



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

**Modificazioni (epi)genetiche nella fisiopatologia dei tumori ipofisari:
potenziali biomarker in ambito clinico e terapeutico**

Candidato

Dr.ssa Federica Aliquò

Tutor

Prof. Salvatore Cannavò

Cotutor

Dott. Francesco Ferrau

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.27</i>
Tabelle	<i>pag.37</i>
Figure	<i>pag.45</i>

INTRODUZIONE GENERALE

I tumori ipofisari (*pituitary tumors*, PT) rappresentano circa il 10-15% delle neoplasie intracraniche [1], e vengono classificati in base alla presenza o meno di ipersecrezione ormonale (GH, ACTH, prolattina, gonadotropine e TSH) e/o di fattori di crescita espressi da specifiche linee cellulari [2-3]. Sebbene, la maggior parte dei tumori ipofisari siano considerati dei tumori benigni (adenomi), essi possono mostrare un comportamento biologico aggressivo caratterizzato da rapida crescita, invasione delle strutture circostanti e più raramente dalla possibilità di andare incontro a metastasi (carcinomi) [4-5]. L'ipofisi rappresenta il target d'azione di diversi inquinanti ambientali, molti dei quali derivano dai processi industriali (idrocarburi non metanici, composti organici volatili, cadmio, diossine) [6]. Essi vanno a legare, attivando o bloccando, numerosi recettori nucleari endocrini agendo da interferenti e pertanto sono noti come *endocrine-disrupting compounds* (EDCs), con la capacità di perturbare l'equilibrio ormonale e di prendere parte a processi di induzione o promozione tumorale [7]. In particolare, nell'ambito della tumorigenesi ipofisaria, una stretta connessione esiste fra gli EDCs e il *pathway* molecolare di AHR (*aryl hydrocarbon receptor*).

AHR è un fattore di trascrizione ligando-dipendente implicato nella regolazione dell'espressione di enzimi che vanno a metabolizzare un gran numero di EDCs, inclusi gli idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili (PCBs), diossine che possiedono nota attività cancerogena e promuovono lo sviluppo di tumori [7-8]. Studi hanno messo in evidenza che alterazioni a carico del *pathway* di AHR possano contribuire significativamente alla tumorigenesi ipofisaria, in quanto AHR agisce come oncosoppressore nei PT [9]. Inoltre, AHR interagisce con *AIP* (*aryl hydrocarbon receptor interacting protein*) la quale è anch'essa coinvolta nella tumorigenesi ipofisaria. Mutazioni germinali a carico del gene *AIP* sono state

riscontrate nel 20% dei casi in pazienti con adenomi ipofisari familiari isolati (*familial isolated pituitary adenomas, FIPA*) caratterizzati da esordio precoce, maggiore aggressività e resistenza agli analoghi della somatostatina (SSA) [10]. Allo stesso modo, la variante rs2066853 di *AHR* risulta essere più frequente in soggetti, che vivono in aree ad alto inquinamento industriale, con tumori GH-secernenti (somatotropi) rispetto ai controlli sani e tale variante è correlata ad una maggiore invasività del tumore e al rischio di sviluppare una neoplasia secondaria [11].

Oltre ai fattori ambientali e genetici, evidenze emergenti mostrano il ruolo delle modifiche epigenetiche- che comprendono i fenomeni di metilazione, l'acetilazione degli istoni, le differenti espressioni di *long non-coding RNA* (lncRNAs) e dei microRNA (miRNAs)- in grado di influenzare il *pathway* di *AHR* e l'espressione di geni coinvolti nella tumorigenesi ipofisaria [12].

Metilazione. La metilazione è un meccanismo epigenetico che consiste nel silenziamento di determinati geni da parte delle DNA-metil-n-transferasi (DMNT) enzimi specifici che trasferiscono gruppi metilici sulle catene di DNA regolandone l'espressione genica [13]. La metilazione può avvenire in diverse regioni a livello del gene interessato e la maggior parte delle modifiche epigenetiche avviene a carico delle isole dinucleotidiche (CpG) nella regione del promotore, ma queste possono verificarsi anche a livello di regioni intergeniche e/o poste all'interno del corpo del gene. [14]. Studi hanno mostrato come la DNMT 1 e 3A, che sono diverse isoforme degli enzimi DMNT, risultano iperespresse nei PT più aggressivi, con la isoforma 1 maggiormente presente nei macroadenomi [15].

MiRNAs. I miRNAs sono molecole di RNA non codificante con una lunghezza di 20-22 paia di basi (*base pairs, bp*). Essi giocano un ruolo fondamentale a livello post- trascrizionale, legando le molecole di mRNA bersaglio e degradandole, o comportando una repressione della traduzione [16]. I miRNA sono coinvolti in differenti patologie e studi recenti hanno messo in evidenza come una deregolazione dell'espressione dei miRNA possa avere un ruolo nella fisiopatologia ipofisaria, influenzando anche il *pathway* di AHR [17].

STUDI CONDOTTI

- 1. La metilazione del gene GSTP1 e la variante rs2066853 di AHR come fattori predittivi di resistenza agli analoghi della somatostatina di prima generazione in pazienti acromegalici**
- 2. L'espressione dei microRNA nei tumori ipofisari: differenze relative allo stato funzionale, caratteristiche istologiche e comportamento clinico**

Studio n. 1

Presupposti

L'acromegalia è una rara malattia dovuta ad una ipersecrezione di GH, il cui sviluppo è anche influenzato da mutazioni genetiche, cambiamenti epigenetici e da fattori ambientali. Polimorfismi ed alterazioni epigenetiche a carico di geni implicati nella detossificazione cellulare, come *AHR* e *GSTP1* (*glutathione S-transferasi P1*), possono avere un ruolo nella fisiopatologia e nell'espressione clinica dei tumori ipofisari GH-secerenti. Tuttavia, ad oggi i dati riguardanti il background genetico di questi tumori sono ancora pochi. Pertanto, la ricerca di nuovi biomarker prognostici in grado di predirne l'outcome clinico e la risposta terapeutica sono necessari [18].

Scopi dello studio:

- Valutare il ruolo dello stato di metilazione del promotore di *GSTP1* sugli aspetti clinici e sulla risposta al trattamento con analoghi della somatostatina (SSA) in pazienti acromegalici;
- Valutare il ruolo dello stato di metilazione del promotore di *GSTP1*, da solo o in concomitanza con la presenza della variante rs2066853 di *AHR*, sugli aspetti clinici e sulla risposta al trattamento con analoghi della somatostatina (SSA) in pazienti acromegalici.

Pazienti e Metodi

Per lo studio sono stati reclutati 77 pazienti acromegalici, residenti in aree catalogate come ad alto rischio per la salute a causa di una elevata concentrazione di inquinanti industriali, ed afferiti presso l'Unità di Endocrinologia del nostro Policlinico Universitario di Messina. Un consenso informato è stato sottoposto a tutti i pazienti, e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "G. Martino".

I pazienti *wild-type* per il gene *AIP* sono stati sottoposti a screening genetico per la mutazione germinale di *AHR* rs2066853 e per la valutazione dello stato di metilazione a livello del promotore di *GSTP1*. I dati epidemiologici e clinici dei pazienti sono stati raccolti alla diagnosi. I livelli sierici di GH e IGF-1 sono stati dosati tramite kit nei laboratori del nostro Policlinico Universitario, mentre l'Unità di Neuroradiologia ha fornito i dati radiologici dei PT tra cui dimensione e invasione del seno cavernoso valutata con RMN 1.5 T pre-chirurgia. I parametri clinici e biochimici sono stati confrontati in seguito alla divisione dei pazienti in base alla presenza o meno dello stato di metilazione di *GSTP1* e della variante rs2066853 di *AHR*. Infine, abbiamo valutato la risposta al trattamento con SSA in 71 casi. Una mancata risposta alla terapia è stata determinata nei pazienti che presentavano livelli sierici di IGF-1 ≥ 1.31 x ULN basale e livelli sierici di GH >1 ng/ml dopo sei mesi di trattamento farmacologico.

Materiali e Metodi

Analisi del genotipo. Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico utilizzando il kit NucleoSpin® Blood (Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). I campioni sono stati amplificati tramite PCR per un volume totale di 25 µL. La mix per l'amplificazione comprendeva 5 µl di Taq Buffer (5X Colorless GoTaq Reaction Buffer; Promega, Madison, WI, USA), 1.25 µl di Taq polimerasi (GoTaq DNA Polymerase, Promega), 0.5 µl di dNTP Mix 10 mM (Promega) e 0.5 µl per ciascun primer alla concentrazione di 10 pmol/µl. I primer scelti sono quelli per l'esone 10 del gene *AHR*. I prodotti di PCR sono stati successivamente purificati per il sequenziamento dell'esone 10 del gene *AHR* utilizzando il kit l'Exo-Sap reaction [United States Biochemical (USB) Corporation, Cleveland, OH, USA]. Il sequenziamento bidirezionale dei prodotti purificati di PCR è stato condotto utilizzando il Bidirectional BigDye v.3.1 kit chemistry (Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA), e i campioni sono stati poi visualizzati con ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Il sequenziamento dei campioni è stato comparato con la sequenza *wild-type* sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196> (NC_00000714RefSeqGene). Infine, il polimorfismo è stato rilevato tramite il software MUTATION SURVEYOR Software v. 4.0.5 (SoftGenetics, State College, PA, USA) [14]. La metilazione a livello delle isole CpG nel promotore del gene *GSTP1* è stata valutata utilizzando il kit Ampli Set GSTP1 Promoter (Dia-chem srl., Napoli, Italy). Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico seguito dal trattamento con sodio bisolfito. Questo metodo serve a convertire le citosine non-metilate in uracile, mentre le citosine metilate rimangono invariate. Successivamente i campioni sono stati amplificati con specifici

primer per le sequenze metilate e non del promotore per il gene *GSTP1*. I prodotti di PCR sono stati infine visualizzati su gel d'agarosio.

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. Per valutare ogni associazione significativa tra lo stato di metilazione di *GSTP1* e gli altri parametri è stato applicato il test del Chi-quadro o il test di Fisher (in presenza di una frequenza minore di cinque). Il test Mann-Whitney è stato utilizzato per effettuare i confronti per tutti i parametri numerici esaminati, tra gruppo dei pazienti con o senza *GSTP1* metilato. Inoltre, sono state valutate le differenze tra quattro gruppi di pazienti, con *GSTP1* metilato, e il polimorfismo rs2066853 di *AHR* attraverso il test del Chi-quadro. Infine, le variabili numeriche tra i quattro gruppi (età alla diagnosi; diametro; livelli sierici di GH e IGF-1 alla diagnosi e durante il follow-up e la riduzione dei livelli di GH) 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. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando l'SPSS 17.0 for Windows package.

Risultati

I dati demografici, clinici e radiologici dei pazienti sono mostrati in **Tabella 1**. Il promotore di *GSTP1* risultava essere metilato in 26 pazienti (33.8%), mentre 17 presentavano la variante rs2066853 di *AHR*. La prevalenza di comorbidità e di neoplasie è stata riportata in **Fig. 1**. I pazienti con *GSTP1* metilato mostravano un'elevata prevalenza di diabete mellito ($p=0.01$), poliposi colica ($p=0.05$), una bassa prevalenza di tumore alla tiroide ($p=0.04$) e maggiore resistenza al trattamento con SSA ($p=0.02$) rispetto ai pazienti con *GSTP1* non metilato. Inoltre, i livelli sierici di IGF-1 risultavano essere significativamente più alti ($p=0.04$) dopo sei mesi di trattamento con gli SSA nei pazienti con *GSTP1* metilato rispetto agli altri (**Tabella 1**). In base allo stato di metilazione di *GSTP1* e alla presenza del polimorfismo rs2066853 di *AHR*, abbiamo identificato ben quattro gruppi: il gruppo 1 comprendeva 40 pazienti con *GSTP1* non metilato e *wild-type* per *AHR*; il gruppo 2 comprendeva 20 pazienti con *GSTP1* metilato; il gruppo 3 comprendeva 11 pazienti con la variante rs2066853 di *AHR* ed infine 6 pazienti del gruppo 4 presentavano sia *GSTP1* metilato che il polimorfismo rs2066853 di *AHR* (**Tabella 2**). Tuttavia, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa in termine di genere, età alla diagnosi, dimensione del tumore o residenza in aree altamente inquinate (**Tabella 2**).

Per quanto concerne la presenza di comorbidità, il diabete mellito di tipo 2 era più prevalente nel gruppo 2 rispetto agli altri gruppi ($p=0.02$) (**Tabella 2**). In relazione alla risposta al trattamento con SSA, il 31.6% dei pazienti del gruppo 1 mostrava resistenza al trattamento farmacologico, nel gruppo 2 il 50%, 45.5% nel gruppo 3 e il 100% nel gruppo. Infine, i pazienti del gruppo 4 mostravano livelli sierici di GH ($p=0.02$) e di IGF-1 ($p=0.02$) più alti (**Tabella 3**).

Discussione

Il ruolo delle modificazioni epigenetiche, e nello specifico della metilazione, nella genetica dei tumori ipofisari ha assunto un peso crescente negli ultimi anni mettendo in evidenza la necessità di nuovi biomarker, genetici ed epigenetici in grado di predire l'outcome clinico e la risposta terapeutica. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto dello stato di metilazione del promotore del gene *GSTPI*, in presenza o meno del polimorfismo rs2066853 di *AHR*, in pazienti acromegalici. Il polimorfismo rs2066853 del gene *AHR* è localizzato sull'esone 10 e consiste in uno SNP G>A con conseguente sostituzione amminoacidica Arg554Lys. Il ruolo di tale polimorfismo è stato riscontrato e studiato in diverse patologie, come ad esempio nel carcinoma del polmone e gioca un ruolo importante nel metabolismo estrogenico, incrementando il rischio di carcinoma mammario [19-20]. Recentemente, è stata riscontrata una correlazione tra la variante rs2066853 di *AHR*, il rischio di sviluppare gliomi e livelli elevati di PAH-DNA[21]. Un ulteriore studio ha messo in evidenza come la presenza del polimorfismo rs2066853 di *AHR* possa alterare l'espressione dell'mRNA di *AHR* stesso e del suo traslocatore nucleare (*ARNT*). Recentemente lo stesso, insieme ad altri polimorfismi a carico di geni che codificano per gli enzimi del citocromo P450 è stato identificato come biomarker di patologie correlate da inquinanti ambientali. Un terzo dei pazienti acromegalici presentava uno stato di ipermetilazione del promotore del gene *GSTPI*, che si associava alla presenza di comorbidità, quali diabete mellito, cancro del colon retto e poliposi colica, e a resistenza al trattamento farmacologico con SSA. In studi precedenti, il nostro gruppo ha dimostrato che la variante rs2066853 di *AHR* risulta essere molto più frequente negli acromegalici ed è associata ad aumentati livelli sierici di IGF-1 alla diagnosi, a tumori ipofisari più invasivi, e ad una maggiore tendenza a sviluppare neoplasie secondarie [11]. Inoltre, le

mutazioni germinali del gene *AIP* o il polimorfismo rs2066883 di *AHR* in pazienti acromegalici, che vivono in aree ad elevato inquinamento industriale, sono associati a PT di maggiori dimensioni, biologicamente aggressivi e meno responsivi alle terapie farmacologiche con SSA [10]. *GSTP1* è un enzima implicato nella detossificazione di un gran numero di composti tossici, preservando le cellule dall'azione di agenti cancerogeni e interagendo con le vie apoptotiche per la sopravvivenza cellulare. Una ipermetilazione a livello del promotore di questo gene porta ad una ridotta espressione di *GSTP1* e tale fenomeno si riscontra in numerose neoplasie, tra cui carcinoma della prostata, del polmone, mammario, del fegato e nei tumori ematologici, suggerendo che un'alterazione nell'attività di *GSTP1* abbia un ruolo nei processi oncogeni [22]. Tuttavia, ad oggi per quanto concerne i PT e in particolar modo i tumori GH-secernenti i dati relativi a *GSTP1* sono pochi. Lo studio di Yuan et al. ha evidenziato come la metilazione, con conseguente inattivazione di *GSTP1*, determinasse una maggiore aggressività biologica dei tumori ipofisari. Infatti, la metilazione a carico del promotore di *GSTP1* è stata riscontrata nel 70% dei PT e risultava essere più frequente nei tumori più invasivi (85%) [23]. Per quanto concerne altre patologie, il silenziamento epigenetico di *GSTP1* non è stato valutato nei tumori tiroidei e sono ancora esigui i dati riguardanti le varianti geniche di *GSTP1* nell'ambito dei tumori del colon-retto, dove possono influenzare la risposta al trattamento chemioterapico[24]. Nel presente studio, non è stata riscontrata alcuna correlazione tra lo stato di metilazione di *GSTP1* ed i livelli sierici di GH e IGF-1. I pazienti acromegalici che sviluppavano un carcinoma del colon non mostravano una metilazione di *GSTP1*, tuttavia la prevalenza di poliposi colica era incrementata nel gruppo con il promotore metilato. I pazienti acromegalici con una ipermetilazione a livello del promotore di *GSTP1* erano molto più resistenti agli SSA rispetto ai pazienti con *GSTP1* non metilato. Inoltre, abbiamo dimostrato che i pazienti *wild-type* per *AHR* con *GSTP1* non metilato erano molto più sensibili al trattamento con SSA, mentre i soggetti

che presentavano la variante rs2066853 di *AHR* e *GSTP1* metilato erano tutti resistenti al trattamento farmacologico.

Conclusioni

In conclusione, i dati emergenti dal nostro studio hanno ulteriormente evidenziato l'importanza delle modificazioni (epi)genetiche dei *pathway* di detossificazione cellulare nella biologia dei tumori ipofisari GH-secernenti. Infatti, i pazienti acromegalici che presentavano il promotore di *GSTP1* metilato e la concomitante presenza del polimorfismo rs2066853 di *AHR* mostravano un comportamento biologico più aggressivo caratterizzato da resistenza al trattamento farmacologico con gli analoghi della somatostatina di prima generazione ed una maggiore frequenza di comorbidità, come poliposi colica e diabete mellito. Pertanto, il nostro studio ha messo in evidenza la possibilità che la metilazione del gene *GSTP1* e la variante rs2066853 di *AHR* possano rappresentare dei fattori predittivi prognostici e terapeutici nei pazienti acromegalici, sottolineando tuttavia la necessità di proseguire la ricerca di ulteriori biomarker genetici ed epigenetici di ausilio nel management dei pazienti con acromegalia.

Studio 2

Presupposti

Gli adenomi ipofisari (PT) sono tumori benigni, sebbene in alcuni casi possano mostrare un comportamento clinicamente aggressivo caratterizzato da una rapida crescita, invasione delle strutture circostanti, possibilità di metastasi e dalla mancata risposta alle terapie convenzionali (chirurgia, radioterapia e terapie farmacologiche) [5, 25-28]. I tumori ipofisari definiti clinicamente aggressivi presentano prognosi sfavorevole e si associano ad un incremento di morbilità e mortalità [5, 27, 28]. La mancanza di marker molecolari in grado di predire il comportamento e la prognosi dei tumori ipofisari ha portato, negli ultimi anni, a rivolgere l'attenzione verso un campo di ricerca emergente costituito dalle alterazioni nell'espressione dei microRNA (miRNA) nei PT [29]. I miRNA sono molecole di RNA non codificante di circa 20-22 paia di basi, che svolgono ruoli di regolazione a livello post-trascrizionale, bloccando la traduzione o inducendo la degradazione degli mRNA dei loro geni target [16, 32]. I miRNA regolano circa più del 30% dei geni codificanti per proteine coinvolti nei più importanti processi biologici, quali metabolismo, sviluppo, proliferazione, differenziazione cellulare ed apoptosi. 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 [33]. Di conseguenza, una deregolazione nell'espressione dei miRNA può alterare questi *pathway* biologici promuovendo la tumorigenesi, agendo come oncogeni o oncosoppressori in base a determinate condizioni [34, 35]. Numerosi studi hanno dimostrato una deregolazione dell'espressione dei miRNA in diverse patologie tumorali, anche nella tumorigenesi ipofisaria [34-38].

Gli scopi di questo studio sono stati:

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

Materiali e Metodi

I campioni di tumore ipofisario sono stati ottenuti da 23 pazienti (12 M, 11 F), età media 51.6 ± 13.2 aa (range 27-76 aa) con gli adenomi ipofisari non funzionanti (NFPA, n= 12) ed ormonosecernenti (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 degli adenomi ipofisari ed invasione del seno cavernoso valutata con RMN 1.5 T pre-chirurgia) e clinici (modalità di trattamento) come esposto in **Tabella 1**.

Tutti i campioni di tumore sono stati sottoposti a valutazione istopatologica, con determinazione immunohistochemica di ormoni ipofisari (GH, ACTH, PRL, FSH, TSH), antigene tumorale p53 ed indice di proliferazione Ki-67. I controlli, per un totale di 5 campioni di ipofisi sana, sono stati ottenuti da soggetti con storia negativa per patologia ipofisaria entro le 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. 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 sono stati selezionati in seguito ad una ricerca sul database Medline (tramite l'interfaccia Pubmed). Abbiamo così 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 (**Tabella 2**). I miRNA e i controlli interni sono stati

analizzati tramite RT-qPCR in tutti i tumori ipofisari ed il tessuto ipofisario normale, secondo le linee guida MIQE [39].

Determinazione dell'espressione dei miRNA. L'RNA totale è stato estratto dai campioni di tessuto (PT e ghiandole normali), precedentemente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C, usando il kit di isolamento mirVana (Thermo Fisher Scientific, USA). Il Nano Drop ND-1000 è stato utilizzato per effettuare il controllo quali-quantitativo dell'RNA estratto dai campioni e questo è stato retrotrascritto con l'utilizzo del kit TaqMan di trascrizione inversa per miRNA (Thermo Fisher Scientific, USA). Al fine di valutare i livelli di espressione dei miRNA nei campioni di PT e nei tessuti controllo, questi sono stati amplificati 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). Per la normalizzazione dei dati con RT-qPCR è stato utilizzato l'U6 snRNA come gene *housekeeping*, come suggerito dalla Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, USA).

Analisi dei dati. L'espressione differenziale dei miRNA per ciascun campione (tumore o tessuto normale) è stata valutata attraverso il $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (39). Il tasso di variazione dell'espressione di ciascun miRNA, osservato nell'intero gruppo degli adenomi ipofisari ed in ciascun sottogruppo rispetto all'ipofisi sana è stato determinato mediante la media dei valori $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se il tasso di variazione è pari a 1, non c'è *up-* o *downregulation*. Se il tasso di variazione è maggiore o minore di 1 suggerisce rispettivamente che vi è una *upregulation* o *downregulation* nell'espressione dei miRNA nei tumori ipofisari rispetto all'ipofisi sana. Il valore della *upregulation* era il medesimo del tasso di variazione, mentre il valore della *downregulation* era l'inverso negativo.

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. I confronti per tutti i parametri numerici esaminati, tra gruppo degli adenomi ipofisari e tessuti di controllo, e tra NFPA e tumori funzionanti sono stati effettuati utilizzando il test di Mann-Whitney. Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per valutare le differenze tra i quattro sottotipi di tumori (NFPA; ACTH-omi; GH-omi e PRL-omi); 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 $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

I dati demografici, clinici, radiologici ed istologici dei 23 pazienti affetti da tumore ipofisario sono mostrati nella **Tabella 1**. Tutti i tumori, eccetto uno, erano macroadenomi con un diametro massimo variabile da 10 a 40 mm e l'invasione del seno cavernoso (di ogni grado secondo la classificazione di Knosp) era dimostrata radiologicamente in 15 pazienti su 23. 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. Prima della chirurgia, un paziente con PRL-oma era stato sottoposto a terapia farmacologica con dopamino-agonisti, sospesa diversi mesi prima dell'intervento. Alla valutazione immunohistochimica, l'indice proliferativo Ki-67 era inferiore al 3% nella maggior parte degli adenomi ipofisari (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) presentavano delle 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 i tumori ipofisari 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 risultavano essere espressi negativamente nei tumori ipofisari rispetto all'ipofisi sana (**Figura 1, Tabella 3**). In particolare, 17 dei 20 miRNA erano espressi negativamente in maniera significativa negli NFPA rispetto al

tessuto normale, mentre 15 miRNA erano espressi negativamente in maniera significativa nel sottogruppo dei tumori ipofisari secernenti (**Figura 2**). Il miR-711 risultava essere non espresso sia nel tessuto normale che né nei tumori. Inoltre, i miRNA mostravano una differente espressione nei tumori ipofisari funzionanti e negli NFPA. In particolare, i miR-149-3p (-6.823; $p=0.036$), miR130a-3p (-2.550; $p= 0.014$) e miR-370-3p (-6.140; $p=0.026$) erano espressi negativamente in maniera significativa negli NFPA rispetto ai tumori funzionanti. In quest'ultimo gruppo, i GH-omi mostravano i più alti livelli di espressione di miR-149-3p (13.285; $p=0.004$) in rapporto ai tumori non funzionanti. Nel nostro studio abbiamo effettuato l'analisi dell'espressione dei miRNA nei due sottogruppi (tumori non funzionanti vs ormono-secernenti), in relazione al tessuto ipofisario sano (in termini di media \pm SD), in quanto i dati disponibili per mostrare il tasso di espressione di ogni singolo miRNA per ciascun sottotipo di adenoma risultavano essere troppo esigui per realizzare una tabella sufficientemente esplicativa (**Figura 2**).

Inoltre, abbiamo correlato l'immunoistochimica per gli ormoni ipofisari con l'espressione dei miRNA evidenziando che l'espressione di miR-149-3p e miR-199a-5p correlava direttamente con la presenza di GH ed inversamente con quella di ACTH. I 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 di proliferazione 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 miR23b-5p correlava inversamente con l'invasione del seno cavernoso. Per quanto riguarda le modalità di trattamento, il miR-130a-3p correlava in modo diretto con chirurgie multiple, trattamento farmacologico post-chirurgia e trattamento multimodale, mentre miR-23b-5 e miR-128-3p

correlavano inversamente con chirurgie multiple. 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 rinvenuta tra l'espressione di miR-508-5p e la combinazione di caratteristiche morfologiche "atipiche" ed aggressività clinica. Infine, non vi era una correlazione significativa tra l'espressione dei miRNA ed altre caratteristiche demografiche o cliniche dei tumori ipofisari, inclusi sesso, età alla diagnosi e dimensioni del tumore. Nel nostro studio abbiamo effettuato una correlazione biseriale per valutare l'interdipendenza tra l'espressione dei miRNA e le caratteristiche cliniche, radiologiche ed istologiche dei tumori ipofisari in totale in quanto i sottotipi ACTH- e PRL-secernenti si presentavano in numero tale da non mostrare significatività dal punto di vista statistico (**Tabella 4**).

Discussione

In questo studio abbiamo valutato la differente espressione dei miRNA nei tumori ipofisari e nell'ipofisi normale. Tutti gli adenomi ipofisari 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, il 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.

Sono stati studiati 20 miRNA, noti per essere coinvolti in processi di proliferazione cellulare, apoptosi o in altri *pathway* rilevanti per la biologia dei tumori ipofisari. Ad eccezione del miR-711, tutti risultavano essere espressi sia nei tumori ipofisari che nel tessuto normale, e la maggior parte di essi mostrava una *downregulation* nei tumori rispetto all'ipofisi sana, ad eccezione di miR-107 e miR-378 che risultavano essere regolati positivamente. Queste evidenze suggeriscono che l'alterata espressione dei miRNA potrebbe avere un ruolo nella fisiopatologia dei tumori ipofisari. 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 è stata caratterizzata in diverse neoplasie maligne, ma non nel tessuto ipofisario (tumorale o sano),

dove sembrano funzionare da oncosoppressori. Nel presente studio, mostriamo la prima evidenza che i suddetti miRNA – ad eccezione di miR-378-5p–risultano essere soggetti a regolazione negativa nei tumori ipofisari. 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 [37, 40-44]. In linea con quanto presente in letteratura, abbiamo dimostrato un profilo alterato nell'espressione a livello tissutale dei miRNA che risultano essere sostanzialmente sottoposti a *downregulation* nei tumori ipofisari. Alterazioni (epi)genetiche a livello delle regioni promoter o modificazioni che avvengono direttamente a livello del processamento dei miRNA possono portare ad una riduzione di espressione dei miRNA [45]. La *downregulation* nell'espressione dei miRNA ha un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione neoplastica, in quanto i miRNA possono agire come oncosoppressori, influenzando l'espressione di vari geni target e di *pathway* di segnale oncogenici a valle. Il miR-23b-5p interagisce con *ARNT* (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) che svolge un ruolo chiave nel *pathway* di AHR. Quest'ultimo è coinvolto nei processi di detossificazione cellulare e sembra svolgere un ruolo cruciale nella fisiopatologia, nell'espressione clinica e nella risposta al trattamento dei tumori ipofisari, in particolare dei GH-omi [46- 49]. I miRNA130a-3p,151a-3p,140-5p, 26b-5p, regolano i geni target del *pathway* PI3/AKT/mTOR le cui alterazioni sono coinvolte nella patogenesi dei tumori ipofisari [50, 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 TGFβ-SMAD ed è coinvolto nello sviluppo e nell'invasività degli NFPA [52].

Abbiamo individuato una differenza di espressione tra i miRNA espressi nei tumori ipofisari secernenti e negli NFPA, dimostrando una significativa *downregulation* dei miR-149-3p, miR-

130a-3p, miR370-3p rispetto ai tumori ipofisari 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 risultava essere 13 volte più espresso nei GH-omi 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 e che sono state studiate in relazione alla secrezione ormonale nei PT [53]. Vazquez-Martinez R et al. hanno messo in evidenza come l'espressione di Rab18 risultava 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-130a3p potrebbe influenzare l'espressione dei geni target *Rab11* e *Rab9*, che codificano per GTPasi Rab, alterando i *pathway* di secrezione. Di recente uno studio in uno studio He et al. hanno valutato l'espressione dei miRNA nei tumori ipofisari funzionanti e non, riportando che i miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-378 e miR-338-5p nei PRL-omi, di miR-493-5p e miR-124-3p erano soggetti a *downregulation* negli NFPA e nei GH-omi, e la *upregulation* di miR-181b-5p e miR-184 nei medesimi sottotipi. I dati che emergono da questo studio hanno dimostrato come i miRNA siano coinvolti nella fisiopatologia dei diversi sottotipi di tumori ipofisari, suggerendone un possibile ruolo come nuovi e possibili biomarker nei tumori ipofisari [55]. Nonostante i miRNA identificati nel nostro studio siano coinvolti, direttamente o meno, nei *pathway* di proliferazione cellulare ed apoptosi, non abbiamo riscontrato un'associazione tra la loro espressione e le dimensioni tumorali dei PT.

Tuttavia, abbiamo rinvenuto un'associazione significativa tra l'espressione differenziale dei miRNA e i diversi parametri clinico-patologici di aggressività dei PT. Infatti, si è evidenziata un'associazione negativa tra l'alterata espressione di miR-26b-5p e il Ki-67, e tra l'alterata espressione di miR-30a-5p e le caratteristiche morfologiche "atipiche", così come tra miR-508-5p e la presenza di caratteristiche "atipiche" e comportamento clinico aggressivo, e tra il miR-23b-5p e l'invasione del seno cavernoso o le chirurgie multiple, suggerendo che questi specifici miRNA potrebbero predire il comportamento aggressivo dei tumori ipofisari. 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 neoplasie [56-58]. 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]. 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 [61]. Studi sui PT e studi *in vitro* su cellule GH3 hanno messo in evidenza una significativa *downregulation* di miR-23b-5p, ed il conseguente incremento dell'espressione del suo gene target *HMGA2* (*High Mobility Group AT-Hook 2*) che andava a correlare con dimensioni tumorali, invasività e più elevato indice Ki-67 nei PA [43].

Conclusioni

In conclusione, nel nostro studio abbiamo messo in evidenza che 17 miRNA risultavano essere regolati negativamente nei tumori ipofisari rispetto 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 tumori ipofisari. Tale alterazione nel profilo di espressione dei miRNA può essere utile nel predire il comportamento aggressivo dei tumori ipofisari.

CONCLUSIONI GENERALI

Le evidenze raccolte confermano la rilevanza delle modificazioni (epi)genetiche nella fisiopatologia dei tumori ipofisari. In particolare, i risultati ottenuti dal primo studio dimostrano come le alterazioni genetiche che coinvolgono i *pathways* di detossificazione cellulare, influenzano l'espressione clinica e la risposta alle terapie dei tumori ipofisari GH-secernenti. Dal secondo studio emerge come un'alterazione nel profilo di espressione dei miRNA possa influenzare le caratteristiche cliniche e il comportamento biologico degli adenomi ipofisari. Pertanto, specifiche modifiche (epi)genetiche, quali metilazione e profilo di espressione dei miRNA, possono rappresentare dei potenziali biomarker in grado di predire il comportamento clinico e l'outcome terapeutico dei tumori ipofisari. In tal senso, si rendono necessari ulteriori studi al fine di standardizzare l'impiego di questi fattori nella pratica clinica, anche in relazione ai diversi sottotipi di tumore ipofisario.

BIBLIOGRAFIA

1. Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, Beckers A. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. 2007 *Horm Res* 68:195–198.
2. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med* 2020; 382:937-950.
3. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. 2017 *Acta Neuropathol*; 134:521–535.
4. Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. 2011 *J Neurosurg* 114: 336–344.
5. Raverot G, Burman P, McCormack et.al European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. 2018 *Eur J Endocrinol* 178: G1-G24.
6. Gore AC. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. 2018 *Hormones (Athens)*. 9, 16–27.
7. Dietrich C, Kaina B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. 2010 *Carcinogenesis* 31(8):1319–1328.
8. Feng S, Cao Z, Wang X. Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. 1836 *Biochim Biophys Acta* 2:197–210.

9. Formosa R, Borg J, Vassallo J. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a potential tumour suppressor in pituitary adenomas. 2017 *Endocr Relat Cancer* 24(8):445–457.
10. 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. 2016 *J Clin Endocrinol Metab* 101(4):1872–1879.
11. Cannavo S, Ferrau F, Ragonese M, Romeo PD, Torre ML, Puglisi S, De Menis E, Arnaldi G, Salpietro C, Cotta OR, Albani A, Ruggeri RM and Trimarchi F. Increased frequency of the rs2066853 variant of aryl hydrocarbon receptor gene in patients with acromegaly. 2014 *Clin Endocrinol (Oxf)*. 81, 249-253.
12. García-Martínez A, Sottile K, Sánchez-Tejada L, Fajardo C, Cámara R, Lamas C, VM Barberá, Picó A. DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors. 2018 *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
13. Pease M, Ling C, Mack WJ et.al The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. 2013 *Plos One*; 8(12):e82619.
14. 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. 2008 *Mol Cancer Res USA*; 6:1567-1574.

15. 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. 2018 *Med Sci Monit*; 24:4841–50.
16. Feng Y, Mao ZG, Wang X et al. MicroRNAs and target genes in pituitary adenomas. 2018 *Horm Metab Res* 50:179–192.
17. Mônica R. Gadelha, Leandro Kasuki and Márta Korbonit. The genetic background of acromegaly. 2017 *Pituitary* volume 20, 0–21.
18. F. Ferraù, P. D. Romeo, S. Puglisi, M. Ragonese, F. Spagnolo, C. Salpietro, R. Ientile, M. Currò, G. Visalli, A. Alibrandi, I. A. M. Picerno, S. Cannavò. GSTP1 gene methylation and AHR rs2066853 variant predict resistance to first generation somatostatin analogs in patients with acromegaly. 2019 *J Endocrinol Invest* 42(7):825-831.
19. Chen, D., Tian, T., Wang, H. et al. (2009) Association of human aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms with risk of lung cancer among cigarette smokers in a Chinese population. *Pharmacogenetics and genomics*, 19, 25–34.

20. Sangrajrang, S., Sato, Y., Sakamoto, H. et al. (2009) Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women. *International journal of cancer*, 125, 837–843.
21. Gu, A., Ji, G., Jiang, T. et al. (2012) Contributions of aryl hydrocarbon receptor genetic variants to the risk of glioma and PAHDNA adducts. *Toxicological Sciences*, 128, 357–364
22. Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. 2014 *Front Pharmacol* 5:170.
23. Yuan Y, Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Kagawa N, Kudo E. Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas. 2008 *Mod Pathol* 2.
24. Shen X, Wang J, Yan X, Ren X, Wang F, Chen X, Xu Y (2016) Predictive value of GSTP1 Ile105Val polymorphism in clinical outcomes of chemotherapy in gastric and colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 77(6):1285–1302. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3047-1>
25. Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, Beckers A. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. 2007 *Horm Res*; 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. 2011 *J Neurosurg*; 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. 2016 *Neurosurg Rev*; 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. 2015 *Acta Neuropathol Commun*; 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. 2016 *Endocr Pathol*; 27:115–122.
30. Robertson AM, Heaney AP. Molecular markers in pituitary tumors. 2016 *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*; 23:324–330.
31. Ambros V. The functions of animal microRNAs. 2004 *Nature*; 431:350–355.
32. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. 2011 *Biochim Biophys Acta*; 1812:592–601.

33. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. 2007 *Dev Biol*; 302:1–12.
34. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. 2016 *Signal Transduct Target Ther*; 1:15004.
35. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: key paradigms in molecular therapy. 2018 *Oncol Lett*; 15:2735–2742.
36. Feng Y, Mao ZG, Wang X et al. MicroRNAs and target genes in pituitary adenomas. 2018 *Horm Metab Res*; 50:179–192.
37. Ruggeri RM, Costa G, Simone A et al. Cell proliferation parameters and apoptosis indices in pituitary macroadenomas. 2012 *J Endocrinol Invest*; 35:473–478.
38. Bustin SA, Benes V, Garson J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. 2013 *Nat Methods*; 10:1063–1067.
39. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. 2001 *Nucleic Acids Res*; 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. 2007 *J Cell Physiol*; 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. 2012 *J Clin Endocrinol Metab*; 97:e1128–e1138.
42. Gadelha MR, Kasuki L, Dènes J, Trivellin G, Korbonits M. MicroRNAs: suggested role in pituitary adenoma pathogenesis. 2013 *J. Endocrinol. Invest*; 36:889–895.
43. Mao ZG, He DS, Zhou J et al. Differential expression of microRNAs in GHsecreting pituitary adenomas. 2010 *Diagn Pathol*; 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 receptorinteracting protein in vitro. 2012 *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 303:E708– E719.
45. Williams M, Cheng YY, Blenkiron C, Reid G. Exploring mechanisms of MicroRNA downregulation in cancer. 2017 *MicroRNA*; 6:2–16.
46. Cannavo S, Trimarchi F, Ferraù F. Acromegaly, genetic variants of the aryl hydrocarbon receptor pathway and environmental burden. 2017 *Mol Cell Endocrinol*; 457:81–88.
47. 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. 2016 *J Clin Endocrinol Metab*; 101:1872–1879.

48. 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. 2019 J Endocrinol Invest; 42:825–831.
49. 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.
50. Robbins HL, Hague A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. 2016 Front Endocrinol (Lausanne); 6:188.
51. 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. 2013 Endocrine; 44:735–743.
52. Zhenye L, Chuzhong L, Youtu W. The expression of TGF- β 1, Smad3, phosphoSmad3 and Smad7 is correlated with the development and invasion of nonfunctioning pituitary adenomas. 2014 J Transl Med; 12:71.
53. Tzeng HT, Wang YC. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. 2016 J Biomed Sci; 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. 2008 *J Clin Endocrinol Metab*; 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. 2019 *Endocr J*; 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. 2015 *Br J Cancer*; 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. 2016 *Br J Cancer*; 115:354–363.
58. Li Y, Sun Z, Liu B, Shan Y, Zhao L, Jia L. Tumor-suppressive miR-26a and miR26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. 2017 *Cell Death Dis*; 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. 2017 *Eur Rev Med Pharmacol Sci*; 21:76–81.

60. Chan CK, Pan Y, Nyberg K et al. Tumour-suppressor microRNAs regulate ovarian cancer cell physical properties and invasive behaviour. 2016 *Open Biol*; 6:160275.

61. 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. 2018 *Biosci Rep*; 38(1).

TABELLE

Studio n.1

Tabella 1. Dati epidemiologici, clinici, biochimici (alla diagnosi e dopo 6 mesi di trattamento con analoghi della somatostatina) e radiologici dei pazienti acromegalici in relazione allo stato di metilazione del promotore di *GSTPI*.

	TOTALE	<i>GSTPI</i> - MET*	<i>GSTPI</i> -NON- MET#	p
N. di casi	77	26	51	-
Femmine/maschi	64.9/35.1%	64.7/35.3%	65.4/34.6%	ns
Età alla diagnosi (anni)	47.5±12.5	44.9±11.4	48.8±12.9	ns
Diametro del tumore (mm)	15.5±11.9	18.0±18.0	14.1±6.6	ns
Invasione del seno cavernoso (grado)	36.0%	42.1%	32.2%	ns
Macroadenoma/microadenoma	66.2/33.8%	69.2/30.8%	64.7/35.3%	ns
Residenti in aree altamente inquinate[§]	18.2%	11.5%	21.6%	ns
<i>AHR</i> rs2066853 variante	22.1%	23.1%	21.6%	ns
Livello sierico di GH (basale) (ng/ml)	13.9±14.8	14.0±15.7	13.8±14.5	ns
Livello sierico di GH (6 mesi di follow-up) (ng/ml)	2.5±3.6	3.9±5.0	1.9±2.7	ns
Riduzione del livello sierico di GH % (6 mesi di follow-up)	72.7±29.9	64.4±35.4	76.4±27.0	ns
Livello sierico di IGF-1 x ULN (basale)	2.8±1.3	2.9±1.0	2.7±1.3	ns
Livello sierico di IGF-1 x ULN (6 mesi di follow-up)	1.4±1.0	1.9±1.4	1.2±0.7	0.04
Resistenza alla terapia con SSA	43.7%	63.6%	34.7%	0.02

[§] In accordo con la classificazione ufficiale da parte del Governo italiano delle aree di interesse nazionale per la presenza di inquinamento ambientale

Tabella 2. Dati epidemiologici, clinici e radiologici e la prevalenza di comorbidità dei pazienti acromegalici in relazione allo stato di metilazione del promotore di *GSTP1* e la presenza della variante germinale rs2066853 del gene *AHR*.

	Gruppo 1 AHR wild- type/ GSTP1- NON-MET	Gruppo 2 AHR wild- type/ GSTP1-MET	Gruppo 3 AHRrs2066853 ⁺ / GSTP1-NON- MET	Gruppo 4 AHRrs206685 3 ⁺ / GSTP1-MET	p
N. di pazienti	40	20	11	6	-
Femmine/maschi	65.0/35.0%	75.0/25.0%	63.6/36.4%	33.3/66.7%	ns
Età alla diagnosi (anni)	49.1±10.9	45.0±12.0	48.0±19.1	44.7±10.0	ns
Diametro del tumore (mm)	13.2±5.6	17.6±19.1	17.2±8.9	19.8±14.7	ns
Macroadenoma	62.5%	65.0%	72.7%	83.3%	ns
Residenti in aree altamente inquinate[§]	17.5%	10.0%	36.4%	16.7%	ns
Cardiomiopatia acromegalica	82.5%	73.7%	81.8%	100.0%	ns
Ipertensione	72.5%	73.7%	54.5%	66.7%	ns
Diabete mellito di tipo 2	25.0%	63.1%	45.5%	33.3%	0.02
Alterata tolleranza al glucosio	15.0%	15.8%	18.2%	33.3%	ns
Dislipidemia	42.5%	47.4%	54.5%	33.3%	ns
OSAS	52.0%	58.3%	50.0%	66.7%	ns
Cancro del colon-retto	2.5%	0%	0%	0%	ns
Tumore della tiroide	7.5%	0%	18.2%	0%	ns
Cancro della prostata	14.3%	0%	25.0%	0%	ns
Altri tumori	0%	5.0%	9.1%	16.7%	ns
Poliposi colica	25.0%	50.0%	36.4%	50.0%	ns
Adenoma surrenale	2.5%	5.0%	0%	0%	ns
Adenoma tiroideo	2.5%	15.8%	0%	0%	ns

[§] In accordo con la classificazione ufficiale da parte del Governo italiano delle aree di interesse nazionale per la presenza di inquinamento ambientale

ns: non significativo

Tabella 3. Risposta biochimica dopo 6 mesi di trattamento con SSA in pazienti acromegalici, in base allo stato di metilazione del promotore del gene *GSTP1* e la presenza della variante germinale rs2066853 del gene *AHR*.

xULN: times upper limit of normal; SSA: analoghi della somatostatina

	Gruppo 1 AHR wild type/ GSTP1- NON-MET	Gruppo 2 AHR wild type/ GSTP1-MET	Gruppo 3 AHRrs2066853⁺/ GSTP1-NON- MET	Gruppo 4 AHRrs206685 3⁺/ GSTP1-MET	p
Livello sierico di GH (basale) (ng/ml)	11.8±9.2	14.1±17.6	21.0±25.4	13.8±10.6	ns
Livello sierico di GH (6 mesi di follow-up) (ng/ml)	1.9±2.8	2.7±4.8	1.9±2.4	6.3±4.8	0.02
Riduzione del livello sierico di GH % (6 mesi di follow-up)	73.5±29.0	82.6±17.8	84.4±19.7	37.1±38.8	0.04
Livello sierico di IGF-1 x ULN (basale)	2.7±1.4	2.9±1.2	3.0±1.0	2.8±1.3	ns
Livello sierico di IGF-1 x ULN (6 mesi di follow-up)	1.2±0.6	1.5±1.2	1.5±1.1	2.8±1.6	0.02
Resistenza alla terapia con SSA	31.6%	50.0%	45.5%	100.0%	0.01

Studio n.2

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.

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

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; TFDP2						CYP3A4	FALSG; FAIM1								
199a-5p	SMAD3		TGFB2; TGFA; TGFB1; SMAD3			SIRT1		IKBKB							JAG1	
23b-5p				ARNT												CEMIP
34b-5p	CICLINA E2														JAG1	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, *FAIM1* 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, *TNS1* 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

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

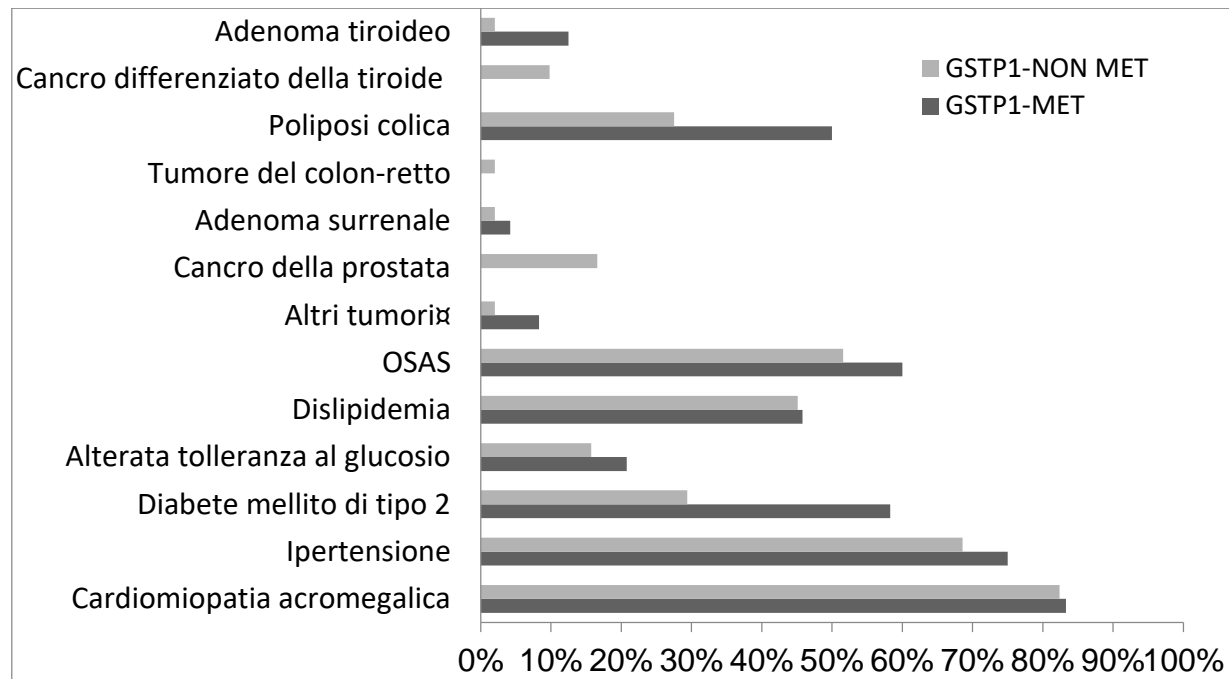
Caratteristiche clinico-patologiche PT	MiRNA										
	26b-5p	508-5p	30a-5p	23b-5p	199a-5p	149-3p	370-3p	128-3p	130a-3p	146a-5p	516b-3p
Immunoreattività per GH				<i>p</i> 0.020 rs0.482	<i>p</i> 0.035 rs0.440	<i>p</i> 0.020 rs0.482	<i>p</i> 0.010 rs0.592				
Immunoreattività per ACTH	<i>p</i> 0.021 rs-0.501				<i>p</i> 0.08 rs-0.540	<i>p</i> 0.027 rs-0.461					
Ki-67 \geq 3%	<i>p</i> 0.031 rs-0.472										
Caratteristiche morfologiche atipiche ^a			<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 ^b									<i>p</i> <0.001 rs0.707	<i>p</i> 0.021 rs0.501	
Caratteristiche morfologiche atipiche ^a ed aggressività clinica		<i>p</i> 0.043									

PT: *pituitary tumors*; ^aKi-67 \geq 3% ed immunoreattività per p53; ^bchirurgie multiple e radioterapia/radiochirurgia e terapia medica; ^c Ki-67 \geq 3% ed immunoreattività per p53, e tumore con caratteristiche invasive, rapida crescita/recidiva nonostante trattamento multimodale convenzionale.

FIGURE

Studio n.1

Figura 1. Prevalenza di comorbidità nei pazienti acromegalici con (GSTP1-metilato) o senza (GSTP1-non metilato) del promotore del gene GSTP1. OSAS sindrome delle apnee ostruttive del sonno, α carcinoma uroteliale, carcinoma gastrico, mieloma.



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.

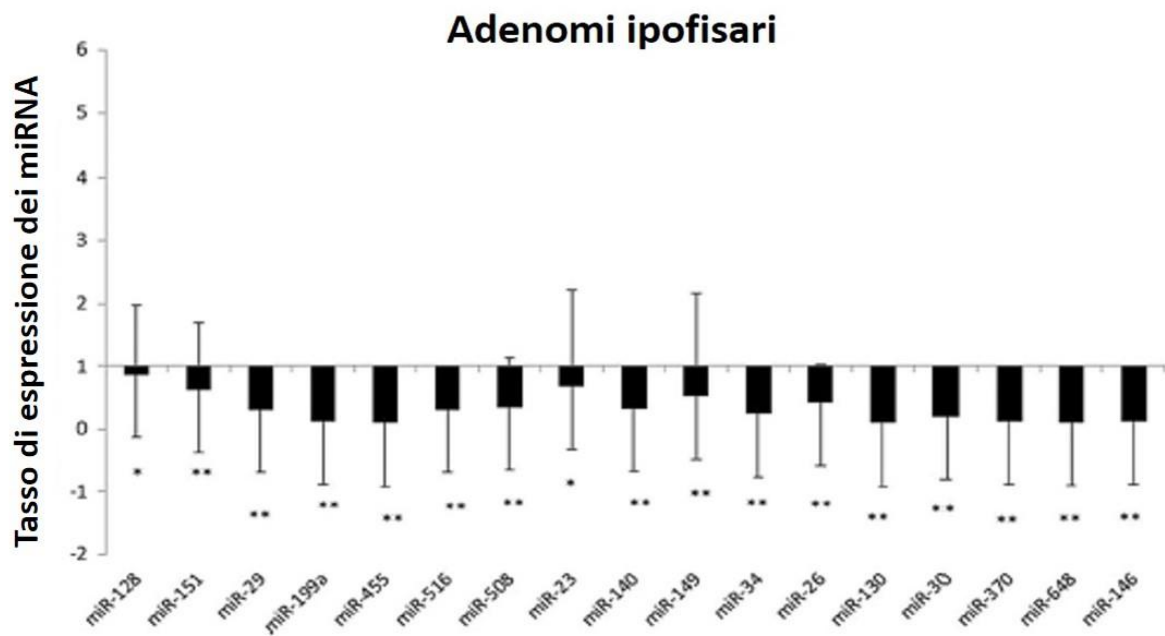


Figura 2. Analisi dell'espressione dei miRNA nei due sottogruppi (tumori non funzionanti vs ormono-secerneanti), in relazione al tessuto ipofisario sano (in termini di media \pm SD), assumendo che la media dei campioni di tessuto normale fosse uguale a 1.

