte concentrazioni di T e 11-KA4. Tale caratteristica non è presente nel caso II che al contrario presenta valori elevati di 11-KA4. Tale differenza potrebbe essere giustificata dalla terapia estroprogestinica in atto per il trattamento della PCOS nel caso II.

Il caso I presentava un quadro istologico indistinguibile tra "iperplasia macronodulare vs. neoplasia cortico-surrenalica associata a metaplasia mielolipoma e rimaneggiamenti trombotico-emorragici

con aspetti di iperplasia endoteliale tipo Masson ed aree fibroticocifiche". Il profilo steroideo tissutale risultava compatibile con la mancanza di soppressione al DST test. Il tessuto tumorale presentava infatti livelli notevolmente elevati dei precursori glucocorticoidi P5, P4, 17-OHP4, 17-OHP5 e 21S rispetto al tessuto sano. Il prodotto finale della via, F era lievemente aumentato così come i suoi metaboliti finali 20 α -DHE e 20 β -DHE. Le attività biosintetiche mineralcorticoidi erano simili tra lesione e surrene sano coerentemente con la terapia antialdosteronica in atto. Da notare la notevole attività biosintetica degli androgeni: risultano elevati sia DHEA che A4 con un livello di T notevolmente più elevato nella lesione rispetto al surrene sano (+1222 %). Inoltre anche l'intermedio "back door" 11-OHA4 era notevolmente elevato (+931 %).

Il caso III è stato definito "adenoma cortico-surrenalico inclusi citoplasmatici tipo cd corpi di Spironolattone". Dall'analisi del profilo steroideo tissutale si evidenzia un notevole aumento del tono mineralcorticoide della lesione rispetto al surrene sano: DOC (+554 %) e Aldo (+5973 %). Tale caratteristica appare coerente con la presenza della terapia antialdosteronica, senza beneficio, in atto (KCL retard e Karenol). Tutti gli altri steroidi, ad eccezione del 11-KA4, risultavano ridotti nella lesione, con riduzione compresa tra -55 e -88 %, rispetto al surrene sano.

Il caso V "Iperplasia macronodulare cortico surrenalica con nodulo (4.5 cm) compatibile con adenoma cortico-surrenalico" mostrava un profilo steroideo tissutale alquanto simile tra lesione e surrene sano. Tuttavia, il profilo risultava coerente con la soppressione dei livelli di aldo da eccesso di glucocorticoidi, confermato dall'aumento del metabolita di F, 20 β -DHE.

Nonostante la diagnosi di sindrome Cushing ricevuta nel 2019, i livelli di F risultavano comparabili tra la lesione ed il surrene sano. Infine, coerentemente con quanto frequentemente riportato per il profilo sierico, il DHEA era notevolmente ridotto nella lesione (-99 %) rispetto al surrene sano.

Il caso VI presentava adenomi bilaterali con mancata soppressione al test DST. Dopo la chirurgia del surrene sinistro veniva riscontrato un nodulo di 4 cm. Surrene destro presentava un adenoma subcentimetrico.

Tuttavia, l'analisi del profilo steroideo tissutale, era tuttavia suggestiva di una quasi totale assenza di attività steroidogenica intra-lesione: nella lesione infatti tutti gli steroidi erano ridotti (tra -60 e -99 %) rispetto al surrene sano. Solo il metabolita finale di F, il 20 α -DH era notevolmente aumentato nella lesione.

I casi VII ed VIII sono stati analizzati per valutare l'efficacia del profiling steroideo tissutale nel confermare la natura "inattiva" delle lesioni di tipo cistico e mielolipomatose. In tali lesioni abbiamo

osservato l'assenza di attività biosintetica significativa. tutti gli steroidi in analisi erano ridotti tra il 68 ed il 97 % nella lesione rispetto al surrene sano, confermando ulteriormente la mancanza di potenziale secretorio di tali lesioni e l'efficacia del profiling tissutale nella caratterizzazione di tali lesioni.

I casi IX - XIII rappresentano lesioni di tipo neoplastico o metastasi.

Il caso IX in particolare è risultato una neoplasia cortico surrenalica borderline con potenziale maligno incerto. Dall'analisi del profilo steroideo della lesione si è potuto evidenziare un'attività steroidogenica notevolmente aumentata confermando la necessità di rimozione chirurgica di tale lesione. Tutti gli steroidi risultavano notevolmente aumentati nella lesione. In particolare, P4, 17-OHP4, 16-OHP4, 21S e 20 β -DHE sono risultati notevolmente elevati nella lesione, con aumenti relativi compresi tra +1091 e +8138 %, rispetto al surrene sano.

Il caso X era un carcinoma cortico-surrenalico di basso grado con infiltrazioni epatiche. Dall'analisi del tessuto tumorale è emerso un quadro alquanto eterogeneo, con alcuni steroidi elevati nel tessuto tumorale, quali i precursori P5, P4, 17-OHP5, DOC, B, 21S e 20 β -DHE ed altri ridotti: 17-OHP4, 11S, Aldo e 11KA4.

Anche il caso XI era un carcinoma cortico-surrenalico (>10 cm, ipercaptante) ma in tal caso e la presenza di necrosi tissutale giustifica il ritrovamento di livelli di steroidi notevolmente ridotti, con riduzioni relative comprese tra -90 e -99 % nel tumore rispetto al surrene sano. Tale profilo è coerente con la negatività al test DST, assenza di ipertensione e di stigmate Cushingoidi.

Infine i casi XII e XIII sono state definite masse di origine metastatica. Entrambe risultano in una severa riduzione dei livelli di steroidi nel tessuto tumorale rispetto al surrene sano. Tuttavia nel caso XII non abbiamo riscontrato alcun fenotipo caratteristico: no stigmate Cushingoidi, no ipertensione, eumenorrea, nessun segno clinico di iperandrogenismo, test DST negativo. Anche il caso XIII presentava livelli ridotti di tutti gli steroidi ma risultava non sopprimente al test DST con androgeni ridotti e diagnosi di sindrome di Cushing. Come indizio di ipercortisolismo, abbiamo riscontrato un aumento del metabolismo di F (20 β -DHE +384 %) nel profilo steroideo del tessuto tumorale di tale paziente, rispetto al surrene sano.

Dallo studio della steroidogenesi tissutale fornita da tale studio si evidenzia il potenziale valore informativo di alcuni steroidi, come i metaboliti finali di F, 20 α -DHE e 20 β -DHE, che sono quantificabili mediante LC/MS /MS anche in circolo, su cui non sono disponibili dati in relazione agli stati di ipercortisolismo. Sia 20 α -DHE e 20 β -DHE presentavano livelli diversi tra la lesione surrenalica

ed il surrene sano in tutti i casi da noi analizzati, indipendentemente dal tipo di lesione. La valutazione del metabolismo finale di F intra-surrene, mediante il dosaggio sierico di 20 α -DHE e 20 β -DHE, potrebbe quindi rivelarsi altamente informativa nella caratterizzazione degli stati di ipercortisolismo. In oltre, anche il 16-OHP4 è stato trovato alterato in 11/13 casi analizzati. Essendo anche tale steroide quantificabile in circolo, esso potrebbe fornire nuovi *insight* nella caratterizzazione delle masse del surrene.

Il pattern biosintetico degli androgeni C19 11-ossidati si è rivelato invece più eterogeneo, seppur suggestivo del loro potenziale valore informativo. Abbiamo riscontrato variazioni dei livelli di 11-OHA4, 11-KA4 e 11-OHT, tra la lesione ed il surrene sano, in >50 % dei casi analizzati. Tali androgeni 11-ossidati sono oggi all'attenzione di molti gruppi di ricerca, soprattutto nell'ambito clinico dell'iperandrogenismo femminile, in quanto già disponibili alcuni metodi analitici LC-MS/MS per la loro quantificazione in siero e saliva. Non ci sono tuttavia dati in pazienti con incidentaloma surrenalico, benché uno degli enzimi principali della loro biosintesi sia proprio CYP11B1, lo stesso enzima che converte 11S in F.

In conclusione, alla luce dei risultati di tale studio, possiamo affermare che le masse incidentali del surrene costituiscono un gruppo eterogeneo di tumori, caratterizzati da differenti profili steroidei circolanti e tissutali, a seconda dello stato funzionale della lesione e della morfologia del surrene, definiti attraverso l'utilizzo del livello di soppressione dei livelli di F post-DST e mediante la valutazione radiologica, rispettivamente.

L'analisi di un ampio pannello di steroidi, alcuni dei quali valutati per la prima volta da questo studio, si è rivelata utile per l'individuazione, tra i pazienti con lesioni di tipo secernente, di quelli a più alto rischio di sviluppare complicazioni di tipo cardiovascolare. Tale risultato pone un'ulteriore evidenza verso la risoluzione di uno dei quesiti clinici più importati posti da tali pazienti. I pazienti con adenoma surrenalico ed elevati valori di F e B possono essere definiti come un gruppo ad aumentato rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari a lungo termine e quindi come il gruppo di pazienti che potrebbe ottenere un importante vantaggio clinico dalla rimozione chirurgica del surrene interessato dalla lesione. Inoltre, poiché non sembrano esserci implicazioni cliniche associate ad un innalzamento dell'11S circolante, anche il trattamento farmacologico con inibitori di CYP11B1, in determinate categorie di pazienti, potrebbe costituire una valida alternativa.

Lo studio della steroidogenesi tissutale in pazienti con masse del surrene, sebbene effettuato su soli dodici casi dalla natura eterogenea, è stata descritto da questo elaborato per la prima volta. I risultati

di questo lavoro stabiliscono che lo studio del processo steroidogenetico surrenalico risulta effettivamente alla portata delle tecnologie analitiche attualmente disponibili. Ad eccezione di 11-OHP4 e 11-KT, che non sono risultati quantificabili in nessun campione, tutti gli altri steroidi sono presenti nel surrene in quantità compatibili con i moderni spettrometri di massa. Inoltre, anche alla luce della natura esplorativa di tale studio, possiamo affermare che l'utilizzo delle tecnologie ad alta risoluzione, (MS-HR) in accoppiamento ad analisi dei dati *AI-assisted* (basate su intelligenza artificiale) permetteranno in futuro, lo studio comprensivo della steroidogenesi surrenalica in modalità *untargeted*, consentendo di svelare numerosi "attori" e meccanismi ancora misconosciuti. Tuttavia, essendo la biopsia surrenalica non inclusa nell'attuale pratica clinica, le possibili applicazioni di tale *profiling* rimangono collocate allo studio della fisiopatologia della lesione post-chirurgia.

BIBLIOGRAFIA

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010; 33(suppl 1): S62–S69.

Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; 237: 268–75.

Arruda M, Mello Ribeiro Cavalari E, Pessoa de Paula M, Fernandes Cordeiro de Morais F, Furtado Bilro G, Alves Coelho MC, de Oliveira E Silva de Morais NA, Choeri D, Moraes A, Vieira Neto L. The presence of nonfunctioning adrenal incidentalomas increases arterial hypertension frequency and severity, and is associated with cortisol levels after dexamethasone suppression test. *J Hum Hypertens*. 2017 Dec;32(1):3-11.

Auchus RJ. Non-traditional metabolic pathways of adrenal steroids. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009 Mar;10(1):27-32

Axelrod LR, Kraemer DC, Burdett J Jr, Goldzieher JW. Biosynthesis of 11 -hydroxyandrostenedione by human and baboon adrenals. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1973 Mar;72(3):545-50.

Berr CM, Stieg MR, Deutschbein T, Quinkler M, Schmidmaier R, Osswald A, Reisch N, Ritzel K, Dimopoulou C, Fazel J, Hahner S, Stalla GK, Beuschlein F, Reincke M. Persistence of myopathy in Cushing's syndrome: evaluation of the German Cushing's Registry. *Eur J Endocrinol*. 2017 Jun;176(6):737-746.

Bovio S, Cataldi A, Reimondo G, Sperone P, Novello S, Berruti A, Borasio P, Fava C, Dogliotti L, Scagliotti GV, Angeli A, Terzolo M. Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series. *J Endocrinol Invest*. 2006 Apr; 29(4):298-302.

Briassoulis G, Damjanovic S, Xekouki P, Lefebvre H, Stratakis CA. The glucocorticoid receptor and its expression in the anterior pituitary and the adrenal cortex: a source of variation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function; implications for pituitary and adrenal tumors. *Endocr Pract*. 2011 Nov-Dec;17(6):941-8.

Ceccato F, Antonelli G, Frigo AC, Regazzo D, Plebani M, Boscaro M, Scaroni C. First-line screening tests for Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: the role of urinary free cortisol measured by LC-MS/MS. *J Endocrinol Invest*. 2017 Jul;40(7):753-760

Ceccato F, Barbot M, Albiger N, Antonelli G, Zilio M, Todeschini M, Regazzo D, Plebani M, Lacognata C, Iacobone M, Mantero F, Boscaro M, Scaroni C. Daily salivary cortisol and cortisone rhythm in patients with adrenal incidentaloma. *Endocrine*. 2018 Mar;59(3):510-519.

Ceccato F, Zilio M, Barbot M, Albiger N, Antonelli G, Plebani M, Watutantrige-Fernando S, Sabbadin C, Boscaro M, Scaroni C. Metyrapone treatment in Cushing's syndrome: a real-life study. *Endocrine*. 2018 Dec;62(3):701-711.

Dall'Asta C, Barbetta L, Libé R, Passini E, Ambrosi B. Coexistence of 21-hydroxylase and 11 beta-hydroxylase deficiency in adrenal incidentalomas and in subclinical Cushing's syndrome. *Horm Res*. 2002;57(5-6):192-6.

Daniel E, Aylwin S, Mustafa O, Ball S, Munir A, Boelaert K, Chortis V, Cuthbertson DJ, Daousi C, Rajeev SP, Davis J, Cheer K, Drake W, Gunganah K, Grossman A, Gurnell M, Powlson AS, Karavitaki N, Hugué I, Kearney T, Mohit K, Meeran K, Hill N, Rees A, Lansdown AJ, Trainer PJ, Minder AE, Newell-Price J. Effectiveness of Metyrapone in Treating Cushing's Syndrome: A Retrospective Multicenter Study in 195 Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Nov;100(11):4146-54.

Delivanis DA, Iñiguez-Ariza NM, Zeb MH, Moynagh MR, Takahashi N, McKenzie TJ, Thomas MA, Gogos C, Young WF, Bancos I, Kyriazopoulou V. Impact of hypercortisolism on skeletal muscle mass and adipose tissue mass in patients with adrenal adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018 Feb;88(2):209-216.

Di Dalmazi G, Fanelli F, Mezzullo M, Casadio E, Rinaldi E, Garelli S, Giampalma E, Mosconi C, Golfieri R, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Steroid Profiling by LC-MS/MS in Nonsecreting and Subclinical Cortisol-Secreting Adrenocortical Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Sep;100(9):3529-38.

Di Dalmazi G, Fanelli F, Zavatta G, Ricci Bitti S, Mezzullo M, Repaci A, Pelusi C, Gambineri A, Altieri P, Mosconi C, Balacchi C, Golfieri R, Cosentino ER, Borghi C, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. The Steroid Profile of Adrenal Incidentalomas: Subtyping Subjects With High Cardiovascular Risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Nov 1;104(11):5519-5528.

Di Dalmazi G, Vicennati V, Garelli S, Casadio E, Rinaldi E, Giampalma E, Mosconi C, Golfieri R, Paccapelo A, Pagotto U, Pasquali R. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing's syndrome: a 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 May; 2(5):396-405.

Di Dalmazi G. Adrenal Incidentaloma: Picking out the High-Risk Patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019 Feb;127(2-03):178-184.

Faillot S, Assie G. ENDOCRINE TUMOURS: The genomics of adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2016; 174: R249–65.

Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, Cuomo G, De lasio R, Baccini M, Casadio E, Casetta B, Vicennati V, Gambineri A, Grossi G, Pasquali R, Pagotto U. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults.

Fanelli F, Di Dalmazi G. Serum steroid profiling by mass spectrometry in adrenocortical tumors: diagnostic implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2019 Jun;26(3):160-165

Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagarakis S, Dekkers OM. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2016 Aug; 175(2):G1-G34

Fenn JB. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1993 Jul;4(7):524-35.

Francis S. Greenspan, Stewler Gordon J. *Endocrinologia generale e clinica.* ISBN: 8829915653

Gummow BM, Scheys JO, Cancelli VR, Hammer GD. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):2711-23.

Janoski AH, Roginsky MS, Christy NP, Kelly WG. On the metabolism of 16-alpha-hydroxy-C21-steroids. 3. Evidence for high rates of production of 16-alpha-hydroxyprogesterone and 16-alpha-hydroxypregnenolone in the salt-losing form of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1969 Oct;29(10):1301-9.

Martin LJ, Tremblay JJ. Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NR4A1. *J Mol Endocrinol.* 2008 Sep;41(3):165-75.

Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011 Feb;32(1):81-151.

Monaghan PJ, Keevil BG, Trainer PJ. The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013 Jun;14(2):143-57.

Morelli V, Palmieri S, Lania A, Tresoldi A, Corbetta S, Cairolì E, Eller-Vainicher C, Arosio M, Copetti M, Grossi E, Chiodini I. Cardiovascular events in patients with mild autonomous cortisol secretion: analysis with artificial neural networks. *Eur J Endocrinol.* 2017 Jul;177(1):73-83.

Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 2010; 75: 1-12.

Nieman LK, Biller BM, Fidlìng JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, Tabarin A. Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug 1;8(3):2807-2831.

O'Reilly MW, Kempegowda P, Jenkinson C, Taylor AE, Quanson JL, Storbeck KH, Arlt W. 11-Oxygenated C19 Steroids Are the Predominant Androgens in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Mar 1;102(3):840-848.

Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., de Kloet, E.R., Dijk, D.J., Lightman, S., Vgontzas, A., Van Cauter, E., 2017. The functional and clinical significance of the 24-hour rhythm of circulating glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 38, 3–45.

Owen LJ, Halsall DJ, Keevil BG. Cortisol measurement in patients receiving metyrapone therapy. *Ann Clin Biochem.* 2010 Nov;47(Pt 6):573-5.

Prete A, Yan Q, Al-Tarrah K, Akturk HK, Prokop LJ, Alahdab F, Foster MA, Lord JM, Karavitaki N, Wass JA, Murad MH, Arlt W, Bancos I. The cortisol stress response induced by surgery: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2018 Nov;89(5):554-567.

Pretorius E, Africander DJ, Vlok M, Perkins MS, Quanson J, Storbeck KH. 11-Ketotestosterone and 11-Ketodihydrotestosterone in Castration Resistant Prostate Cancer: Potent Androgens Which Can No Longer Be Ignored. *PLoS One.* 2016 Jul 21;11(7):e0159867.

Ramayya MS, Zhou J, Kino T, Segars JH, Bondy CA, Chrousos GP. Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1799-806.

Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, Sasano H, Rainey WE. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein 19-carbon steroids before and after ACTH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Mar;98(3):1182-8.

Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1552-1561.

Rosenfeld MG; Lunyak VV and Glass CK. Sensor & Signal: a coactivator/repressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes development* 2006; 20: 1405-1428.

Russell G, Lightman S. The human stress response. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Sep;15(9):525-534.

Sakai Y, Yanase T, Hara T, Takayanagi R, Haji M, Nawata H. Mechanism of abnormal production of adrenal androgens in patients with adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 36–40.

Schneller J, Reiser M, Beuschlein F, Osswald A, Pallauf A, Riester A, Tietze JK, Reincke M, Degenhart C. Linear and volumetric evaluation of the adrenal gland--MDCT-based measurements of the adrenals. *Acad Radiol.* 2014 Nov;21(11):1465-74.

Severinova E, Alikunju S, Deng W, Dhawan P, Sayed N, Sayed D. Glucocorticoid Receptor-Binding and Transcriptome Signature in Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc.* 2019 Mar 19;8(6):e011484.

Spiga F, Lightman SL. Dynamics of adrenal glucocorticoid steroidogenesis in health and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Jun 15;408:227-34.

Stiefel M, Ruse JL. Urinary excretion of 16-alpha-hydroxyprogesterone during pregnancy and the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1969 Jul;29(7):919-25.

Stiefel M, Ruse JL. Urinary excretion of 16-alpha-hydroxyprogesterone during pregnancy and the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1969 Jul;29(7):919-25.

Storbeck KH, Bloem LM, Africander D, Schloms L, Swart P, Swart AC. 11 β -Hydroxydihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone, novel C19 steroids with androgenic activity: a putative role in castration resistant prostate cancer?

Storbeck KH, Schiffer L, Baranowski ES, Chortis V, Prete A, Barnard L, Gilligan LC, Taylor AE, Idkowiak J, Arlt W, Shackleton CHL. Steroid metabolome analysis in disorders of adrenal steroid biosynthesis and metabolism. *Endocr Rev.* 2019 Jul 11. pii: er.2018-00262.

Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 1996; 35: 9052-9059.

Tritos NA, Biller BMK. Medical Therapy for Cushing's syndrome in Twenty-first Century. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018 Jun;47(2):427-440.

Turcu AF, Nanba AT, Auchus RJ. The Rise, Fall, and Resurrection of 11-Oxygenated Androgens in Human Physiology and Disease. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(5):284-291.

Turcu AF, Nanba AT, Chomic R, Upadhyay SK, Giordano TJ, Shields JJ, Merke DP, Rainey WE, Auchus RJ. Adrenal-derived 11-oxygenated 19-carbon steroids are the dominant androgens in classic 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2016 May;174(5):601-9.

Villee DB. Effects of substrate and cofactors on steroid synthesis in hyperplastic adrenals. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964 May;24:442-55.

Yener S, Genc S, Akinci B, Secil M, Demir T, Comlekci A, Ertlav S, Yesil S. Carotid intima media thickness is increased and associated with morning cortisol in subjects with non-functioning adrenal incidentaloma. *Endocrine.* 2009 Jun;35(3):365-70.

