



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali**

**XXXIII Ciclo**

*Coordinatore: Ch.mo Prof. Francesco Squadrito*

---

**Indicatori genetici ed epigenetici di tumorigenesi ipofisaria:  
prospettive in ambito diagnostico, prognostico e terapeutico**

Candidato

**Dr. Giuseppe Giuffrida**

Tutor

**Prof. Salvatore Cannavò**

---

**Anno accademico 2019-2020**

## INDICE

Introduzione generale	<i>pag. 3</i>
Studio n. 1	<i>pag. 6</i>
Studio n. 2	<i>pag. 14</i>
Bibliografia	<i>pag. 24</i>
Figure	<i>pag. 31</i>
Tabelle	<i>pag. 35</i>

## INTRODUZIONE GENERALE

I tumori ipofisari (*pituitary tumors*, PT) costituiscono circa il 15% di tutte le neoplasie intracraniche, e secondo l'ultima classificazione WHO del 2017, si differenziano in base alla presenza o meno di secrezione ormonale (prolattina, GH, ACTH, TSH, gonadotropine) e/o di fattori di crescita espressi da specifiche linee cellulari [1, 2]. La distinzione tra adenomi e carcinomi dipende dalla presenza, nei secondi, di metastasi a distanza, ma gli stessi adenomi possono presentare caratteristiche di invasività locale, proliferazione cellulare e scarsa risposta alle terapie convenzionali tali da conferirgli la denominazione di "aggressivi" [3, 4]. Tuttavia, nell'approccio clinico a questo tipo di patologie, esistono ad oggi pochi dati relativi alla patogenesi ed alla biologia dei PT, in grado di predirne il comportamento e l'eventuale risposta al trattamento/possibilità di recidiva. Dal punto di vista della genetica dei PT, per esempio, mutazioni germinali come quelle a carico del gene di AIP (*aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*) sono associate all'insorgenza di adenomi ipofisari familiari isolati (*familial isolated pituitary adenomas*, FIPA), con esordio precoce, maggiore aggressività e resistenza agli analoghi della somatostatina (SSA) [5]. Allo stesso modo, le mutazioni del gene oncosoppressore *MEN1* che danno il nome all'omonima sindrome correlano con lo sviluppo di adenomi ipofisari nel 15-50% dei pazienti affetti, con un'età media alla diagnosi di circa 38 anni, una maggiore incidenza nel sesso femminile ed una maggiore frequenza di macroadenomi che in un terzo dei casi hanno caratteristiche più invasive rispetto ai PT non-MEN1 [6]. Altre mutazioni germinali note comprendono ulteriori geni regolatori del ciclo cellulare connessi alle sindromi da neoplasie endocrine multiple (*multiple endocrine neoplasias*, MEN) 1 e 4 (*CDKN1B* e *CDKN2C*), ed i geni alla base delle manifestazioni osservabili nel complesso di Carney (*PRKARIA*) e nella sindrome di Mc Cune-Albright (*GNAS*), rispettivamente [7].

Di converso, sono poche le evidenze simili per quanto concerne i PT sporadici e le mutazioni somatiche a carico di essi. Queste possono consistere in cambi di sequenza, in alterazioni

qualitative o nel numero di copie dei cromosomi, ma sono spesso aspecifiche e rare nel genoma dei PT, al punto da far ipotizzare anche un contributo oncogenetico di fattori non mutazionali [7, 8]. Le modificazioni epigenetiche – ovvero che si realizzano senza la modifica delle sequenze di DNA - comprendono sia le alterazioni nella trascrizione del mRNA legate a processi come la metilazione dei nucleotidi e l'acetilazione degli istoni, che le differenti espressioni di *long non-coding mRNA* (lncmRNA) che dei microRNA (miRNA).

*Metilazione.* La metilazione, ovvero il trasferimento di gruppi metilici sulle catene di DNA da parte di enzimi specifici, le DNA metil-n-transferasi (DMNT), è un meccanismo che fisiologicamente agisce per silenziare determinati geni regolandone l'espressione [8]. Esistono differenti isoforme delle DMNT, ed in particolare la DNMT 1 e 3A sono risultate iperesprese in PT più aggressivi, con la isoforma 1 maggiormente presente nei macroadenomi [9]. Sembrerebbe inoltre che questa iperattività delle DMNT porti per compenso ad una ipometilazione di altre regioni del DNA che risulterebbero dunque iper-trascritte, un evento anch'esso osservato nei processi di tumorigenesi [7]. I processi di metilazione possono avvenire a vari livelli del gene coinvolto, e se la maggior parte di essi sono concentrati in isole dinucleotidiche (CpG) nella regione promoter, possono essere coinvolte anche regioni intergeniche e/o poste all'interno del corpo del gene [10, 11].

*Acetilazione degli istoni.* L'acetilazione degli istoni, proteine ottameriche attorno a cui il DNA risulta avvolto in modo duplice e che regolano l'accessibilità al genoma, corrisponde in genere all'attivazione trascrizionale delle regioni interessate, e viene modulata dinamicamente dall'azione opposta delle istone-acetiltransferasi (HAT) ed istone-deacetilasi (HDAC), rispettivamente [8]. In particolare, l'accessibilità al genoma aumenta allorché l'acetilazione coinvolge le code istoniche (specie in H3 ed H4), mentre anche la metilazione delle code specie a carico della lisina 9 in H3 determina un silenziamento delle regioni geniche coinvolte [7].

*MiRNA*. I miRNA sono molecole endogene di RNA non codificante, sintetizzate dal DNA nucleare cellulare e con una lunghezza media di 20-22 paia di basi (*base pairs*, bp). Essi regolano la trascrizione legando le molecole di mRNA bersaglio e degradandole, o mediante repressione della traduzione [12]. I miRNA sono caratterizzati da un preciso sistema di denominazione convenzionale, che prevede l'uso del prefisso "miR" seguito da un trattino e un numero, che indica l'ordine di denominazione, mentre una ulteriore lettera minuscola indica le isoforme con variabilità di uno o due nucleotidi [12]. Proprio in ragione delle suddette funzioni regolatorie, un crescente numero di evidenze dimostra come i miRNA siano coinvolti in svariate patologie, in particolare quelle tumorali, in cui nello specifico si fa riferimento ad essi come "oncomiR" [13].

## **STUDI CONDOTTI**

- 1. Studio del metiloma di tumori ipofisari non secernenti e GH-secernenti (in fase di pubblicazione)**
- 2. L'espressione dei microRNA nei tumori ipofisari: differenze relative allo stato funzionale, caratteristiche istologiche e comportamento clinico**

## **Studio n. 1**

### **Presupposti**

Nel contesto dei PT sporadici, il ruolo delle alterazioni epigenetiche è di crescente interesse visto anche il peso ridotto delle mutazioni genetiche “classiche” in questo ambito di patologia oncologica [7]. In particolare, nuove evidenze stanno emergendo riguardo i fenomeni di metilazione del DNA ad opera delle DMNT, specie a livello delle cosiddette isole CpG e delle regioni genomiche ad esse correlate (**Figura 1A**), ma anche altre regioni possono essere interessate con esiti significativi sulla crescita neoplastica [8]. Tuttavia, ad oggi sono ancora pochi i dati riguardanti pattern di metilazione specifici per i PT e/o per i loro sottotipi. Pertanto, la ricerca di nuovi geni sottoposti a tale regolazione, e la specificità connessa alle tipologie di tumori, sono un passo fondamentale nella correlazione di questi parametri con le caratteristiche biologiche delle neoplasie ipofisarie, e nella loro validazione come eventuali predittori di comportamento clinico e/o risposta alle terapie. Inoltre, anche le DMNT possono essere un possibile target nello sviluppo di terapie mirate [8].

Scopi dello studio:

- verificare le differenze nello stato di metilazione dei PT rispetto al tessuto ipofisario normale;
- analizzare le differenze nei livelli di metilazione tra NFPA e GH-omi;
- correlare lo stato di metilazione con le caratteristiche clinico-patologiche dei PT.

### **Materiali e Metodi**

Abbiamo valutato il metiloma di 21 campioni di tumori ipofisari (11 GH-omi, 10 NFPA) e un campione di ipofisi sana raccolti nella Banca Tissutale della UOC di Neurochirurgia del nostro Policlinico Universitario di Messina tra il 2015 ed il 2017. Un consenso informato è stato somministrato a tutti i pazienti, e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell’Azienda Ospedaliera Universitaria “G. Martino”.

*Sequenziamento del DNA.* Il profilo di metilazione dei 21 tumori e del tessuto ipofisario sano è stato ottenuto mediante protocollo TruSeq Methyl Capture EPIC per preparazione delle librerie seguito da *next generation sequencing* (NGS). Le aliquote di 1000 ng di DNA genomico per campione, sono state ridotte in piccoli frammenti (media 150-200 bp) tramite sistema Covaris M220, successivamente arricchiti mediante ibridizzazione con specifiche sonde di cattura, e quindi convertiti in bisolfito ed amplificati. Le 12 diverse librerie di DNA ottenute sono state raggruppate in quantità equimolari, e sequenziate con metodo NGS (sistema Illumina HiSeq 1500) in 4 differenti corsie per evitare *bias* analitici.

*Analisi dei dati ottenuti dal sequenziamento.* I dati ottenuti sono stati analizzati mediante un sistema bioinformatico multi-step, partendo dal controllo di qualità dei campioni tramite software FASTQC, fino ai processi di allineamento delle sequenze e la quantificazione a valle con l'utilizzo di "QuasR" (versione 1.22.1). La mappatura delle sequenze è stata effettuata utilizzando una versione di genoma di riferimento pre-processata in BS (versione GRCh37/hg19). Infine, per quantificare i livelli di metilazione in ciascun campione, abbiamo considerato un totale di 437792 regioni genomiche (lunghezza media 245 bp, range 2-8131 bp) come nella lista del kit TruSeq Methyl Capture EPIC (Illumina). La frazione di metilazione ( $\beta$ ) di ciascuna regione target per campione è stata ottenuta dal rapporto tra le letture metilate ed il numero totale di letture allineate, variando da 0 (non metilate) e 1 (completamente metilate).

*Analisi differenziale della metilazione.* Per incrementare la consistenza dei risultati, abbiamo incluso tutte le regioni target (n= 184841) coperte in tutti i campioni di tumore e calcolato come  $\text{Log}_2$  l'incremento della metilazione (*methylation fold enrichment*) tra la metilazione media dei GH-omi e degli NFPA, rispettivamente. La significatività statistica è stata calcolata mediante T-test ed i valori di P corretti per confronti multipli con il metodo di Bonferroni. I risultati sono stati considerati significativi per valori di P corretti secondo Bonferroni inferiori a 0.05, e se l'incremento logaritmico era superiore o inferiore a 0.5. Per ottenere la distanza delle regioni a

differente metilazione dai geni più vicini ed altre informazioni genomiche, è stato utilizzato il software ANNOVAR.

## Risultati

Un totale di 21 campioni di PT (11 GH-omi, 10 NFPA) sono stati inclusi nello studio ed analizzati secondo i Metodi di cui sopra. Il controllo qualità del sequenziamento ha validato *paired-end-reads* di lunghezza tra 35 e 101 bp. La percentuale di sequenze con score di qualità superiore a 20 (Q20) e superiore a 30 (Q30) era del 98.91% e 94.42%, rispettivamente, con una qualità media per base del 36.20%. Il *mapping rate* complessivo spaziava tra il 71.3% ed il 78.95%. La quantificazione della metilazione è stata effettuata restringendo l'analisi alle regioni genomiche coperte dalla lista del kit TruSeq fornita da Illumina. Sono state analizzate un totale di 437792 regioni con una lunghezza media di 245 bp (2-8131 bp), equivalenti a 301525 non-CpG, 61703 isole CpG, 18707 *N\_shelf*, 19038 *N\_shore*, 19201 *S\_shelf* e 17618 *S\_shore*.

Per l'analisi differenziale della metilazione, abbiamo considerato tutte le regioni target (n=184841) coperte nei campioni di tumore. In generale, gli NFPA presentavano livelli di metilazione più elevati rispetto ai GH-omi ( $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ; test di Mann-Whitney, **Figura 1B**). Inoltre, abbiamo valutato i livelli di metilazione delle regioni correlate alle isole CpG, ed in ciascun caso gli NFPA erano più metilati ( $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ; test di Mann-Whitney, **Figura 1C**). In ultimo, abbiamo calcolato il *methylation fold enrichment* (come  $\text{Log}_2$ ) tra i campioni di tumore per identificare le regioni a differente metilazione (*differentially methylated regions*, DMR, o *differentially methylated sites*, DMS). Gli NFPA presentavano un profilo di metilazione distinto rispetto ai GH-omi. In particolare, abbiamo ottenuto 178 regioni target differentemente metilate ( $P$ -value corretto  $\leq 0.05$ ; incremento in  $\text{Log}_2 \pm 0.5$ ) nei due tipi di tumore. Solo due regioni sono risultate significativamente ipermetilate nei GH-omi rispetto ai PT non secernenti. Come illustrato nella **figura 2A**, solo 13 delle 178 regioni (7.3%) ricadevano in esoni di proteine codificanti o in *non-coding RNA* (ncRNA). Il confronto dei livelli di metilazione tra regioni

codificanti e non codificanti ha prodotto risultati significativi ed ha evidenziato la ipermetilazione degli NFPA in entrambi i casi (**Figura 2B**,  $P < 0.01$ ; test di Mann-Whitney). Abbiamo anche osservato che la maggioranza (98.64%) delle DMR ricadeva nelle regioni *open sea*, come riportato nella **figura 2C**. Infatti, solo tre DMR si trovavano in isole CpG note. Ancora, abbiamo ottenuto risultati significativi mettendo a confronto i livelli di metilazione dei due tipi di PT all'interno delle regioni correlate alle isole CpG, eccetto le isole CpG stesse (**Figura 2D**,  $P = 0.1$ ; test di Mann-Whitney).

## Discussione

Il ruolo delle modificazioni epigenetiche, e nello specifico della metilazione, nella genetica dei tumori ipofisari sporadici ha assunto un peso crescente negli ultimi anni. Infatti, sono poche le mutazioni somatiche note con esiti significativi, come ad esempio le alterazioni di *GNAS* (codificante per la subunità  $\alpha$  stimolatoria delle proteine G) nei GH-omi o di *USP8* nel caso dei tumori ACTH-secerntenti, che causa l'iperespressione di *EGFR* e promuove la crescita delle cellule corticotrope e la secrezione di ACTH [14]. In particolare, si è visto come la metilazione, in quanto uno dei processi regolatori della trascrizione nei PT, si concentri preferenzialmente a carico delle cosiddette isole CpG, ovvero quelle sequenze di circa 500 bp che risultano strettamente connesse ai promoter, e porti al silenziamento di geni spesso coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare [15]. Infatti, rientrano tra questi parecchi geni oncosoppressori, come nel caso della coppia *CDKN2A/Rb1*, laddove gli effetti delle possibili alterazioni confluiscono nella fosforilazione di pRb con ricadute sulla regolazione dell'apoptosi [8].

La vera sfida nello studio del profilo di metilazione (metiloma) dei PT resta però l'individuazione di alterazioni specifiche sia per le neoplasie ipofisarie che per i sottotipi, che possano in tal modo divenire markers biologici/prognostici/terapeutici efficaci nella gestione di queste patologie. Molti dei geni sottoposti a metilazione, infatti, possono essere rilevati in differenti neoplasie in assenza di una stretta specificità per la ghiandola ipofisaria. Un dato che

emerge da diversi studi – e confermato anche nella nostra casistica - è la tendenza, tra i *pattern* di metilazione, a un maggior grado di metilazione da parte dei tumori non secernenti rispetto ai GH-omi, mentre NFPA invasivi possono presentare anche ipometilazione [7, 11, 15, 16]. Inoltre, gli NFPA sono maggiormente interessati dall'alterazione di *CDKN2A*, con rapporto inverso rispetto ai tumori GH secernenti che più frequentemente non esprimono pRb [8]. Per quanto concerne invece i sottotipi, proprio la metilazione di *CDKN2A* è risultata correlata a volume dei PT, grado ed età dei pazienti, con maggiori livelli di metilazione nei macroadenomi [8]. Inoltre, associazioni sono emerse ad esempio tra la ipermetilazione di *p27* e gli ACTH-omi, *EML2*, *HOXB1* e *RHOD* ed NFPA, GH-omi e tumori PRL-secernenti [7, 8]. Uno studio del 2016 di Gu et al ha invece evidenziato come la metilazione portasse alla *downregulation* di geni come *GALNT9*, *CDHI* e *CDHI3* (E-caderina ed H-caderina, rispettivamente), implicati nei processi di adesione cellulare e con un possibile legame con lo sviluppo di invasività [16]. Sempre il medesimo studio evidenziava inoltre come i DMS non si concentrassero solo in prossimità di isole CpG, ma anche nel corpo dei geni in circa il 40% dei casi [16]. Un dato, questo, in parte confermato dalla nostra esperienza, in cui solo tre regioni a differente metilazione erano situate in isole CpG note, mentre il resto delle alterazioni era reperibile in regioni *open sea* del genoma. Un'altra componente del genoma oggetto di alterazioni mediate da processi di metilazione è rappresentata dai lncRNA, ovvero frammenti di RNA di circa 200 nucleotidi che svolgono funzioni in parte simili a quelle dei corrispettivi RNA codificanti, con un ruolo talvolta sovrapponibile a quello di oncogeni ed oncosoppressori [17]. Per esempio, la *downregulation* conseguente ad ipermetilazione di *MEG3*, interagente con p53 ed inquadrato come oncosoppressore, è stata caratteristicamente riscontrata nei gonadotropinomi, specie nei tumori non funzionanti [8, 17, 18]. Per quanto riguarda i nostri dati, l'analisi delle DMR ha rilevato in effetti una prevalenza di ipermetilazione a carico di sequenze non codificanti, compresi i lncRNA (**Figura 2 A**). Passando poi alle singole DMR, con un trend lievemente diverso rispetto a quanto evidenziato in letteratura, le alterazioni erano localizzate soprattutto

in regioni *open sea* e meno a livello dei promoter (**Figura 2 C**). Resta però confermata la netta e significativa prevalenza di ipermetilazione a carico dei tumori non secernenti rispetto ai GH-omi (**Figura 2 B e D**). Un dato significativo è poi rappresentato dal riscontro di ipermetilazione – maggiore negli NFPA – a carico di tre isole CpG note facenti parte di geni la cui funzione non è stata ancora del tutto studiata, ma che sembrerebbero avere un peso significativo nella tumorigenesi.

1) *C7orf50* è un gene quasi ubiquitario espresso a livello di milza, reni, prostata, encefalo etc., il cui prodotto risulta implicato nell'assemblaggio del RNA ribosomiale nel nucleo, anche se parte delle sue sequenze sembrerebbero anche dare origine a dei miRNA regolatori [19]. Sulla sua effettiva funzione non si sa ancora molto, sebbene alcune evidenze indicano tra i suoi possibili ligandi il fattore trascrizionale Sp1, che ha varie funzioni di regolazione (es. ciclo cellulare, apoptosi, etc.) tra le quali è stata osservata una interazione con AHR che favorirebbe l'ubiquitinazione e conseguente degradazione del recettore estrogenico  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in tumori mammari e uterini nel topo [20].

2) *GNG7* è un gene posto sul cromosoma 19 che codifica per la subunità  $\gamma 7$  delle proteine G leganti la guanina, una proteina coinvolta nell'arresto della crescita cellulare da contatto e con funzione di oncosoppressore [21]. Tra i diversi studi presenti in letteratura, nel 2012 Hartmann et al, in una coorte di pazienti con tumori del distretto testa-collo, hanno dimostrato la presenza di ipermetilazione del promoter di *GNG7* nel 43% dei casi, e la conseguente inattivazione del gene correlava con maggiori dimensioni del tumore e minor potenziale metastatico, venendo riscontrata più frequentemente in pazienti giovani [21]. A conferma di questo dato ricorrente, un altro studio del 2019 di Xu et al ha evidenziato la ridotta espressione di *GNG7* conseguente a ipermetilazione in casi di carcinoma renale a cellule chiare. In tal caso, la metilazione, non presente nel tessuto renale normale, conduceva ad una alterazione del *pathway* di segnale di mTOR1, ed era legata ad un più elevato stadio/grado di

malattia ed una complessiva riduzione della sopravvivenza [22]. Non vi sono al momento dati relativi a conseguenze simili nei PT.

3) *BAHCCI* è un silenziatore trascrizionale della cromatina, che è implicato in meccanismi di replicazione cellulare e regolazione della trascrizione. Sono stati studiati fenomeni di amplificazione e delezione a carico di quest'ultimo, che lo renderebbero potenzialmente partecipe di processi di rigenerazione cellulare aberranti correlati allo sviluppo di epatocarcinoma, secondo meccanismi non ancora del tutto chiariti ma verosimilmente legati ad alterazioni degli effettori a valle dei *pathway* di segnale [23]. Scarsi sono invece i dati sulle modificazioni epigenetiche di *BAHCCI*, sebbene uno studio sperimentale di Gitik et al abbia individuato un incremento della metilazione di questo gene nell'ippocampo dorsale di topi trattati con nicotina in epoca preadolescenziale, in un modello animale del rapporto tra abuso di sostanze in età adolescenziale (o anche esposizione ad alcol *in utero*) e dipendenza. Tali alterazioni, relative a modifiche della cromatina, correlavano con lo sviluppo di deficit cognitivo in età adulta, che invece veniva prevenuto dalla contemporanea somministrazione di colina [24].

## **Conclusioni**

I nostri dati, dunque, aggiungono ulteriori evidenze all'importanza dei fenomeni di metilazione nello sviluppo e nel comportamento dei PT. In particolare, si conferma un significativo incremento della metilazione a carico di NFPA vs GH-omi, la cui origine non è ancora del tutto chiara da un punto di vista fisiopatologico. Sicuramente, le modifiche a carico di geni con funzione di oncogeni/oncosoppressori o comunque coinvolti nei processi di regolazione del ciclo cellulare hanno un peso importante nell'influenzare la biologia dei PT. Tuttavia, molti di questi eventi sembrerebbero coinvolgere *pathway* comuni a diversi tumori, senza corrispondenza specifica con singoli istotipi. Ulteriori studi sono pertanto necessari per caratterizzare il ruolo di queste alterazioni nella genesi dei PT, approfondendo i rapporti tra le

singole modifiche del metiloma ed i parametri clinici, il che potrebbe fornirci ulteriori strumenti da validare come marker prognostici o terapeutici in patologie rare ma con un significativo impatto sulla qualità di vita dei pazienti, ed in ultimo sulla sopravvivenza nel caso di tumori invasivi.

## **Studio n. 2**

### **Presupposti**

Gli adenomi ipofisari (PA) sono per la maggior parte tumori benigni ed a lenta crescita, sebbene un piccolo gruppo di essi sia caratterizzato da mancata risposta alle terapie convenzionali (chirurgia, radioterapia e terapie farmacologiche) e comportamento clinicamente aggressivo che si traduce in rapida crescita, invasività locale e/o recidive multiple e più raramente metastasi a distanza (carcinoma ipofisario) [3, 25-27]. I PA clinicamente aggressivi – con frequenza variabile tra 2.7 e 15% di tutti i tumori ipofisari – presentano generalmente una prognosi sfavorevole e si associano ad un incremento di morbidità e mortalità [3, 26, 27]. Pertanto, un loro tempestivo riconoscimento risulta fondamentale, dato che i pazienti affetti necessitano di un più stretto follow-up radiologico rispetto ai soggetti con PA non aggressivi e potrebbero richiedere un trattamento multimodale [27]. Nonostante gli avanzamenti nei criteri di classificazione, non esistono ancora marker clinici, radiologici o istologici standardizzati per definire l'aggressività dei PA, sebbene possano essere presi in considerazione l'indice di proliferazione antigenico Ki-67 ed il riscontro immunohistochimico di p53 [27-29]. Pertanto, sarebbe necessario affiancare ai criteri istopatologici dei marker molecolari in grado di predire il comportamento e la prognosi dei tumori ipofisari.

Negli ultimi anni, un campo di ricerca emergente è costituito dalle alterazioni nell'espressione dei microRNA (miRNA) nei PT [30]. I miRNA sono corte molecole di RNA non codificante, che svolgono ruoli di regolazione a livello post-trascrizionale, inibendo la traduzione o inducendo la degradazione degli mRNA dei loro geni target [12, 31]. Secondo le conoscenze attuali, più del 30% dei geni umani codificanti per proteine sono regolati da miRNA, che pertanto influenzano i processi biologici di base, come metabolismo, sviluppo, proliferazione, differenziazione cellulare ed apoptosi [31]. In particolare, nell'ambito del ciclo cellulare, i miRNA possono stabilire un complesso network di interazioni con cicline, chinasi ciclino-

dipendenti e fattori di trascrizione, regolando la proliferazione e la morte cellulare [32]. Pertanto, la deregolazione dell'espressione dei miRNA può alterare questi complessi *pathway* biologici e condurre alla crescita tumorale, agendo essi come oncogeni o oncosoppressori in base a determinate condizioni [33, 34]. La deregolazione dell'espressione dei miRNA è stata documentata e caratterizzata a livello tissutale in diverse patologie tumorali, e sembrerebbe anche avere un ruolo nella tumorigenesi a livello ipofisario [33-37].

Nell'ambito della ricerca di marker molecolari in grado di predire il comportamento clinico dei PA, scopi di questo studio sono stati:

- verificare la differenza nell'espressione dei miRNA coinvolti in *pathway* rilevanti per la fisiopatologia dei PT, in un gruppo di PA vs tessuto ipofisario normale;
- indagare la correlazione tra l'espressione dei miRNA e le caratteristiche cliniche ed istopatologiche dei PA.

## **Materiali e Metodi**

Sono stati ottenuti campioni di PA di 23 pazienti (12 M, 11 F), età media  $51.6 \pm 13.2$  aa (range 27-76 aa) con PA non funzionanti (NFPA, n= 12) ed ormono-secernenti (n= 11: 5 GH-omi, 3 ACTH-omi, 3 PRL-omi), sottoposti a chirurgia per via trans-naso sfenoidale (TNS) presso il nostro Policlinico Universitario. La diagnosi di malattia è stata posta secondo i correnti criteri clinici, biochimici ed istopatologici, mentre di ciascun paziente sono stati raccolti i dati demografici, neuroradiologici (dimensioni dei PA ed invasione del seno cavernoso valutata con RMN 1.5 T pre-chirurgia) e clinici (modalità di trattamento) – come esposto in **Tabella 1**. Come routinaria procedura diagnostica, tutti i campioni di tumore sono stati sottoposti a valutazione istopatologica, con determinazione immunohistochimica di ormoni ipofisari (GH, ACTH, PRL, FSH, TSH), antigene tumorale p53 ed indice di proliferazione Ki-67. Come controlli, sono stati inoltre valutati 5 campioni di ipofisi sana ottenuti da soggetti con storia negativa per patologia

ipofisaria entro 6 ore dal decesso. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della provincia di Messina.

*Disegno Sperimentale.* È stata effettuata un'accurata ricerca sul database Medline (tramite l'interfaccia Pubmed) concernente i miRNA implicati o potenzialmente rilevanti nella fisiopatologia dei PT. Parole chiave: “microRNA” o “miRNA” da sole o in combinazione con “pituitary tumor” o “pituitary adenoma”. Tra gli articoli rispondenti ai suddetti criteri, abbiamo identificato i miRNA che esercitano una funzione regolatoria in *pathway* correlati al ciclo cellulare o ai processi di apoptosi, o in altri *pathway* rilevanti per la fisiopatologia dei PT. Sulla base di questi ultimi, abbiamo selezionato una lista di 20 miRNA: 516b-3p, 151a-3p, 455-3p, 29b-3p, 508-5p, 199a-5p, 23b-5p, 34b-5p, 26b-5p, 128-3p, 30a-5p, 140-5p, 149-3p, 146a-5p, 130a-3p, 648, 370-3p, 107, 378a-5p, 711 (riportati in **Tabella 2**). I miRNA e i controlli interni sono stati analizzati tramite RT-qPCR in tutti i PT ed il tessuto ipofisario normale, secondo le linee guida MIQE [38].

*Determinazione dell'espressione dei miRNA e analisi dei dati.* Dai campioni di tessuto (PA e ghiandole normali), immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C, è stato estratto l'RNA totale usando il kit di isolamento mirVana (Thermo Fisher Scientific, USA), con controllo quali-quantitativo tramite Nano Drop ND-1000. Successivamente è stata operata la trascrizione inversa del RNA mediante il kit Taq Man di trascrizione inversa per miRNA (Thermo Fisher Scientific, USA), seguendo le indicazioni del produttore. Quindi, i livelli di espressione dei miRNA sono stati determinati nei campioni utilizzando i kit di dosaggio TaqMan Universal Master Mix II e TaqMan MicroRNA assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA), secondo le indicazioni del produttore e tramite il sistema RT-qPCR modello 7300 (Applied Biosystems, USA). L'espressione differenziale dei miRNA per ciascun campione (tumore o tessuto normale) è stata valutata secondo il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (39). Il tasso di variazione dell'espressione di ciascun miRNA, osservato nell'intero gruppo di PA ed in ciascun

sottogruppo rispetto all'ipofisi sana è stato determinato mediante la media dei valori  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se il tasso di variazione è pari a 1, non c'è *up-* o *downregulation*. Le variazioni comprese per un valore maggiore o minore di 1 suggerisce rispettivamente una *upregulation* o *downregulation* nei tumori rispetto all'ipofisi sana. Il valore della *upregulation* era il medesimo del tasso di variazione. Il valore della *downregulation* era l'inverso negativo del tasso di variazione.

*Analisi statistica.* I dati numerici sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard e le variabili categoriche come frequenza assoluta e percentuale. Dato che le variabili numeriche non presentavano distribuzione normale, come verificato tramite test di Kolmogorov-Smirnov, è stato applicato un approccio non parametrico. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per effettuare i confronti, per tutti i parametri numerici esaminati, tra gruppo dei tumori e tessuti di controllo, e tra NFPA e PA funzionanti. Inoltre, le differenze tra i quattro sottotipi di PA (NFPA; ACTH-omi; GH-omi e PRL-omi) sono state valutate mediante il test di Kruskal-Wallis; per le variabili risultate statisticamente significative, sono stati effettuati confronti a coppie con il test di Mann-Whitney. La correzione di Bonferroni è stata applicata per confronti multipli. La correlazione punto biseriale è stata applicata per valutare la relazione di interdipendenza tra l'espressione dei miRNA e le caratteristiche clinico-patologiche. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software IBM SPSS ver. 22 per Windows. Un valore di p minore di 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## **Risultati**

I dati demografici, clinici, radiologici ed istologici dei 23 pazienti affetti da PA sono mostrati in **Tabella 1**. Tutti i PA eccetto uno erano macroadenomi, con un diametro massimo variabile da 10 a 40 mm, mentre l'invasione del seno cavernoso (di ogni grado secondo la classificazione di Knosp) era dimostrata radiologicamente in 15 pazienti su 23. Prima della chirurgia, un paziente con PRL-oma era stato sottoposto a terapia farmacologica con dopamino-agonisti, sospesa diversi mesi prima dell'intervento. Sette pazienti erano stati sottoposti a multipli

interventi chirurgici, quattro erano stati trattati anche con radioterapia/radiochirurgia, mentre in otto casi era stato necessario un trattamento farmacologico post-chirurgia. Alla valutazione immunohistochimica, l'indice proliferativo Ki-67 era inferiore al 3% nella maggior parte dei PA (15/23), mentre una colorazione positiva per p53 (>10 nuclei fortemente positivi per 10 HPF) è stata riscontrata in 7 casi su 23. Cinque macroadenomi (1 NFPA, 2 GH-omi, 1 ACTH-oma e 1 PRL-oma) hanno mostrato caratteristiche "atipiche", includendo sia un Ki-67  $\geq 3\%$  che la positività per p53. La dimostrazione immunohistochimica degli ormoni dell'ipofisi anteriore era coerente con la diagnosi clinica e biochimica in tutti gli adenomi funzionanti, risultava negativa in 5 NFPA su 12, mentre i restanti 7 presentavano una debole positività per FSH e/o LH e/o PRL e/o GH o ACTH. Un sottogruppo di tre pazienti (n. 16, 19 e 21 – **Tabella 1**) era affetto da tumori che presentavano sia caratteristiche istopatologiche "atipiche" che un comportamento clinico aggressivo, con caratteri di invasività e rapida crescita/recidiva nonostante il trattamento multimodale convenzionale.

La maggior parte dei miRNA erano ipoespressi nei campioni di tessuto ipofisario rispetto all'ipofisi sana (**Figura 1, Tabella 3**). In particolare, 17 dei 20 miRNA presi in considerazione erano significativamente ipoespressi negli NFPA rispetto al tessuto normale, mentre 15 miRNA erano soggetti a significativa *downregulation* nel sottogruppo dei PA secernenti (**Figura 2**). MiR-711 non era espresso né nel tessuto normale né nei tumori.

Inoltre, i miRNA erano espressi in modo differente in PA funzionanti ed NFPA. In dettaglio, abbiamo rinvenuto una significativa ipoespressione di miR-149-3p (-6.823;  $p=0.036$ ), miR-130a-3p (-2.550;  $p=0.014$ ) e miR-370-3p (-6.140;  $p=0.026$ ) in NFPA rispetto ai PA ormonosecernenti. In quest'ultimo gruppo, i GH-omi dimostravano i più alti livelli di espressione di miR-149-3p (13.285;  $p=0.004$ ) in rapporto ai tumori non funzionanti.

In relazione alla immunohistochimica per gli ormoni ipofisari, l'espressione di miR-149-3p e miR-199a-5p correlava direttamente con la presenza di GH ed inversamente con quella di

ACTH. Inoltre, miR23b-5p e miR-370-3p correlavano direttamente con l'espressione di GH, miR-26b-5p correlava inversamente con ACTH. Una correlazione negativa è stata poi osservata tra miR26b5p e l'indice Ki-67, e tra miR-30a-5p e caratteristiche morfologiche "atipiche" (**Tabella 4**).

Rispetto alle caratteristiche radiologiche, l'espressione di miR-30a-5p, miR-516b-3p e miR-23b-5p correlava inversamente con l'invasione del seno cavernoso.

Per quanto concerne invece le modalità di trattamento, miR-23b-5 e miR-128-3p correlavano inversamente con chirurgie multiple, mentre miR-130a-3p correlava in modo diretto con chirurgie multiple, trattamento farmacologico post-chirurgia e trattamento multimodale. Infine, è stata individuata una correlazione positiva tra il trattamento farmacologico post-chirurgia e miR-370-3p, e tra trattamento multimodale (chirurgie multiple, radioterapia e terapia farmacologica post-chirurgia) e miR-146a-5p (**Tabella 4**). Una correlazione negativa è emersa tra l'espressione di miR-508-5p e la combinazione di caratteristiche morfologiche "atipiche" ed aggressività clinica.

Non vi era una correlazione significativa tra l'espressione dei miRNA ed altre caratteristiche demografiche o cliniche dei PA, inclusi età alla diagnosi, sesso e dimensioni del tumore.

## **Discussione**

In questo studio, è stata valutata comparativamente l'espressione dei miRNA in adenomi ipofisari ed ipofisi normale. Sono stati studiati 20 miRNA, noti per essere coinvolti in processi di proliferazione cellulare o apoptosi o in altri pathway rilevanti per la biologia dei PT. Tutti tranne uno (miR-711) erano espressi sia nei tumori che nel tessuto normale, e la maggior parte di essi era significativamente sottoposta a *downregulation* nei PA rispetto all'ipofisi sana, ad eccezione di miR-107 e miR-378 (*upregulation*). Queste evidenze suggeriscono che l'alterata regolazione dei miRNA potrebbe avere un ruolo nella fisiopatologia dei PT.

L'espressione di miR-455-3p, miR-648, miR-711, e delle isoforme miR-26b-5p, miR-29b-3p, miR-199a-5p, miR-378a-5p, e miR516b-3p non è stata precedentemente investigata nel tessuto ipofisario, sia normale che tumorale. Tuttavia, la loro presenza è stata caratterizzata in altre neoplasie maligne, dove sembrano funzionare come oncosoppressori, dal momento che risultavano passibili di *downregulation* nei tessuti neoplastici rispetto al tessuto normale. Nel presente studio, forniamo la prima evidenza che i suddetti miRNA – ad eccezione di miR-378-5p sono soggetti a *downregulation* nei PT, dimostrando il loro profilo di alterata espressione a livello tissutale. Aggiungiamo anche ulteriori evidenze della alterata espressione di un gruppo di miRNA (miR-151-3p, miR-34b-5p, miR-30a-5p, miR-130a-3p, miR-146-5p e miR149-3p), di cui è già stata riportata una differente espressione nei tessuti ipofisari [36, 40-44]. In linea con quanto presente in letteratura, abbiamo dimostrato che i miRNA sono sostanzialmente sottoposti a *downregulation* nei PT. Una ridotta espressione dei miRNA può essere causata da alterazioni genetiche (mutazioni) o epigenetiche (ipermetilazione) a carico delle regioni promoter o da modificazioni che avvengono direttamente a livello del processamento dei miRNA [45]. La *downregulation* dell'espressione dei miRNA, piuttosto che la sua *upregulation*, ha un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione neoplastica, dato che i miRNA possono agire come oncosoppressori, influenzando l'espressione di vari geni target e di *pathway* di segnale oncogenici a valle. I miRNA 151a-3p, 26b-5p, 140-5p, 130a-3p regolano i geni target del *pathway* PI3/AKT/mTOR le cui alterazioni, che interessano maggiormente il suo principale mediatore AKT, sono coinvolte nella patogenesi dei PA [46, 47]. MiR-23b-5p, isoforma di miR-23b, interagisce con il traslocatore nucleare del recettore per gli idrocarburi arilici (ARNT), che ha un ruolo chiave nel *pathway* di AHR. Quest'ultimo è coinvolto nei processi di detossificazione cellulare e sembra essere implicato nella fisiopatologia, nell'espressione clinica e nella risposta al trattamento dei PT, in particolare dei GH-omi [48-51]. MiR-149-3p, miR-140-5p a miR-199-5p hanno come target il gene *SMAD3*, che

rappresenta il principale mediatore del *pathway* di segnale TGF $\beta$ -SMAD ed è coinvolto nello sviluppo e nell'invasività degli NFPA [52].

Abbiamo individuato una differente espressione dei miRNA negli adenomi secernenti e non funzionanti, dimostrando una significativa *downregulation* di miR-149-3p, miR-130a-3p, miR-370-3p negli NFPA in confronto ai PA funzionanti. L'espressione di miR-149-3p, miR-370-3p, miR23b-5p, miR-26b-5p e miR-199a-5 correlava significativamente con la dimostrazione immunohistochimica degli ormoni ipofisari nel tessuto tumorale. In particolare, miR-149-3p era preferenzialmente espresso nei GH-omi, fino a 13 volte in più che negli NFPA e correlava positivamente con la immunoreattività per GH nel tessuto tumorale mentre era inversamente correlata al riscontro di ACTH. Questo differente profilo di espressione dei miRNA potrebbe suggerire un loro ruolo nella regolazione della secrezione di ormoni ipofisari. Questo effetto potrebbe essere mediato dalle GTPasi Rab, una famiglia di proteine che agiscono nel traffico di vescicole di membrana tra gli organelli cellulari, come anche nei processi di endocitosi, esocitosi e secrezione degli endosomi [53]. Le GTPasi Rab sono state studiate in relazione all'ipersecrezione ormonale nei PA. L'espressione di Rab18 è risultata minore nei GH-omi e di maggiore entità nei campioni di NFPA rispetto all'ipofisi normale, ed inversamente correlata con i livelli di GH nel plasma [54]. Negli NFPA, la *downregulation* di miR-149-3p e miR-130a-3p potrebbe influenzare l'espressione dei geni target *Rab11* e *Rab9*, che codificano per GTPasi Rab, alterando i *pathway* di secrezione. Di recente He et al. hanno valutato l'espressione dei miRNA nei PA funzionanti e non, riportando la *downregulation* di miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-378 e miR-338-5p nei PRL-omi, di miR-493-5p e miR-124-3p in NFPA e GH-omi, e la *upregulation* di miR-181b-5p e miR-184 nei medesimi sottotipi. I dati che emergono da questo studio hanno dimostrato distinti *pathway* dei miRNA nei differenti sottotipi di PA, proponendo un possibile ruolo dei miRNA come nuovi biomarker per ciascun tipo di PA [55].

Sebbene tutti i miRNA identificati nel nostro studio siano coinvolti, direttamente o indirettamente, in processi di proliferazione cellulare ed apoptosi, non abbiamo trovato alcuna associazione tra la loro espressione nei PA e le dimensioni tumorali. Tuttavia, abbiamo rinvenuto un'associazione significativa tra l'espressione differenziale dei miRNA e diversi parametri clinico-patologici di aggressività dei PA. È emersa un'associazione negativa tra l'alterata espressione di miR-26b-5p e l'indice di proliferazione Ki-67, e tra l'alterata espressione di miR-30a-5p e caratteristiche morfologiche "atipiche", come anche tra miR-508-5p e la concomitante presenza di caratteristiche morfologiche "atipiche" e comportamento clinico aggressivo, e tra miR-23b-5p e l'invasione del seno cavernoso o chirurgie multiple, suggerendo che questi specifici miRNA potrebbero predire il comportamento aggressivo dei PA. Questo è il primo studio che correla l'alterata espressione di miR-508-5p e miR-26b-5p e l'aggressività nei PT; mentre un simile ruolo è stato valutato in altri tumori. Sia miR-508-5p che miR-26b-5p sono noti oncosoppressori, che regolano geni associati con la matrice extracellulare e sono risultati soggetti a *downregulation* in vari tipi di cancro [56-59]. Li et al. hanno dimostrato la *downregulation* di miR-26b-5p in cellule di carcinoma del colon-retto ad alto potenziale metastatico. Le cellule trasfettate con miR-26b-5p presentavano livelli inferiori di Ki-67 mentre le cellule con *knockdown* dello stesso mostravano l'effetto opposto, confermando una correlazione inversa tra miR-26b-5p e Ki67 [58]. Anche la *downregulation* di miR-508-5p potrebbe favorire la progressione tumorale e l'invasività in diverse linee di cellule tumorali [59, 60]. L'azione di oncosoppressore di MiR-30a-5p è stata riportata in diverse neoplasie, ed è risultata inversamente correlata alla progressione tumorale [61, 62]. Ruan et al hanno dimostrato un'associazione negativa tra miR-30a-5p e proliferazione, migrazione ed invasività in cellule di carcinoma del cavo orale *in vitro* [63]. Studi su PA nell'uomo e cellule GH3 hanno dimostrato un'importante *downregulation* di miR-23b-5p, ed il conseguente incremento dell'espressione del suo gene target HMGA2 (High Mobility Group AT-Hook 2) correlava con dimensioni tumorali, invasività e più elevato indice Ki-67 nei PA [42].

In conclusione, abbiamo rilevato la *downregulation* di 17 miRNA in PA in confronto al tessuto ipofisario sano, ed un differente profilo di espressione dei miRNA in relazione allo stato funzionale degli adenomi, suggerendo che i miRNA hanno un ruolo nella fisiopatologia e nell'espressione clinica dei PA. Il differente profilo di espressione dei miRNA può essere utile nel predire il comportamento aggressivo dei PA.

## **CONCLUSIONI GENERALI**

Le evidenze che emergono da questi due studi sottolineano come una gran parte delle alterazioni genetiche presenti nei PA dipenda da modificazioni nello stato di metilazione di determinati geni o nella differente espressione dei miRNA. Questo si traduce in una importante variabilità del comportamento clinico e conseguentemente della prognosi. Diventa quindi d'obbligo per il prossimo futuro continuare ad approfondire questi aspetti della fisiopatologia ipofisaria, che necessitano di essere tradotti in strumenti utili per rendere sempre più personalizzata ed efficiente la terapia di queste patologie, rare ma di grande impatto sulla qualità di vita e la mortalità dei pazienti che ne sono affetti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med* 2020; 382:937-950.
2. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol* 2017; 134:521–535.
3. Raverot G, Burman P, McCormack A, Heaney A, Petersenn S, Popovic V, Trouillas J, Dekkers OM. Clinical practice guidelines for the management of aggressive pituitary tumors and carcinomas. *Eur J Endocrinol* 2018; 178(1):G1-G24.
4. Giuffrida G, Ferrà F, Laudicella R, Cotta OR, Messina E, Granata F, Angileri FF, Vento A, Alibrandi A, Baldari S, Cannavò S. Peptide receptor radionuclide therapy for aggressive pituitary tumors: a monocentric experience. *Endocr Connect* 2019 May 1;8(5):528-535.
5. Korbonits M, Kumar AV. AIP Familial Isolated Pituitary Adenomas. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020 [updated 2020 Apr 16].
6. Thakker RV, Newey PG, Walls GV, Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, Melmed S, Sakurai A, Tonelli F, Brandi ML. Clinical Practice Guidelines for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(9):2990–3011.
7. Hauser BM, Lau A, Gupta S, Bi WL, Dunn IF. The epigenomics of pituitary adenoma. *Front Endocrinol* 2019; 10:290.
8. Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *Plos One* 2013; 8(12):e82619.

9. Ma HS, Wang EL, Xu WF, Yamada S, Yoshimoto K, Qian ZR, et al. Overexpression of DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A) is associated with aggressive behavior and hypermethylation of tumor suppressor genes in human pituitary adenomas. *Med Sci Monit* 2018; 24:4841–50.
10. Dudley KJ, Revill K, Whitby P, Clayton RN, Farrell WE. Genomewide analysis in a murine Dnmt1 knockdown model identifies epigenetically silenced genes in primary human pituitary tumors. *Mol Cancer Res USA* 2008; 6:1567-1574.
11. Ling C, Pease M, Shi L, Punj V, Shiroishi MS, Commins D, et al. A pilot genome-scale profiling of DNA methylation in sporadic pituitary macroadenomas: association with tumor invasion and histopathological subtype. *PLoS ONE* 2014; 9:e96178.
12. <https://it.wikipedia.org/wiki/MicroRNA> (consultato il 06/07/2020).
13. Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma* 2009; 50(3):506–509.
14. Nadhamuni VS, Korbonits M. Novel insights into pituitary tumorigenesis: genetic and epigenetic mechanisms. *Endocr Rev* 2020; 41(6):bnaa006.
15. Duong CV, Emes RD, Wessely F, Yacub-Usman K, Clayton RN, Farrell WE. Quantitative, genome-wide analysis of the DNA methylome in sporadic pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19:805-816.
16. Gu Y, Zhou X, Hu F, Yu Y, Xie T, Huang Y, et al. Differential DNA methylome profiling of nonfunctioning pituitary adenomas suggesting tumour invasion is correlated with cell adhesion. *J Neurooncol* 2016; 129:23–31.

17. Beylerli O, Gareev I, Pavlov V, Chen X, Zhao S. The Role of Long Noncoding RNAs in the Biology of Pituitary Adenomas. *World Neurosurg* 2020; 137:252-256.
18. Gejman R, Batista DL, Zhong Y, Zhou Y, Zhang X, Swearingen B et al. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10):4119-25.
19. Wikipedia (<https://en.wikipedia.org/wiki/C7orf50>); consultato il 12/08/2020.
20. Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, Safe S. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23(6):1843–1855.
21. Hartmann S, Szaumkessel M, Salaverria I, Simon R, Sauter G, Kiwerska K et al. Loss of protein expression and recurrent DNA hypermethylation of the GNG7 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Appl Genetics* 2012; 53:167–174.
22. Xu S, Zhang H, Liu T, Chen Y, He D, Li L. G Protein  $\gamma$  subunit 7 loss contributes to progression of clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Physiol* 2019; 234:20002–20012.
23. Nalesnik MA, Tseng G, Ding Y, Xiang GS, Zheng Z, Yu YP et al. Gene Deletions and Amplifications in Human Hepatocellular Carcinomas. *Am J Pathol* 2012; 180(4):1496-1508.
24. Gitik M, Holliday ED, Leung M, Yuan Q, Logue SF, Tikkanen R et al. Choline ameliorates adult learning deficits and reverses epigenetic modification of chromatin remodeling factors related to adolescent nicotine exposure. *Neurobiol Learn Mem* 2018; 155:239-248.

25. Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, Beckers A. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. *Horm Res* 2007; 68:195–198.
26. Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *J Neurosurg* 2011; 114:336–344.
27. Caro DBD, Solari D, Pagliuca F et al. Atypical pituitary adenomas: clinical characteristics and role of Ki-67 and p53 in prognostic and therapeutic evaluation. A series of 50 patients. *Neurosurg Rev* 2016; 40:105–114.
28. Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas—data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun* 2015; 3:50.
29. Saeger W, Petersenn S, Schöfl C et al. Emerging histopathological and genetic parameters of pituitary adenomas: clinical impact and recommendation for future WHO classification. *Endocr Pathol* 2016; 27:115–122.
30. Robertson AM, Heaney AP. Molecular markers in pituitary tumors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016; 23:324–330.
31. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431:350–355.
32. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:592–601.
33. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302:1–12.
34. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016; 1:15004.
35. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: key paradigms in molecular therapy. *Oncol Lett* 2018; 15:2735–2742.

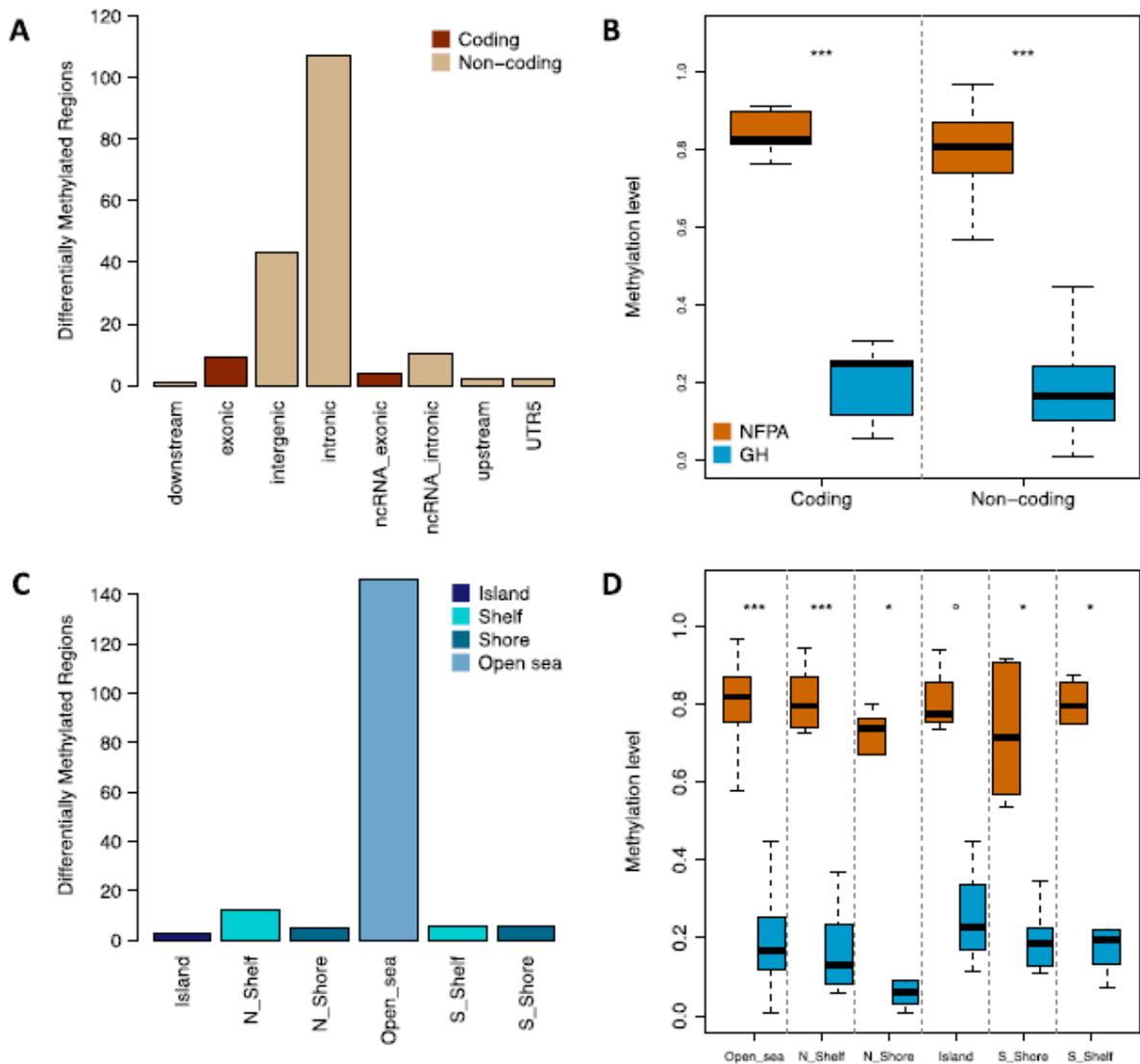
36. Feng Y, Mao ZG, Wang X et al. MicroRNAs and target genes in pituitary adenomas. *Horm Metab Res* 2018; 50:179–192.
37. Ruggeri RM, Costa G, Simone A et al. Cell proliferation parameters and apoptosis indices in pituitary macroadenomas. *J Endocrinol Invest* 2012; 35:473–478.
38. Bustin SA, Benes V, Garson J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods* 2013; 10:1063–1067.
39. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
40. Bottoni A, Ferracin M, Tagliati F et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 2007; 210:370–377.
41. D’Angelo D, Palmieri D, Mussnich P et al. Altered micro-RNA expression profile in human pituitary GH adenomas: downregulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:e1128–e1138.
42. Gadelha MR, Kasuki L, Dènes J, Trivellin G, Korbonits M. MicroRNAs: suggested role in pituitary adenoma pathogenesis. *J. Endocrinol. Invest* 2013; 36:889–895.
43. Mao ZG, He DS, Zhou J et al. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2010; 5:79.
44. Trivellin G, Butz H, Delhove J et al. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303:E708–E719.
45. Williams M, Cheng YY, Blenkiron C, Reid G. Exploring mechanisms of MicroRNA downregulation in cancer. *MicroRNA* 2017; 6:2–16.

46. Robbins HL, Hague A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 6:188.
47. Trovato M, Torre ML, Ragonese M et al. HGF/c-met system targeting PI3K/AKT and STAT3/phosphorylated-STAT3 pathways in pituitary adenomas: an immunohistochemical characterization in view of targeted therapies. *Endocrine* 2013; 44:735–743.
48. Cannavo S, Trimarchi F, Ferrau F. Acromegaly, genetic variants of the aryl hydrocarbon receptor pathway and environmental burden. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 457:81–88.
49. Cannavo S, Ragonese M, Puglisi S et al. Acromegaly is more severe in patients with AHR or AIP gene variants living in highly polluted areas. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:1872–1879.
50. Ferrau F, Romeo PD, Puglisi S et al. GSTP1 gene methylation and AHR rs2066853 variant predict resistance to first generation somatostatin analogs in patients with acromegaly. *J Endocrinol Invest* 2019; 42:825–831.
51. Cannavo S, Ferrau F, Ragonese M et al. Increased frequency of the rs2066853 variant of aryl hydrocarbon receptor gene in patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 81:249–253.
52. Zhenye L, Chuzhong L, Youtu W. The expression of TGF- $\beta$ 1, Smad3, phospho-Smad3 and Smad7 is correlated with the development and invasion of nonfunctioning pituitary adenomas. *J Transl Med* 2014; 12:71.
53. Tzeng HT, Wang YC. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J Biomed Sci* 2016; 23:70.
54. Vazquez-Martinez R, Martinez-Fuentes AJ, Pulido MR et al. Rab18 is reduced in pituitary tumors causing acromegaly and its overexpression reverts growth hormone hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:2269–2276.

55. He Z, Chen L, Hu X, Tang J et al. Next-generation sequencing of microRNAs reveals a unique expression pattern in different types of pituitary adenomas. *Endocr J* 2019; 66:709–722.
56. Fukumoto I, Hanazawa T, Kinoshita T et al. MicroRNA expression signature of oral squamous cell carcinoma: functional role of microRNA-26a/b in the modulation of novel cancer pathways. *Br J Cancer* 2015; 112:891–900.
57. Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M et al. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2016; 115:354–363.
58. Li Y, Sun Z, Liu B, Shan Y, Zhao L, Jia L. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2017; 8:e2892.
59. Liu YH, Li B, Meng FG, Qiu L. MiR-508-5p is a prognostic marker and inhibits cell proliferation and migration in glioma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21:76–81.
60. Chan CK, Pan Y, Nyberg K et al. Tumour-suppressor microRNAs regulate ovarian cancer cell physical properties and invasive behaviour. *Open Biol* 2016; 6:160275.
61. Jia Z, Wang K, Wang G, Zhang A, Pu P. MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting. *PLoS ONE* 2013; 8: e55008.
62. Ma Y, Zhang P, Yang J, Liu Z, Yang Z, Qin H. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *Int J Cancer* 2012; 130:2077–2087.
63. Ruan P, Tao Z, Tan A. Low expression of miR-30a-5p induced the proliferation and invasion of oral cancer via promoting the expression of FAP. *Biosci Rep* 2018; 38(1).

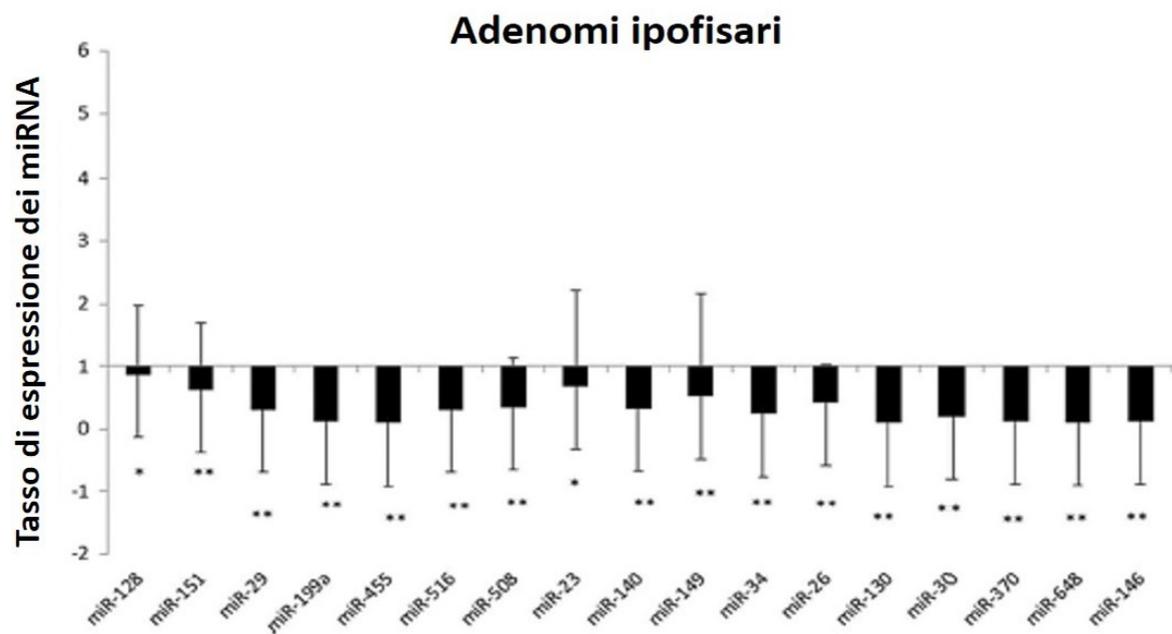


**Figura 2.** A: il grafico dimostra la differente topografia delle 178 DMR; B: confronto tra i livelli di metilazione per regioni codificanti e non codificanti in NFPA e GH-omi; C: localizzazione percentuale delle DMR nell'ambito delle regioni correlate alle isole CpG; D: confronto tra i livelli di metilazione delle stesse in NFPA e GH-omi.

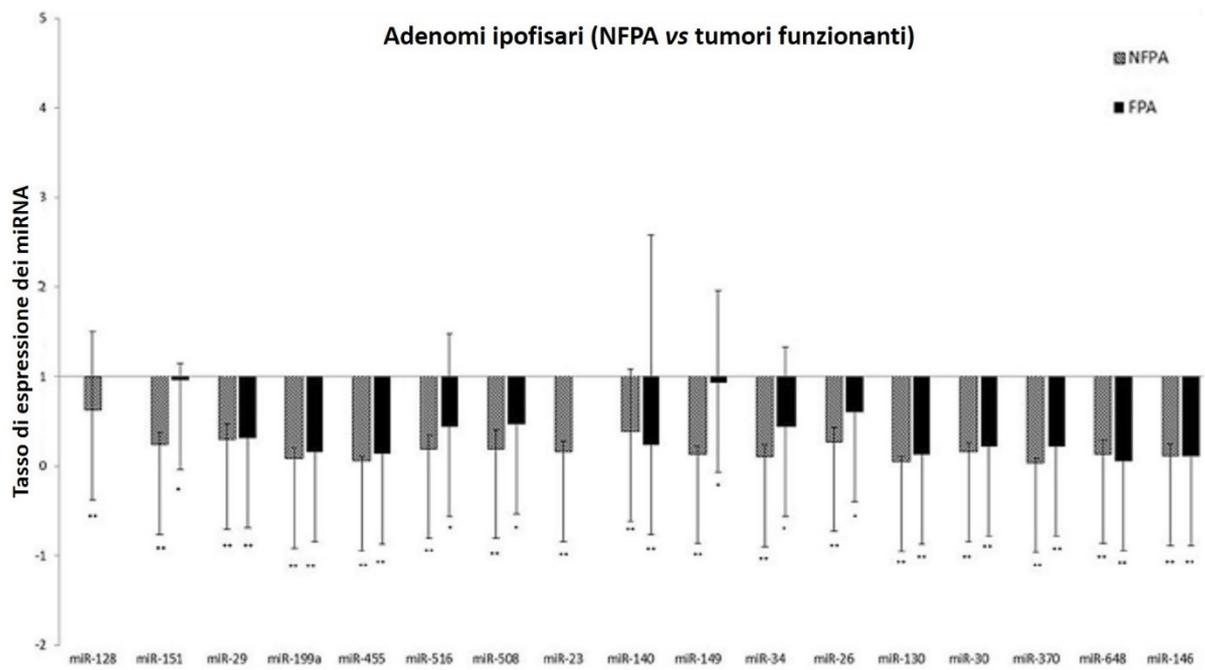


## Studio n. 2

**Figura 1.** Analisi dell'espressione dei miRNA negli adenomi ipofisari in relazione al tessuto ipofisario sano (in termini di media  $\pm$  SD), assumendo che la media dei campioni di tessuto normale fosse uguale a 1.



**Figura 2.** Analisi dell'espressione dei miRNA nei due sottogruppi (tumori non funzionanti vs ormono-secerntenti), in relazione al tessuto ipofisario sano (in termini di media  $\pm$  SD), assumendo che la media dei campioni di tessuto normale fosse uguale a 1.



## TABELLE

### Studio n. 2

Caso	Sesso	Età (aa)	Secrezione ormonale	Dimensioni tumore (dmax mm)	Invasione seno cavernoso	Chirurgie multiple	Radioterapia/radiochirurgia	Terapia farmacologica post-intervento	Immunoistochimica ormoni ipofisari	Ki-67%	p53
1	M	50	NFPA	25	Si	No	No	No	PRL+, FSH+	1	NS
2	F	56	NFPA	30	Si	No	No	No	GH+, PRL+	3	POS
3	M	43	NFPA	30	Si	No	No	No	NS	2	NS
4	F	48	NFPA	22	Si	No	No	No	PRL+, FSH+	<1	NS
5	M	72	NFPA	23	Si	No	No	No	FSH+, LH+	<1	NS
6	M	76	NFPA	24	Si	No	No	No	NS	<1	NS
7	F	43	NFPA	37	Si	Si x 3	Si	DA	NS	1	POS
8	M	55	NFPA	34	Si	Si x 2	No	No	NS	1	NS
9	M	68	NFPA	30	Si	No	No	No	NS	2	NS
10	M	53	NFPA	25	Si	No	No	No	ACTH+	2	NS
11	F	27	NFPA	22	No	No	No	No	GH+, PRL+	2	NS
12	F	71	NFPA	12	No	No	No	No	ACTH+	5	NS
13	F	47	GH-oma	10	No	No	No	No	GH+, PRL+	2	NS
14	M	58	GH-oma	22	No	No	No	OCT	GH+	1	NS
15	F	51	GH-oma	12	No	No	No	No	GH+, PRL+	3	POS
16	M	64	GH-oma	43	Si	Si x 2	Si	OCT, PAS, PEG	GH+	10	POS
17	F	48	GH-oma	11	No	No	No	OCT	GH+, PRL+	1	POS
18	F	28	ACTH-oma	14	Si	Si x 2	No	PAS, MET, DA	ACTH+	8	NS
19	M	36	ACTH-oma	40	Si	Si x 2	Si	PAS, TEM	ACTH+	8	POS
20	F	44	ACTH-oma	8	No	Si x 2	No	PAS	ACTH+	1	NS
21	M	52	PRL-oma	56	Si	Si x 3	Si	TEM, CFOS, DA	PRL+	15	POS
22	M	59	PRL-oma	20	No	No	No	No	GH+, PRL+	1	NS
23	F	37	PRL-oma	24	si	No	No	No	FSH+, LH+, PRL+	3	NS

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche, cliniche, radiologiche ed istopatologiche dei casi studiati. Le dimensioni sono espresse tramite il diametro massimo valutato alla RMN. DA: dopamino-agonisti; OCT: octreotide; PAS: pasireotide; PEG: pegvisomant; MET: metirapone; TEM: temozolomide; CFOS: ciclofosfamide. POS: positività immunoistochimica ( $\geq 10\%$  delle cellule); NS: non-staining.

miRNA (hsa-miR-)	Ciclo cellulare	Pathway di MAPK	Pathway di TGF beta	Pathway di AHR	Pathway di p53	HDAC in tumori umani	CYP 450	Pathway di apoptosi	Pathway di NF-KB	Pathway di TNF alpha	Pathway di IP3K-AKT	Pathway di <i>tight junctions</i>	Pathway di EMT	Pathway di NOTCH	Traffico di membrana	Pathway di segnale di WNT
378a-5p	CDK1				TRIAP1										MTDH	
516b-3p				AHRR				BCL2	CBLB						PCDH7	
151a-3p										RPS6KA5	PKN2; AKT3					
455-3p	TTK			AHR		HDAC2				BAG4						
29b-3p			TGFB2			HDAC4; SIRT1				TNFRSF1A						
508-5p	CHEK1; CICLINA J; TFD2						CYP3A4	FALSG; FAIM1								
199a-5p	SMAD3		TGFB2; TGFA; TGFB1; SMAD3			SIRT1		IKBKB							JAG1	
23b-5p				ARNT											CEMIP	
34b-5p	CICLINA E2													JAG1	MTDH	RAB3C
26b-5p	CDK8; TTK			ARNT2	PTEN			PAK2	PRKCD			FGF9; PTEN			MTDH	
107				AIP	TRIAP1										JAG1	
128-3p	CICLINA K		TGFBR1					CASP8		RPS6KA5						RAB8B
30a-5p	CICLINA E2, K; CDK12	MAPK1	TGFA					CASP3	CBLB						MTDH	
140-5p	SMAD3		TGFBR1; SMAD3			HDAC7		CASP3				FGF9				
711		BRAF						PAK2								WNT4
149-3p	SMAD3	MKNK2	SMAD3					FAIM2					TNS1			RAB11B
146a-5p	CICLINA J	NRAS							TRAF6					CEMIP		
130a-5p		MAPK1	TGFBR1			MDM4; PTEN						PTEN	RAP2C			RAB9B
648	RAD21					THBS1; TRIAP1										RAB8B; RAB1A
370-3p		MAP3K8					HDAC4	PIK3CA								

**Tabella 2.** MiRNA e lista dei rispettivi geni target.

## Abbreviazioni:

*MAPK* mitogen-activated protein kinase, *TGF beta* transforming growth factor beta, *AHR* Aryl hydrocarbon receptor, *p53* pathway, *HDACs* histone deacetylases, Cytochromes P450, *NF-κB* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, *TNF-ALPHA* tumor necrosis factor alpha, *PI3K-AKT* phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt, *Tight junction* tight junction and cell adhesion, *EMT* epithelial–mesenchymal transition, *NOTCH* notch signaling pathway, *WNT* wingless/integrated, *CDK1* cyclin dependent kinase 1, *TTK* TTK protein kinase, *CHEK1* checkpoint kinase 1, *CYCLIN J*, *TFDP2* transcription factor Dp-2, *SMAD3* SMAD family member 3, *CYCLIN E2*, *CDK8* cyclin dependent kinase 8, *CYCLIN K*, *CDK12* cyclin dependent kinase 12, *RAD21* RAD21 cohesin complex component, *MAPK1* mitogen-activated protein kinase 1, *BRAF* B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase, *MKNK2* MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2, *NRAS* NRAS proto-oncogene GTPase, *MAP3K8* mitogen-activated protein kinase 8, *TGFB2* transforming growth factor beta 2, *TGFA* transforming growth factor alpha, *TGFBR1* transforming growth factor beta receptor 1, *AHRR* aryl hydrocarbon receptor repressor, *AHR* aryl hydrocarbon receptor, *ARNT* aryl hydrocarbon receptor nuclear traslocator, *ARNT2* aryl hydrocarbon receptor nuclear traslocator2, *AIP* aryl hydrocarbon receptor interacting protein, *TRIAP1* TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1, *PTEN* phosphatase and tensin homolog, *MDM4* P53-binding protein, *THBS1* thrombospondin 1, *HDAC2* histone deacetylase 2, *HDAC4* histone deacetylase 4, *SIRT1* sirtuin 1, *HDAC7* histone deacetylase 7, *CYP3A4* cytochrome P450 family 3 subfamily a member 4, *BCL2* BCL2 apoptosis regulator, *FASLG* fas ligand, *FAIMI* fas apoptotic inhibitory molecule 1, *IKBKB* inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta, *PAK2* P21 (RAC1) activated kinase 2, *CASP8* caspase 8, *CASP3* caspase 3, *FAIM2* fas apoptotic inhibitory molecule 2, *PIK3CA* phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, *CBLB* cbl proto-oncogene B, *PRKCD* protein kinase C delta, *TRAF6* TNF receptor associated factor 6, *RPS6KA5* ribosomal protein S6 kinase A5, *BAG4* BCL2 associated athanogene 4, *TNFRSF1A* TNF receptor superfamily member 1A, *PKN2* protein kinase N2, *AKT3* AKT serine/threonine kinase 3, *FGF9* fibroblast A growth factor 9, *PCDH7* protocadherin 7, *TNSI* tensin1, *RAP2C* member of RAS oncogene family, *MTDH* metadherin, *CEMIP* cell migration inducing hyaluronidase 1, *JAG1* jagged 1, *RAB3C* RAB3C member RAS oncogene family, *RAB8B* RAB8B member RAS oncogene family, *RAB11B* RAB11B member RAS oncogene family, *RAB9B* RAB9B member RAS oncogene family, *RAB1A* RAB1A member RAS oncogene family, *WNT4* Wnt family member 4.

**Tabella 3.** Differente espressione dei miRNA negli adenomi ipofisari in confronto al tessuto di ipofisi sana.

Il tasso di variazione dell'espressione di ciascun miRNA è stato determinato mediante la media dei valori  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Considerato che un tasso di variazione pari a 1 corrisponde ad assenza di deregolazione, le variazioni comprese per un valore maggiore o minore di 1 suggeriscono rispettivamente una *upregulation* o *downregulation* nei tumori rispetto all'ipofisi sana. Il valore della *upregulation* è il medesimo del tasso di variazione, mentre il valore della *downregulation* è espresso come l'inverso negativo del tasso di variazione.

miRNA	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ medio $\pm$ SD, mediana, range	up- o downregulation (nr di volte)	p value
516b-3p	0.298 $\pm$ 0.467, 0.213 (0.022–2.261)	– 3356	0.002
151a-3p	0.619 $\pm$ 1.072, 0.337 (0.053–3.978)	– 1616	0.006
455-3p	0.091 $\pm$ 0.130, 0.032 (0.005–0.533)	– 10,989	0.001
29b-3p	0.304 $\pm$ 0.172, 0.252 (0.041–0.576)	– 3289	0.001
508-5p	0.351 $\pm$ 0.784, 0.019 (0.007–2.772)	– 2849	0.007
199a-5p	0.119 $\pm$ 0.148, 0.075 (0.007–0.500)	– 8403	0.001
23b-5p	0.678 $\pm$ 1.542, 0.125 (0.030–6.548)	– 1475	0.011
34b-5p	0.240 $\pm$ 0.656, 0.051 (0.007–2.981)	– 4167	0.002
26b-5p	0.416 $\pm$ 0.597, 0.312 (0.025–2.936)	– 2404	0.002
128-3p	0.875 $\pm$ 1.111, 0.424 (0.091–3.238)	– 1143	0.038
30a-5p	0.189 $\pm$ 0.122, 0.167 (0.023–0.544)	– 5291	0.001
140-5p	0.319 $\pm$ 0.536, 0.142 (0.016–2.551)	– 3135	0.002
149-3p	0.518 $\pm$ 1.630, 0.157 (0.043–7.978)	– 1931	0.002
146a-5p	0.111 $\pm$ 0.135, 0.048 (0.003–0.464)	– 9009	0.001
130a-3p	0.092 $\pm$ 0.103, 0.075(0.007–0.488)	– 10,870	0.001
648	0.104 $\pm$ 0.129, 0.043 (0.004–0.550)	– 9615	0.001
370-3p	0.107 $\pm$ 0.158, 0.039 (0.001–0.488)	– 9346	0.001
378	1.460 $\pm$ 1.535, 0.442 (0.048–4.008)	1460	0.594
107	4.492 $\pm$ 6.189, 2.454 (0.174–22.440)	4492	0.826

Caratteristiche clinico-patologiche PA	MiRNA										
	26b-5p	508-5p	30a-5p	23b-5p	199a-5p	149-3p	370-3p	128-3p	130a-3p	146a-5p	516b-3p
Immunoreattività per GH				<i>p</i> 0.020 rs0.482	<i>p</i> 0.035 rs0.440	<i>p</i> 0.020 rs0.482	<i>p</i> 0.010 rs0.592				
Immunoreattività per ACTH	<i>p</i> 0.021 rs-0.501				<i>p</i> 0.08 rs-0.540	<i>p</i> 0.027 rs-0.461					
Ki-67 ≥3%	<i>p</i> 0.031 rs-0.472										
Caratteristiche morfologiche atipiche <sup>a</sup>			<i>p</i> 0.038 rs-0.445								
Invasione del seno cavernoso			<i>p</i> 0.049 rs-0.485	<i>p</i> 0.032 rs-0.522							<i>p</i> 0.049 rs-0.484
Chirurgie multiple				<i>p</i> 0.029 rs-0.456				<i>p</i> 0.043 rs-0.512	<i>p</i> 0.028 rs0.469		
Terapie farmacologiche post-chirurgia							<i>p</i> 0.026 rs0.522		<i>p</i> 0.007 rs0.562		
Trattamento multimodale <sup>b</sup>									<i>p</i> <0.001 rs0.707	<i>p</i> 0.021 rs0.501	
Caratteristiche morfologiche atipiche <sup>a</sup> ed aggressività clinica		<i>p</i> 0.043									

PA: *pituitary adenomas*; <sup>a</sup>Ki-67 ≥3% ed immunoreattività per p53; <sup>b</sup>chirurgie multiple e radioterapia/radiochirurgia e terapia medica; <sup>c</sup> Ki-67 ≥3% ed immunoreattività per p53, e tumore con caratteristiche invasive, rapida crescita/recidiva nonostante trattamento multimodale convenzionale.

**Tabella 4.** Correlazione punto biseriale per valutare l'interdipendenza tra l'espressione dei miRNA e le caratteristiche cliniche, radiologiche ed istologiche dei PA.