



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE  
DELLA PROGRAMMAZIONE SANITARIA

CURRICOLO: EMATOONCOLOGIA

XXIX CICLO

**IL RUOLO DELL'ANALISI MORFOLOGICA DEL RETICOLO INTERCELLULARE (THE  
'RETICULIN ALGORITHM') NEL DISTINGUERE LE FORME BENIGNE DALLE FORME  
MALIGNI DI TUMORE ADRENOCORTICALE IN ETA' PEDIATRICA.**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Carlo Giaquinto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Piergiorgio Gamba

**Dottorando :** Calogero Virgone



*Ad Anna*



## INDICE

<b>Abstract</b>	pag. 7
<b>1. Introduzione ed obiettivi</b>	pag. 9
1.1 Premessa: il progetto TREP	pag. 11
<b>2. Aspetti generali</b>	pag. 13
2.1 Epidemiologia	pag. 13
2.2 Classificazione ed istopatologia	pag. 14
2.2.1 Score prognostici in età pediatrica: lo score di Wieneke	pag. 16
2.2.2 Il 2-step Reticulin Algorithm	pag. 17
2.3 Cenni di genetica e biologia	pag. 20
2.4 Caratteristiche cliniche	pag. 26
2.4.1 Sintomi	pag. 26
2.4.2 Modalità di diffusione	pag. 28
2.4.3 Fattori prognostici	pag. 28
2.5 Stadiazione	pag. 31
2.6 Trattamento	pag. 34
<b>3. Materiali e metodi</b>	pag. 42
3.1 Aspetti clinici	pag. 42
3.2 Aspetti istopatologici	pag. 42
<b>4. Risultati</b>	pag. 44
4.1 Aspetti clinici	pag. 44
4.2 Revisione istologica e classificazione prognostica	pag. 49
<b>5. Discussione</b>	pag. 57
<b>Bibliografia</b>	pag. 64



## **ABSTRACT**

Background e obiettivi. La diagnosi istologica dei tumori adrenocorticali (ACT) in età pediatrica è difficoltosa in alcuni casi e non permette sempre agevolmente la distinzione tra forme benigne e forme maligne. Lo score di Wieneke, che permette di classificarli in tumori benigni, tumori indeterminate e tumori maligni, prevede però la valutazione di ben nove parametri istopatologici. Nei tumori corticosurrenalici dell'adulto, l'algoritmo della reticolina è stato dimostrato essere un metodo affidabile e facilmente riproducibile per la classificazione dei tumori adrenocorticali. Lo scopo di questo studio è di validare retrospettivamente l'applicazione dell'algoritmo della reticolina (RA) ad una casistica di ACT pediatrici.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 37 casi di ACT pediatrici trattati da 3 diversi centri europei: questi erano stati classificati come benigni nel 46% (17 casi), indeterminati 22% (8) e maligni 32% (12) secondo lo score di Wieneke. Tutti i casi sono stati riclassificati con il RA (maligni se all'alterazione del reticolo si associava necrosi, invasione vascolare o un'alta conta mitotica). Si è provveduto a considerare sia il cut-off degli adulti (>5/50 HPF; aRA) sia quello pediatrico (>15/20 HPF; pRA). L'alterazione del reticolo considerata era sia qualitativa sia quantitativa. Cinque patologi hanno rivisto le sezioni colorate per il reticolo ed un secondo round di revisione è stato effettuato per raggiungere un consensus sui casi discordanti.

Risultati. Il reticolo è risultato intatto in 8 casi (22%) tutti benigni anche secondo il Wieneke index. Gli altri 29 casi (78%) hanno mostrato un'alterazione del network intercellulare (quantitativi in 16 casi, qualitativi in 9 e misti in 4). Sia il Wieneke index ( $p < 0.0001$ ) sia il RA (pRA  $p = 0.0005$  e aRA  $p = 0.015$ ) hanno mostrato di associarsi all'outcome clinico. Tutti i casi indeterminati secondo Wieneke sono andati incontro ad un outcome favorevole, tranne 2 casi che risultano vivi con malattia. Il aRA distribuisce questi casi: 4 nel gruppo dei tumori benigni e 4 nel gruppo dei maligni; il pRA li classifica 5 come benigni e 3 come maligni.

Conclusioni. Il RA è un valido algoritmo prognostico per diagnosticare e stratificare gli ACT pediatrici sia nella sua versione descritta per i casi dell'adulto sia nella versione, descritta qui per la prima volta, adattata per i casi pediatrici.





## **1. INTRODUZIONE ED OBIETTIVI**

I tumori adrenocorticali sono neoplasie rare, rappresentando lo 0,2% di tutte le neoplasie pediatriche e il 5-6% dei tumori a partenza dal surrene ed hanno un'incidenza che, a livello mondiale, si attesta intorno agli 0,2 casi/1.000.000 di bambini/anno [1].

Negli adulti sono dette rare quelle neoplasie caratterizzate da un'incidenza inferiore ai 2 casi/100.000/anno, ma, considerato il fatto che l'incidenza dei tumori pediatrici è inferiore ai 15 casi/100.000/anno, tutte le neoplasie in questa fascia di età rientrerebbero nella definizione di tumore raro. Per tale motivo, gli oncologi pediatri hanno definito come tumori rari pediatrici quelle neoplasie con incidenza inferiore ai 2 casi/1.000.000 di bambini/anno.

Nell'oncologia dell'adulto si è soliti distinguere, abbastanza agevolmente, gli adenomi dai carcinomi adrenocorticali in base a diversi score prognostici istopatologici; questo non è possibile quando si considerano tali tumori nel bambino al punto che spesso solo l'andamento clinico chiarisce quale entità istologica si abbia di fronte, nonostante siano stati ideati score anatomopatologici mirati quale ad esempio lo score proposto da Wieneke nel 2003 [2,3], successivamente validato nel lavoro di Magro et coll. [4].

Questo score, che prevede la valutazione di 9 parametri microscopici e macroscopici, non risulta molto maneggevole al di fuori dei centri di riferimento ovvero quando non in mano ad un esperto patologo pediatra. Inoltre l'alta variabilità dovuta alle diverse valutazioni dei parametri microscopici da soli o combinati, lo rende di difficile ripetibilità. Per questo le ultime tendenze di ricerca, che riguardano soprattutto i tumori dell'adulto, la cui diagnosi attraverso lo score di Weiss è afflitta da problematiche molto simili, convergono verso l'identificazione di score prognostici più esili (con meno parametri) e di più facile ripetibilità. Obiettivo di questa tesi è la validazione in età pediatrica di un nuovo algoritmo prognostico anatomo-patologico proposto da un gruppo di studio sui tumori adrenocorticali dell'adulto nel 2009 [5,6] che si basa sulla valutazione delle variazioni qualitative e quantitative della membrana basale intercellulare. Tali valutazioni sono avvenute attraverso l'analisi degli aspetti clinici e istologici di un gruppo di pazienti pediatrici affetti da tumore adrenocorticale. Tale studio è multicentrico e internazionale, e si avvale della partecipazione dei centri italiani nel partecipanti al progetto TREP [7], di un centro di Oncologia Pediatrica e uno di Chirurgia Pediatrica del Regno Unito (il Royal Marsden Hospital di Sutton e il St. George's Hospital di Londra rispettivamente).

Inoltre è stata valutata la riproducibilità delle colorazioni e dell'interpretazione sulla base dell'analisi distinta due diversi gruppi di lavoro e del consensus ottenuto in fase di revisione centralizzata.

La revisione dei singoli casi e la discussione per raggiungere il consensus sono stati eseguiti centralmente con la collaborazione degli ideatori del Reticulin Algorithm: i professori Mauro Papotti e Marco Volante e la dottoressa Eleonora Duregon della Divisione di Patologia dell'Università di Torino. I due gruppi di analisi sono rappresentati dal candidato (dottor Calogero Virgone), tutorato dalla professoressa Rita Alaggio del Dipartimento di Patologia dell'Università di Padova, e dalla dottoressa E. Duregon, con la collaborazione dei professori M. Papotti e M. Volante.

## 1.1 PREMESSA: IL PROGETTO TREP

Il progetto TREP nasce sotto l'egida della SICP (Società Italiana di Chirurgia Pediatrica) e dell'AIEOP (Associazione Italiana di Ematologia Oncologia Pediatrica) nell'anno 2000 con l'intento di dare corpo ad un network nazionale dedicato ai tumori rari dell'età pediatrica [8]. Sono stati inclusi in questo studio istotipi tumorali molto rari (la cui incidenza singolarmente non supera i 2 casi /1.000.000 di bambini/anno) per i quali non esistevano protocolli di trattamento AIEOP: sono forme di rara osservazione (vere e proprie patologie "orfane") anche in Centri Oncologici specializzati, alcune rare ad ogni età, altre tipiche dell'adulto ma non del bambino, e che spesso mancano di univoci criteri diagnostici e di trattamento. Gli istotipi oggetto dello studio TREP sono elencati nella tabella I.

Questi tumori erano già stati oggetto di un'indagine conoscitiva multicentrica (studio retrospettivo AIEOP), condotta dagli stessi promotori del progetto TREP che ha portato alla raccolta dei dati di 240 pazienti affetti da tumori rari e curati nei vari Centri partecipanti tra il 1982 e il 1998.

Gli obiettivi primari dello studio sono:

- registrare i bambini affetti da neoplasia solida maligna rara in ambito nazionale;
- formulare linee guida diagnostico-terapeutiche, almeno per alcuni tipi di neoplasie rare, sulla base dell'evidenza che deriva dalla letteratura scientifica;
- valutare l'efficacia delle linee guida formulate.

Gli obiettivi secondari:

- centralizzare la diagnosi istologica per uniformare i criteri di valutazione e confrontare questi tumori con le analoghe forme dell'adulto;
- raccogliere e conservare tessuti tumorale per futuri studi di tipo biologico;
- creare un database e individuare "esperti" in tumori rari che possano fornire un servizio di consulenza per tutti i Centri che hanno in cura bambini affetti da tumore raro;
- creare degli strumenti informativi, anche utilizzando Internet, che possano dare notizie scientifiche a medici, famiglie e istituzioni;
- instaurare collaborazioni con gruppi di altri paesi interessati all'argomento.

Vengono considerati eleggibili i pazienti con:

- età compresa tra 0 e 18 anni
- diagnosi istologicamente documentata e confermata di neoplasia solida rara maligna (o a malignità intermedia). Non verranno registrati tumori già inclusi in altri protocolli AIEOP o tumori benigni (Tabella I).

**Tabella I. Istotipi tumorali compresi nel progetto TREP**

<b>Carcinoma indifferenziato del rinofaringe</b>
<b>Blastoma pleuropolmonare</b>
<b>Tumori maligni del pancreas esocrino</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>pancreatoblastoma</i></li> <li>• <i>tumore pseudopapillare solido-cistico (Frantz' tumor)</i></li> <li>• <i>carcinoma pancreatico</i></li> </ul>
<b><u>Carcinoma adrenocorticale</u></b>
<b>Tumori gonadici non germinali</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>tumori stromali dell'ovaio</i></li> <li>• <i>tumori epiteliali dell'ovaio</i></li> <li>• <i>gonadoblastoma (ovarico e testicolare)</i></li> <li>• <i>tumori stromali del testicolo</i></li> <li>• <i>tumori misti o non classificabili del testicolo</i></li> </ul>
<b>Feocromocitoma</b>
<b>Carcinoma del rene</b>
<b>Melanoma</b>
<b>Carcinoide</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>carcinoide appendicolare</i></li> <li>• <i>carcinoide bronchiale</i></li> </ul>
<b>Carcinoma della tiroide</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>ca. indifferenziato</i></li> <li>• <i>ca. midollare</i></li> </ul>
<b>Altri</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>neoplasie polmonari (PPB escluso)</i></li> <li>• <i>tumori delle ghiandole salivari</i></li> <li>• <i>Carcinoma della mammella</i></li> <li>• <i>Tumori del timo</i></li> </ul>

## **2. ASPETTI GENERALI**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA**

I tumori adrenocorticali nell'età pediatrica rappresentano lo 0,2% di tutti i tumori pediatrici e il 5-6% di tutti tumori a partenza dalla corticale del surrene [1].

La curva di incidenza in relazione all'età di insorgenza presenta due picchi: il primo di questi è situato in corrispondenza della prima decade di vita, più precisamente tra gli 0 e i 4 anni, il secondo dopo la quarta decade [9]. Analizzando più approfonditamente la frequenza di tale tumore in età pediatrica, si notano due picchi: l'incidenza raggiunge gli 0,4 casi per milione durante i primi quattro anni di vita per poi calare a 0,1 per milione fino alla tarda adolescenza, in corrispondenza della quale risale a 0,2 casi per milione [9,10]. Questa frequenza rimane costante fino alla comparsa del secondo picco di incidenza nella quarta decade di vita [10]. Considerando poi i dati provenienti da differenti regioni del mondo si evince come la frequenza non abbia grandi variazioni: si va da un dato di 0,1 casi per milione nella regione di Hong Kong agli 0,4 di Los Angeles [10].

Unica eccezione che spicca in questo panorama è rappresentata dal sud-est del Brasile, in particolar modo negli stati contigui di Paraná e Sao Paulo, dove l'incidenza raggiunge i 3,4 casi per milione all'anno [1,10,11,12].

La distribuzione per sesso indica una predilezione per il sesso femminile con un rapporto maschio/femmina variabile nelle diverse casistiche prese in esame: il rapporto varia da 1:3 dello studio retrospettivo nazionale AIEOP al 1,2:2 dell'ampia casistica di Wieneke et al. [2,13].

## 2.2 CLASSIFICAZIONE E ISTOPATOLOGIA

### **I. Tumori adrenocorticali**

*Adenoma*

*Carcinoma*

*Mielolipoma*

*Noduli corticosurrenali pseudo-tumorali*

*Altri*

### **II. Tumori della midollare del surrene**

*Feocromocitoma*

*Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma*

*Ganglioneuroma*

*Altri*

### **III. Miscellanea di lesioni tumorali e pseudo-tumorali**

*Cisti surrenaliche*

*Tumori primitivi mesenchimali o neurali (benigni e maligni)*

*Tumori metastatici*

*Altri [14]*

Microscopicamente i tumori adrenocorticali in età pediatrica variano di molto nelle dimensioni (da pochi centimetri di diametro massimo fino ad 20-25 centimetri) e nel peso (i più grossi arrivano a pesare qualche chilogrammo, mentre i più piccoli restano nell'ordine delle decine di grammi).

Microscopicamente la maggior parte di questi tumori hanno una struttura alveolare (o a nidi), diffusa (o solida), trabecolare o un insieme di tali pattern. Gli adenomi, o quelli considerati tali, più frequentemente mostrano un'architettura di tipo alveolare o a cordoni cellulari. L'iperchromasia e il pleomorfismo nucleare sono caratteristiche comuni che non variano tra i tumori benigni e quelli maligni. L'invasione capsulare è tipica dei tumori ad andamento maligno, sebbene occasionalmente possa essere riscontrata anche nei tumori benigni. Lo stesso discorso vale per le aree di necrosi: questo da solo non è un parametro dirimente per una diagnosi istologica di certezza. L'invasione dei sinusoidi da parte di propaggini del tumore può indicare la malignità della neoplasia corticosurrenalica in esame: a volte l'invasione può diffondersi lungo i vasi di calibro crescente fino alla vena cava inferiore [3]

A causa della rarità di queste neoplasie nel paziente pediatrico, è estremamente difficoltoso porre una diagnosi di certezza sulla presunta malignità o benignità del tumore sulla base delle caratteristiche morfologiche. I criteri di malignità, utilizzati dagli anatomopatologi per distinguere tra tumore surrenalico maligno e tumore surrenalico benigno, sono abbastanza precisi e affidabili se utilizzati per valutare una neoplasia dell'adulto, ma divengono inutili se si tenta di applicarli nei rari casi pediatrici.

Nel corso degli anni, nel management dei tumori adrenocorticali dell'adulto (Tabella II), sono stati messi a punto vari score prognostici: i più utilizzati sono stati quelli di Hough e coll. (1979), van Slooten e coll. (1985), Cagle (1986) e Weiss (1984 e 1989). In tali score vengono valutati soprattutto l'atipia nucleare, il numero di mitosi per HPF (high power field), le mitosi atipiche, la percentuale di cellule con citoplasma chiaro, il pattern di crescita, l'invasione vascolare, la capsula tumorale, la necrosi tumorale e le strie di fibrosi. Nella tabella II vengono considerati gli score più utilizzati oggigiorno, quelli di Hough et al. e di Weiss et al.

**Tabella II. Score prognostici per i tumori adrenocorticali dell'adulto.**

<u><b>Criterio</b></u>	<u><b>Grado</b></u>	<u><b>Houh et al. 1979</b></u>	<u><b>Weiss et al. 1989</b></u>
<b>Atipia nucleare</b>	Da moderata a severa	0.39	1
<b>Mitosi</b>	> 5/50 HPF > 10/100 HPF	0.69	1
<b>Mitosi atipiche</b>	Presenti	0.92	1
<b>Cellule chiare</b>	< 25% del volume	-	1
<b>Architettura</b>	Pattern di crescita diffuso	0.92	1
<b>Vene</b>	Invasione tumorale	0.92	1
<b>Sinusoidi</b>	Invasione tumorale	-	1
<b>Capsula tumorale</b>	Invasione tumorale	0.37	1
<b>Necrosi</b>	Presente	0.69	1
<b>Bande fibrose</b>	Presenti	1.00	1
Totale		0.17 ± 0.26 benigno 1±0.58 indeterminato 2.91 ± 0.9 maligno	1-3 benigno ≥ 4 maligno

### 2.2.1 SCORE PROGNOSTICI IN ETA' PEDIATRICA: LO SCORE DI WIENEKE

In un recente lavoro sui tumori adrenocorticali in età pediatrica [2], a causa del fatto che alcuni parametri riportati da Weiss (citoplasma eosinofilo, architettura diffusa o invasione dei sinusoidi) sono stati trovati essere meno significativi rispetto a quanto valeva nelle neoplasie dell'adulto, è stata messa a punto una lista di criteri (macroscopici e microscopici) che permetterebbe di identificare le neoplasie ad andamento più aggressivo. Attualmente questi sono i criteri con cui si cerca di classificare i tumori del corticosurrene nella pratica clinica.

Gli Autori consigliano di considerare benigni quei tumori che presentano fino a due criteri della lista, indeterminati quei tumori con tre criteri osservati e maligni tutti i tumori che abbiano quattro o più di queste caratteristiche (Tabella III).

Gli stessi Autori raccomandano però di valutare ogni singolo caso come a se stante, in quanto non sono infrequenti da trovare tumori corticosurrenali che abbiano un comportamento diverso da quello indicato da questo score system: una valutazione della prognosi che si basi su questi parametri è poco affidabile nel management del singolo paziente.

Lo score di Wieneke è stato poi utilizzato da altri autori per definire la malignità o meno di un tumore adrenocorticale: in particolare Magro e colleghi [4] hanno valutato prospetticamente una serie di tumori adrenocorticali registrati nel progetto TREP e hanno validato tale score evidenziando come fosse predittivo di un comportamento clinico aggressivo in una serie di 20 pazienti pediatrici affetti da tumore del corticosurrene.

Altri autori hanno valutato lo score di Wieneke retrospettivamente [14,15], confermandone entrambi la validità nel classificare i tumori benigni dalle controparti maligne.



**Tabella III. Criteri prognostici per i tumori adrenocorticali in età pediatrica secondo Weineke (tratto da Wieneke et al. 2003).**

<i>Criteri macroscopici e microscopici per la malignità dei tumori adrenocorticali in età pediatrica</i>
Massa tumorale > 400 grammi
Diametro massimo > 10.5 centimetri
Estensione nei tessuti molli perisurrenali e/o negli organi adiacenti
Invasione della vena cava
Invasione dei vasi
Invasione della capsula
Presenza di necrosi tumorale
> 15 mitosi per 20 HPF [high-power field (400x)]
Presenza di figure mitotiche atipiche

### 2.2.2 IL 2-STEP RETICULIN ALGORITHM

Più recentemente un algoritmo prognostico è recentemente stato proposto da Volante e Colleghi e validato in una corposa serie di tumori adrenocorticali dell'adulto [5,6].

Questo algoritmo (Figura 1) prende in considerazione la presenza di un reticolo interrotto qualitativamente o quantitativamente alterato, come maggior indicatore di malignità e, nel passaggio successivo, di almeno uno tra i seguenti parametri: conta mitotica superiore alle 5/50 HPF, presenza di necrosi (a prescindere dalla sua estensione) e/o invasione vascolare. Il reticolo o membrana basale è una struttura laminare specializzata della matrice extracellulare che fa da interfaccia tra un tessuto connettivale e un tessuto non connettivale, tipicamente epiteliali. È facilmente dimostrabile al microscopio ottico, sfruttandone la PAS-positività o l'argentaffinità.

La reticolina è una rete di fibre composta principalmente da collagene di tipo III [17,18], il cui andamento sottolinea lo stroma ghiandolare di supporto attorno ai vasi e delinea l'architettura ghiandolare [19,20].

Lo studio delle fibre reticolari mediante impregnazione argentica è utilizzato di routine nella diagnosi della patologia neoplastica dell'adenoipofisi [21] e del fegato [22].

L'algoritmo prognostico permetterebbe innanzitutto di definire come benigno o maligno un tumore adrenocorticale e successivamente di poter ulteriormente stratificare le forme maligne in 3 gruppi prognostici.

Secondo questo algoritmo i tumori adrenocorticali possono essere suddivisi in:

1 - Adenoma adrenocorticale (benigno):

- reticolo preservato
- reticolo alterato (qualitativamente o quantitativamente) senza parametri aggiuntivi

2 - Carcinoma adrenocorticale (maligno):

- reticolo alterato (qualitativamente o quantitativamente) con uno o più parametri aggiuntivi presenti.

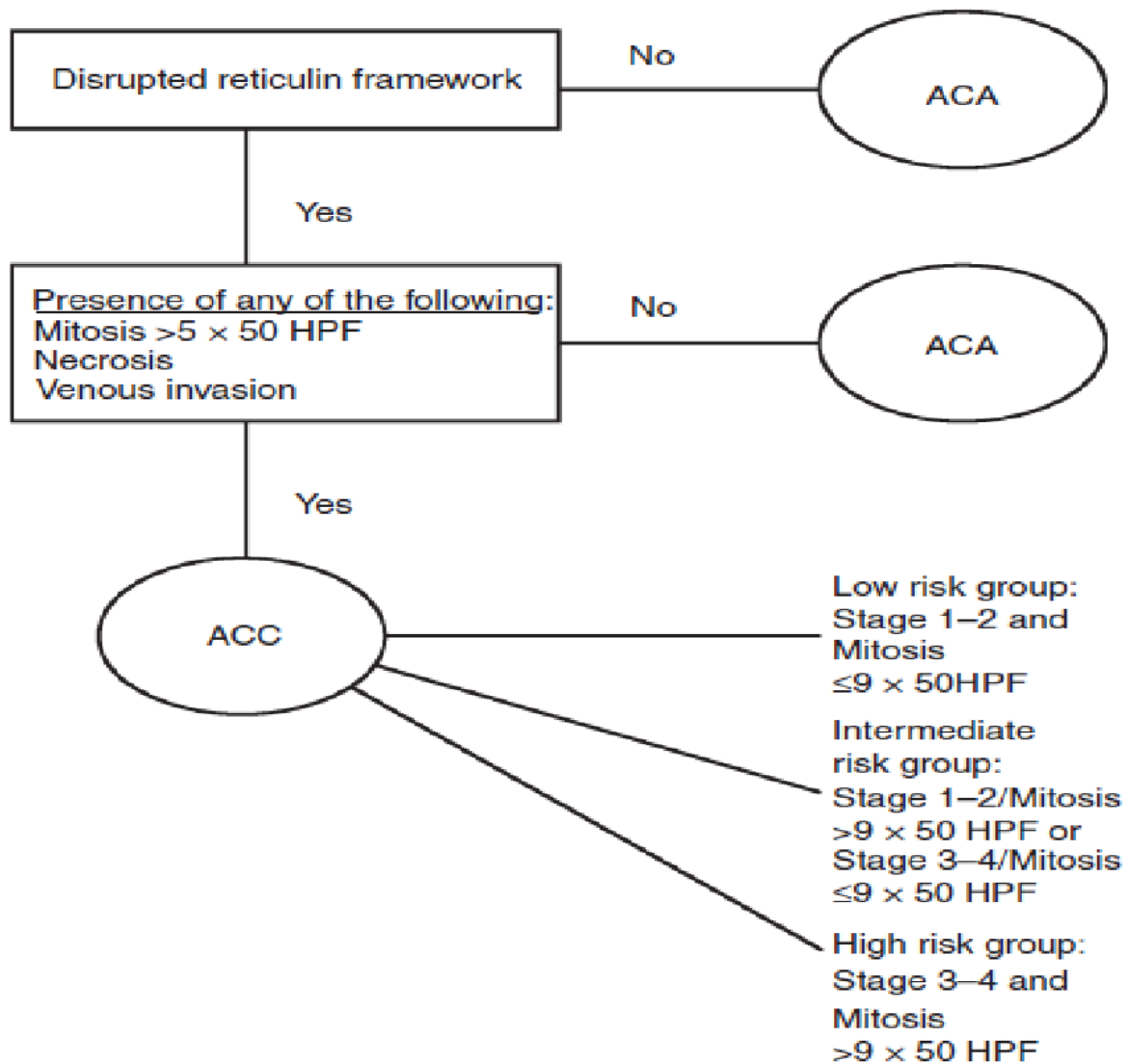
1- low risk carcinoma:  $MI \leq 9/50$  HPF e stadio I/II

2- intermediate risk carcinoma:  $MI \geq 9/50$  HPF e stadio I/II oppure  $MI \leq 9/50$  HPF e stadio III/IV

3- high risk carcinoma:  $MI \geq 9/50$  HPF e stadio III/IV

Le caratteristiche che rendono questo algoritmo prognostico interessante sono la relativa semplicità di effettuazione sia dal punto di vista tecnico sia dal punto di vista metodologico. La colorazione effettuata per evidenziare lo stato del reticolo è semplice e poco costosa e di conseguenza facilmente ripetibile in caso di inadeguatezza di una prima valutazione. In secondo luogo ne è stata dimostrata, dagli stessi autori che lo hanno proposto, l'interriproducibilità tra diversi anatomopatologi e il basso tasso di incongruenza nelle definizioni dello status del reticolo intercellulare [6].

Figura 1. Algoritmo semplificato per la diagnosi e categorizzazione dei tumori adrenocorticali mediante la valutazione del framework reticolinico (tratto da Volante et al. 2010).



### **2.3 CENNI DI GENETICA E BIOLOGIA**

In età pediatrica è necessario distinguere, tra i tumori adrenocorticali, le forme ereditarie e le forme sporadiche. Tra le prime, il tumore adrenocorticale può essere una componente principale di una sindrome o una patologia associata [23].

Ricordiamo alcuni complessi sindromici che possono includere neoplasie adrenocorticali.

a) La sindrome di Beckwith-Wiedemann è caratterizzata da macrosomia, organomegalia, macroglossia e da difetti della parete addominale (onfalocele, ernia ombelicale, diastasi dei muscoli retti). Possono inoltre essere presenti anomalie auricolari medio-lievi, nevus flammeus facciale, ipoglicemia neonatale, emiipertrofia e tumori embrionali.

L'emiipertrofia idiopatica (o emiiperplasia isolata) è anch'essa una sindrome congenita caratterizzata da sovracrescita asimmetrica di una o più parti del corpo e dall'associazione con tumori embrionali [24,25].

Entrambe queste patologie congenite sono causate da una alterazione dell'inattivazione di uno o più geni imprinted coinvolti nella regolazione della crescita [26]. Alterazione che non è causata da un cambiamento nella sequenza nucleotidica primaria ma da un'alterazione dei fenomeni epigenetici (metilazione, conformazione della cromatina e trascritti di RNA non codificante) o da alterazioni genetiche (duplicazioni, delezioni e disomia uniparentale) che modifichino il contributo degli alleli parentali [24].

Nel genoma umano i geni imprinted sono raggruppati in cluster ed uno di questi cluster si trova a livello del cromosoma 11p15.5: tali geni risultano disregolati nella sindrome di Beckwith-Wiedemann e nella emiipertrofia idiopatica (oltre che nella sindrome di Russell-Silver e nel Diabete Mellito Neonatale Transitorio) [24].

I tumori che caratterizzano o si associano a queste due sindromi, oltre a quelli del corticosurrene, sono il tumore di Wilms, l'epatoblastoma, il rhabdomyosarcoma: nella sindrome di Beckwith-Wiedemann i tumori adrenocorticali si sviluppano in circa il 15% dei bambini affetti, risultando il secondo tumore più frequente; mentre nell'ambito dei pazienti con emiipertrofia costituiscono il 20% di tutti i tumori [10].

b) Il Complesso di Carney è una particolare sindrome caratterizzata da neoplasie endocrine multiple e da fenomeni biochimici inusuali, quali l'ipersomatotropinemia cronica e una risposta paradossale di produzione di cortisolo alla somministrazione di glucocorticoidi.

Il difetto alla base di tale patologia è una mutazione a carico del gene codificante per la subunità regolatoria 1 $\alpha$  della protein chinasi A o PKA (PRKAR1A), situato sul cromosoma 17; analisi di linkage fanno supporre l'esistenza di una seconda mutazione sul cromosoma 2, che tuttavia non è ancora stata identificata con certezza [27,28].

La lesione a carico della corticale del surrene che caratterizza questa sindrome è la malattia adrenocorticale nodulare pigmentata (PPNAD) e non è ancora chiaro se queste lesioni siano ad andamento maligno o indolente [10,28].

c) La sindrome da neoplasie endocrine multiple di tipo 1 (MEN 1) ha come manifestazione comune il tumore del corticosurrene (che interessa il 9-45% dei pazienti). Generalmente sono forme benigne (nel 90% circa dei casi) che vengono diagnosticate perlopiù in età adulta, ad anni di distanza dal riscontro della sindrome [29].

Le mutazioni a carico della linea germinale del gene Menin sul cromosoma 11q13 sono raramente causa di tumori adrenocorticali in età pediatrica [10].

d) Altre rare malattie genetiche associate a lesioni della corteccia surrenale sono l'iperplasia surrenale congenita (CAH), causata nel 90% dei casi da un deficit dell'enzima 21-idrossilasi, caratterizzata da un quadro clinico severo (salt-wasting syndrome e virilizzazione in età neonatale) o un quadro subclinico più lieve; e la sindrome di McCune-Albright (displasia fibrosa poliostotica, chiazze cutanee pigmentate e abnormalità endocrinologiche). Entrambe sono caratterizzate da un quadro di iperplasia nodulare a carico delle ghiandole surrenali, in seno alla quale la trasformazione maligna è stata osservata raramente e nella sola CAH [10,23].

e) Un cenno ed un approfondimento particolare merita la sindrome di Li-Fraumeni, descritta per la prima volta nel 1969 e associata allo sviluppo di varie forme tumorali quali cancro mammario, sarcomi dei tessuti molli, tumori cerebrali, osteosarcoma, leucemie e, naturalmente, carcinoma adrenocorticale [30].

Questa sindrome, a trasmissione autosomica dominante, che spicca per la precoce insorgenza di cancro, tipicamente prima dei 45 anni, vede alla base del meccanismo patogenetico causale una mutazione del gene TP53 codificante per la p53, proteina coinvolta nel meccanismo dell'apoptosi cellulare a seguito di un esteso ed irreparabile danno a carico del DNA [30,31].

Oltre alla tipica sindrome di Li-Fraumeni (LFS), è stata descritta un'altra sindrome, Li-Fraumeni-like syndrome (LFL), che si differenzia per il tipo di tumori che affliggono i pazienti e per le differenti mutazioni a carico del gene TP53 [30].

Circa cinquanta mutazioni diverse sono state descritte a carico degli esoni del TP53; una in particolare ha un'importante ruolo patogenetico nell'insorgenza dei tumori adrenocorticali.

Varley et al. nel 1999, a seguito di studi precedenti, trovarono che più del 80% dei bambini con act e senza un'anamnesi familiare suggestiva per LFS o LFL presentavano una mutazione germinale a carico del gene TP53 [30]. Successivamente a partire da uno studio effettuato su bambini brasiliani affetti da tumore adrenocorticale, fu scoperto che la quasi totalità era portatrice di un'identica mutazione germinale del TP53 (differente da quelle trovate da Varley e colleghi) che comportava la sostituzione di un arginina in luogo di un istidina in posizione 337 (R337H), nel dominio di tetramerizzazione della p53 [32].

L'analisi delle famiglie dei pazienti non dimostrò una maggiore frequenza di cancro e portò all'ipotesi che tale mutazione fosse in qualche modo tessuto- ed età-specifica [32]. Il meccanismo di questa specificità fu chiarito da un altro studio dello stesso gruppo nel quale si appurò che la mutazione in analisi rendeva instabile la p53 solamente ad un alto ph (8.0) e tale situazione si instaura proprio nella ghiandola surrenale in corrispondenza del periodo pre- e post-natale, quando cioè essa va incontro a profondi processi di crescita e rimodellamento [33].

In uno studio ulteriore vennero chiariti ulteriori aspetti: non tutti i portatori della mutazione p53-R337H svilupparono un tumore adrenocorticale (la penetranza è stata stimata essere intorno al 9,9%) e l'età di maggior rischio era compresa tra 1 e 2 anni, confermando quindi i dati epidemiologici. Era stato visto come i tumori adrenocorticali rappresentassero il 60% dei tumori insorti nei portatori di tale mutazione: queste evidenze ponevano il problema di quali altri fattori intervenissero nella patogenesi in presenza di una mutazione germinale del gene TP53 [34].

Un ruolo, non ancora ben definito qualitativamente e quantitativamente, è stato attribuito all'uso indiscriminato di pesticidi proprio nella regione del Brasile in cui è stata identificata la mutazione e in cui la frequenza dei tumori adrenocorticali in età pediatrica è superiore alla media mondiale [1,30].

Le tappe della cancerogenesi nei tumori adrenocorticali non sono state ancora ben chiarite: si è in possesso solo di alcune evidenze genetiche o molecolari che non spiegano

del tutto le caratteristiche di tali tumori, ma che fanno intuire l'esistenza di caratteristiche uniche e peculiari rispetto ad altre forme tumorali.

Sono state inizialmente supposte alterazioni nella via ACTH-MC2R-PKA, ma non sono state trovate mutazioni del MC2R o PKA, sebbene si ipotizzi, visto l'effetto inibente sui segnali inducenti la proliferazione trasmessi attraverso altre vie, che una perdita dell'attività di tale via possa contribuire alla patogenesi tumorale [12]. Bisogna comunque notare che una delle due mutazioni alla base del complesso di Carney è a carico proprio del gene codificante per la PKA [19].

Un'evidenza che sembra essere ormai acquisita è il coinvolgimento dell'IGF-2: questa molecola ha un ruolo particolarmente attivo durante la vita fetale ed è riconosciuto dal recettore per il fattore di crescita insulinico (IGF1R), sovraespresso a livello delle cellule tumorali. Inoltre il gene che lo codifica è situato nel cromosoma 11p15, sito del quale si riscontra perdita di eterozigosità (LOH) e mutazione dell'imprinting nelle sindromi congenite da sovracrescita (BWS e HI) [12].

È stata accertato anche un ruolo della famiglia degli epidermal growth factor receptors (EGFR), sebbene non specifico, in quanto in più del 90% dei carcinomi adrenocorticali è stata dimostrata la loro espressione [12].

Studi di ibridizzazione hanno evidenziato che per la trasformazione neoplastica sono necessarie anche alterazioni genetiche e che i tumori adrenocorticali sono caratterizzati da un'alta frequenza di aberrazioni cromosomiche: nei pazienti pediatrici è frequente la perdita di eterozigosità per il cromosoma 11p15, dove oltre al gene per l'IGF-2 sono presenti anche H19, p57<sup>KIP2</sup> e H-ras ed è stata segnalata anche l'inversione inv(9)(p11q12) [23].

In letteratura viene segnalata anche una delezione a carico di 10p21 [12] e la più frequente LOH del cromosoma 2 ma l'alterazione ritenuta da tutti più importante è l'amplificazione del cromosoma 9q34 [10,23,35]. Più recentemente Latouze e colleghi hanno riportato 16 alterazioni cromosomiche significativamente ricorrenti, tra le quali le più frequenti sarebbero 4q34, 9q33-q34,19p, LOH del cromosoma 17 e del 11p15 [36].

Le aberrazioni cromosomiche sembrano inoltre essere indipendenti dalla presenza della mutazione p53-R337H o dal tipo di tumore (adenoma vs. carcinoma) [10]. Uno studio più recente ha però sottolineato come i portatori della suddetta mutazione, e di un tumore adrenocorticale, in gran parte vadano incontro alla LOH del braccio corto del cromosoma 17: LOH peraltro già identificata in numerose neoplasie. Questo studio ha inoltre sottolineato che, mentre la perdita dei cr. 2 e 11 caratterizza i tumori adrenocorticali ad

apparente comportamento benigno, la perdita dei cr. 2, 9, 11 e 17 sembra essere una peculiarità dei carcinomi e che la perdita isolata del cr. 17 non abbia alcun significato di malignità [35].

Nei portatori della mutazione p53-R337H è stato inoltre segnalato che il gene per la subunità  $\alpha$  dell'Inibina (INHA) può essere variamente coinvolto nella tumorigenesi [37].

Inoltre sono stati numerosi gli studi che hanno indagato marker biomolecolari o l'espressione genica dei tumori adrenocorticali in modo da ovviare a tali difficoltà diagnostiche. È stata ricercata la positività a diverse proteine mediante studi di immunohistochimica al fine di ottenere uno o più marker da utilizzare come indicatori del comportamento della neoplasia.

L'espressione della p53 e Ki-67 non sembrano avere un buon valore predittivo, e così la subunità  $\alpha$  dell'inibina, Melan A, Bcl-2 [1,11,38], sebbene alcuni Autori [39] portino evidenze che la presenza di Ki-67 e di mRNA istonico possa indicare il carattere carcinomatoso del tumore in esame. Nonostante sia stato tentato un approccio curativo mediante Imatinib Mesilato (Gleevec) in qualche casistica di tumori endocrini maligni resistenti alla terapia [40,41], l'espressione di c-Kit (bersaglio del suddetto anticorpo monoclonale) non è stata dimostrata con certezza nelle neoplasie originanti dalla corticale del surrene o da altre ghiandole endocrine [38,44]. Più interessante sembra la ricerca incentrata sui marcatori di metastatizzazione quali la Gelatinasi A (o MMP2) e la Metalloproteasi tipo 1, che sembrano essere espresse nei carcinomi ma non negli adenomi corticosurrenalici [43,44] e che quindi la loro presenza ne possa indicare il potenziale maligno. Inoltre è stata ampiamente esaminata la triade composta da TGF- $\alpha$ , EGF ed EGFr [45,46,47,48,49] anche in vista di un possibile sviluppo terapeutico mediante l'uso dell'anticorpo monoclonale Gefinitib (Iressa), diretto verso il dominio tirosinchinasico dell'EGFr.

Altri Autori hanno diretto il loro interesse verso l'espressione di particolari geni nei tumori adrenocorticali: è stato visto come la overexpression di SF-1 (fattore di steroidogenesi) sia tipica di questi tumori in età pediatrica [50] e indichi l'amplificazione del corrispettivo gene, mentre il gene codificante per la 3- $\beta$ -idrossidosterolo  $\Delta$ -24-reduttasi (DHCR24/seladin-1) sia significativamente meno trascritto nei carcinomi dell'adulto [51], anche se il reale significato da attribuire a queste evidenze è ancora lontano dall'essere chiarito.

Meritano di essere citati alcuni recenti studi dei microarray di cDNA del pattern di espressione genica dei tumori adrenocorticali dell'adulto [52,53] e nel paziente pediatrico



[54]: il gruppo di Slater e colleghi ha evidenziato come sia possibile la distinzione tra adenoma e carcinoma valutando l'espressione dei geni IGF2, CgB e egr1, mentre West e colleghi hanno messo in luce che un'aumentata espressione nei carcinomi adrenocorticali dei geni codificanti per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) è indice di un aumento dell'infiltrato linfocitario e, di conseguenza, della risposta immune dell'organismo contro le cellule tumorali. Una diminuita espressione di tali molecole indicherebbe, a sua volta, la potenziale malignità della neoplasia [55,56,57,58,59].

## **2.4 CARATTERISTICHE CLINICHE**

### **2.4.1 SINTOMI**

La presentazione clinica dei tumori surrenalici è abbastanza caratteristica sebbene non escluda problemi di inquadramento diagnostico o di diagnosi differenziale.

Le tre porzioni istologicamente riconoscibili (glomerulosa, fascicolata e reticolare) e le rispettive popolazioni cellulari specializzate sono deputate alla produzione di tre classi di ormoni steroidei, derivati da un unico precursore biologico: il colesterolo.

La natura endocrina degli elementi cellulari che costituiscono i tumori adrenocorticali dà infatti luogo allo sviluppo di particolari gruppi di sintomi raggruppabili in sindromi endocrine, pure o miste.

Il riscontro di tali sindromi in età pediatrica è spesso il sintomo d'esordio nei tumori della corticale del surrene; molto minore, rispetto alla popolazione adulta, è l'incidenza di incidentalomi o di tumori non secernenti che diano notizia di sé mediante sintomi aspecifici [60,61,62]. In una certa percentuale di casi non c'è la presenza di segni attribuibili all'azione di un solo ormone, bensì di due o più: in questo caso si parlerà di sindrome mista, più spesso causata dalla presenza contemporanea di sdr. di Cushing o di Conn e di sdr. virilizzante [1,2,12,63].

#### *Sindrome virilizzante*

È la presentazione più frequente nei tumori adrenocorticali in età pediatrica, sia da sola sia in associazione. Il corteo di segni e sintomi compresi sotto questa sindrome sono dovuti ad un'accentuata produzione di ormoni androgeni quali il diidroepiandrosterone e l'androstenedione, in parte convertiti perifericamente in testosterone.

Naturalmente, in relazione al fatto che l'iperincretione di tali ormoni si instauri in un paziente prepubere maschio o in una paziente prepubere femmina, sarà più opportuno parlare di pseudopubertà precoce, rispettivamente iso o eterosessuale.

In pazienti in età puberale o post-puberale è già possibile parlare di sdr. virilizzante; da sottolineare il fatto che, ovviamente, questa sarà più riconoscibile nella femmina piuttosto che nel maschio [64].

In una paziente femmina segni tipici di pseudopubertà precoce eterosessuale o di sdr. virilizzante sono irsutismo (a livello di viso, torace, areola, linea alba, interno coscia e genitali esterni), acne, ipertrofia del clitoride, aumento della velocità di crescita e dello sviluppo muscolare nel primo caso mentre nel secondo a questi segni si sommano

abbassamento della tonalità vocale, calvizie temporale, sviluppo di caratteristiche somatiche maschili, oligo/amenorrea e atrofia mammaria e uterina [65,66].

Per quanto riguarda il paziente prepubere maschio invece si hanno aumento della velocità di crescita, maturazione scheletrica e tutti cambiamenti somatici tipici della pubertà: crescita dei peli corporei, ingrossamento dei genitali, modificazione del tono della voce, aumento della muscolatura [64].

#### *Sindrome di Cushing o ipercortisolismo primitivo*

Segni e sintomi compresi in questa sindrome sono dovuti esclusivamente ad un'eccessiva presenza di glicocorticoidi: nel 15-25% dei pazienti con sdr. di Cushing la causa è stata appurata essere un'iperproduzione sostenuta da un tumore adrenocorticale [64,67,68]. Spesso i pazienti con massa surrenalica secernente presentano obesità centrale (facies lunare e gibbo di bufalo), intolleranza al glucosio, acne, irsutismo, oligo/amenorrea, ipertensione arteriosa e strie rubrae addominali. Meno spesso presentano alterazioni della psiche, del metabolismo osseo (osteoporosi) o segni di scompenso del circolo (edemi, poliuria, polidipsia) [67,69].

Ma a volte nel paziente pediatrico l'instaurarsi di una sdr. di Cushing, invece di essere rapido e ingravescente come è peculiare di una patologia neoplastica, può essere più sottile e insidioso: in questo caso si avranno sintomi vaghi quali stanchezza, ritardo di crescita e intolleranza al glucosio [67].

#### *Sindrome di Conn o iperaldosteronismo primario*

È dovuta ad un'eccessiva produzione di aldosterone da parte della cellula della glomerulosa. Il sintomo più tipico è l'ipertensione arteriosa di grado moderato non associato ad edema (per il fenomeno di "escape" dall'aldosterone), accompagnato dal riscontro laboratoristico di ipokaliemia con natremia normale o aumentata e alcalosi metabolica [64]. Altri sintomi sono cefalea secondaria all'ipertensione, poliuria e nicturia, parestesie, astenia muscolare di grado variabile [70].

Inoltre possono essere positivi segni clinici, quali quello di Chvostek e di Trousseau, correlati all'ipokaliemia e all'alcalosi e facilmente evocabili [68]. Questa sindrome è di più raro riscontro rispetto a quelle precedentemente esposte: i casi riportati in letteratura non sono più di venti [71,72,73].

### *Sindrome femminilizzante*

Ancora più raro è il riscontro di un tumore adrenocorticale come causa di sintomi quali ginecomastia e atrofia testicolare. Neppure affidandosi alla letteratura [74,75] è possibile chiarire se tale sindrome sia dovuta ad una produzione di estrogeni da parte della neoplasia [67] o ad una elevata conversione periferica di androgeni, secreti dal tumore, in estradiolo ed estrone [68].

Nel 10% dei casi la sintomatologia d'esordio non è riconducibile ad un aumento della secrezione di uno o più steroidi surrenalici, ma consiste in disturbi aspecifici quali febbre, dolore addominale, lombalgia o calo ponderale, in casi più infrequenti il paziente si presenta con i segni di un effetto massa o con il tumore palpabile all'esame obiettivo.

#### 2.4.2 MODALITA' DI DIFFUSIONE

Il carcinoma adrenocorticale può diffondersi per contiguità, per via ematica e, attraverso i vasi linfatici, fino ai linfonodi regionali.

Per quanto riguarda l'estensione loco-regionale il tumore, dopo aver superato la capsula ghiandolare, invade il grasso retroperitoneale, il rene e le strutture vascolari adiacenti, soprattutto la vena cava inferiore [2,10]: da alcuni autori [12] l'interessamento del rene viene considerato metastasi a distanza. I linfonodi regionali sono interessati successivamente, in particolare quelli retroperitoneali interaortocavali.

Nelle casistiche di pazienti adulti le metastasi a distanza più frequenti sono quelle a carico di fegato, polmoni e linfonodi e vengono riferiti anche altri siti quali peritoneo, pleura, ossa, sistema nervoso centrale, ghiandola surrenale controlaterale e rene [9,76]

Nei pazienti pediatrici, considerando le casistiche più numerose in letteratura, le metastasi a distanza interessano più comunemente fegato, polmoni e ossa [12,13,61]; anche il sistema nervoso centrale non è infrequente come sede di lesioni ripetitive, e vengono riportate anche localizzazione a pancreas e peritoneo [61].

#### 2.4.3 FATTORI PROGNOSTICI

Considerando le varie casistiche riportate in letteratura, con una numerosità superiore od uguale a 12 casi, le percentuali di sopravvivenza variano dal 46 al 84,7%. [1,2,13,61,63,77,78,79]

I fattori che sembrano avere più importanza ai fini della guarigione, universalmente riconosciuti [13,80], sono:

- exeresi chirurgica radicale
- presenza o meno di metastasi a distanza

Entrambi questi fattori sono direttamente collegati alle scarse possibilità terapeutiche oltre alla chirurgia.

In letteratura sono state effettuate varie analisi, mettendo in correlazione caratteristiche del paziente e outcome, in modo da ottenere fattori prognostici validi ai fini di un utilizzo comune nello studio di questi tumori. I risultati ottenuti dai vari Autori sono discordanti e non permettono di identificare parametri affidabili nella previsione dell'andamento clinico della patologia: ancora oggi questa previsione è affidata all'esperienza del team medico e alla valutazione "estemporanea" di ogni paziente.

Nonostante ciò tutti i fattori riportati di seguito sono quelli considerati da tutti nelle loro casistiche per la valutazione prognostica dei tumori adrenocorticali:

a) Dimensioni della massa asportata espresse in peso o volume. Storicamente questo parametro era utilizzato dopo l'exeresi per distinguere gli adenomi dai carcinomi, ma anche recentemente alcuni autori lo annoverano tra i fattori prognostici più attendibili [81,82,83]. In letteratura [1,12,63,79] sono riportati numerosi valori limite di peso e volume, al di sotto o al di sopra dei quali il tumore ha carattere benigno o maligno rispettivamente. Storicamente, le neoplasie con peso <200 gr o volume < 200 cm<sup>3</sup> o diametro massimo < 5 cm erano quelle con probabile decorso favorevole e neoplasie con peso >500 gr o volume > 500 cm<sup>3</sup> o dimensione massima > 10 cm quelle con possibile decorso sfavorevole.

b) Aspetti istologici. In età pediatrica la valutazione di queste caratteristiche non sembra essere affidabile, tanto che non sono utilizzati i vari score prognostici, sebbene alcuni autori continuino a classificare i tumori adrenocorticali con lo score di Weiss [83]. Comunque gli aspetti valutati [2,10,11,79] comprendono: necrosi (< o > 50%), pleomorfismo cellulare, atipia delle mitosi, invasione capsulare e/o vascolare, livelli di PCNA.

c) Età. Nei bambini con età inferiore ai 3 anni, sembra che il decorso possa essere più favorevole [61,63,84,85].

d) Intervallo tra inizio dei sintomi e diagnosi. Maggiore è questo intervallo, maggiori sono le probabilità che il paziente presenti un tumore in stadio localmente avanzato, più o meno operabile, o una malattia metastatica. Non tutti gli autori sono concordi nell'attribuire a questo fattore un chiaro significato prognostico: alcuni lo ritengono essenziale [13,63], altri lo hanno escluso come non significativo [61].

e) Sindrome clinica. Michalkiewicz et al. nel loro studio del 2004, hanno riscontrato che la sopravvivenza dei bambini con sintomi virilizzanti puri è migliore rispetto a quella dei pazienti con sindrome di Cushing o mista. La constatazione che i pazienti con tumore non funzionante abbiano una prognosi peggiore non è suffragata dai dati in letteratura.

f) Rottura (spillage) intraoperatoria del tumore. Questo fattore sembra essere correlato alla grandezza del tumore, in quanto tumori di dimensioni maggiori sono costituiti da zone di necrosi e tessuto friabile che favorirebbero la rottura intraoperatoria [12,63].

g) Stadio. Anche questo fattore è direttamente correlato alle dimensioni del tumore, sebbene non tutte le masse più grandi siano inoperabili o infiltranti tessuti od organi circostanti [1,2,63,82].

## **2.5 STADIAZIONE**

Attualmente per l'adulto esiste un sistema TNM della World Health Association [86] ma vengono ancora usati i criteri proposti da Brennan [87] e da McFarlane, quest'ultimo modificato successivamente da Sullivan [9] e da Lee [76] (Tabella IV).

**Tabella IV. Sistemi di stadiazione per i tumori adrenocorticali dell'adulto.**

Stadio	<i>Brennan et al. (1985)</i>	<i>Lee et al. (1995)</i>	<i>Sistema TNM (2004)</i>
<b>I</b>	Tumore < 5 cm Linfonodi negativi No invasione locale No metastasi	T1, N0, M0	T1, N0, M0
<b>II</b>	Tumore > 5 cm Linfonodi negativi No invasione locale No metastasi	T2, N0, M0	T2, N0, M0
<b>III</b>	Linfonodi positivi o invasione locale	T3-4, N0-1, M0 o T1-2, N1, M0	T1-2, N1, M0 o T3, N0, M0
<b>IV</b>	Linfonodi positivi ed invasione locale o metastasi a distanza	T1-4, N0-1, M1	T3, N1, M0 o T4, N0, M0 o T1-4, N0-1, M1

T1: tumore < 5 cm

T2: tumore > 5 cm

T3: infiltrazione ai margini degli organi circostanti

T4: infiltrazione degli organi circostanti

N1: linfonodi positivi

M1: metastasi a distanza

Per quanto riguarda il paziente pediatrico invece viene utilizzata la seguente stadiazione chirurgica, proposta inizialmente da Sandrini et al. [1] e utilizzata con piccole modifiche anche da altri autori [7,12,63] (Tabelle V, VI, VII e VIII).

Il razionale di questi criteri di stadiazione consiste nel ritenere che le dimensioni del tumore siano molto importanti nell'andamento della guarigione, indipendentemente dalle caratteristiche istologiche [12].

**Tabella V. Criteri di stadiazione secondo Sandrini et al. (1997).**

<b>I</b>	Tumore resecato completamente, volume < 200 cm <sup>3</sup> , normalizzazione dei livelli ormonali dopo la chirurgia e assenza di metastasi.
<b>II</b>	Residui microscopici, tumore > 200 cm <sup>3</sup> , rottura intraoperatoria (tumor spillage) o persistenza di valori ormonali elevati.
<b>III</b>	Residui macroscopici o tumore in operabile
<b>IV</b>	Metastasi a distanza

**Tabella VI. Criteri di stadiazione secondo Michalkiewicz et al. (2004).**

<b>I</b>	Tumore resecato completamente con margini negativi, peso ≤ 200 grammi e assenza di metastasi.
<b>II</b>	Tumore completamente resecato con margini negativi, peso > 200 g e assenza di metastasi.
<b>III</b>	Tumore residuo (residui microscopici o macroscopici) o inoperabile.
<b>IV</b>	Metastasi ematogene alla diagnosi.

**Tabella VII. Criteri di stadiazione secondo Rodriguez-Galindo et al. (2006), modificata da Sandrini et al. (1997)**

<b>I</b>	Tumore di piccole dimensioni (< 200 cm <sup>3</sup> o < 100 g) <u>e</u> totalmente resecato <u>e</u> normalizzazione dei livelli ormonali dopo la chirurgia.
<b>II</b>	Tumore di grosse dimensioni (≥ 200 cm <sup>3</sup> o ≥ 100 g) <u>o</u> rottura intraoperatoria (tumor spillage) <u>e</u> normalizzazione dei livelli ormonali dopo la chirurgia.
<b>III</b>	Tumore non resecabile o malattia residua dopo la chirurgia o persistenza di valori ormonali elevati.
<b>IV</b>	Malattia metastatica



**Tabella VIII. Stadiazione adottata nelle linee guida TREP**

<b>Stadio I</b>	Asportazione radicale del tumore e tumore di volume <200 cm <sup>3</sup> e successiva normalizzazione dei valori ormonali.
<b>Stadio II</b>	Asportazione con residui microscopici o spillage intraoperatorio (indipendentemente dal volume) o invasione dei linfonodi regionali, oppure Volume >200 cm <sup>3</sup> , oppure Persistenza di valori ormonali elevati dopo la chirurgia
<b>Stadio III</b>	Asportazione con residui macroscopici o biopsia iniziale
<b>Stadio IV</b>	Metastasi alla diagnosi

## **2.6 TRATTAMENTO**

Ancora oggi l'unico rimedio curativo dei tumori adrenocorticali sicuramente più efficace nei casi con diagnosi precoce è l'asportazione chirurgica completa. Tutti gli Autori sono concordi nel ritenere questo il metodo migliore per ottenere la guarigione o, quanto meno, una buona percentuale di sopravvivenza a lungo termine.

Negli stadi II, III e IV, in cui una chirurgia può non essere radicale, sono possibili altre opzioni terapeutiche quali la somministrazione di Mitotane, farmaco adrenolitico originariamente utilizzato come pesticida, l'utilizzo di farmaci chemioterapici ed eventualmente la radioterapia.

### Terapia chirurgica

La chirurgia delle ghiandole surrenali può oggi avvalersi sia della tecnica laparotomica sia di quella laparoscopica.

L'approccio classico della chirurgia laparotomia è quello anteriore, per la possibilità che offre di raggiungere una radicalità oncologica completa e di controllare l'estensione diretta o metastatica a organi contigui e vicini [86,87].

L'approccio anteriore nell'adulto può essere ottenuto mediante un'incisione sottocostale bilaterale (incisione di Kocher), un'incisione verticale (xifopubica) o un'incisione trasversale sovraombelicale [88], mentre nel bambino si procede sempre ad un'incisione trasversale sovraombelicale.

Un approccio posteriore può essere preso in considerazione nella chirurgia dell'adulto, quando ci si trovi di fronte a masse minori di 10 cm e di natura certamente benigna.

La resezione della massa deve avvenire con margini liberi al fine di raggiungere la radicalità oncologica: la ghiandola affetta viene solitamente asportata in toto quando il tumore, più o meno esteso, non infiltra organi o strutture contigue; in caso contrario, è necessario procedere all'asportazione "en-bloc" della massa, che può richiedere una gamma di opzioni che vanno dall'exeresi del grasso perisurrenalico alla nefrectomia [76].

Nel caso poi il tumore si estenda nella vena cava inferiore, si suggerisce di procedere ad un'incisione toracoaddominale oppure, nel caso si reperti intraoperatoriamente tale situazione, di allargare il campo chirurgico mediante toracofrenotomia, estensione mediana o sternotomia mediana [87,89]: nonostante l'invasione vascolare debba scoraggiare tentativi di exeresi completa alla diagnosi, per l'impossibilità di ottenere una radicalità, alcuni autori suggeriscono di procedere comunque all'intervento di resezione [89].

A questo proposito è stato aperto un dibattito in letteratura sull'opportunità di un intervento di debulking in pazienti con malattia localmente avanzata, tumore inoperabile o con malattia metastatica: i fautori di questo approccio aggressivo citano a loro favore il controllo che si riesce ad ottenere sull'iperincrezione ormonale dovuta alla diffusione sistemica di una neoplasia secernente [76].

Dopo l'asportazione del tumore è raccomandata la biopsia dei linfonodi regionali, al fine di stadiare in modo completo il paziente ed evitare la comparsa di recidive locoregionali o metastasi dopo una chirurgia inizialmente ritenuta completa.

Il lavoro di Schulick e Brennan del 1999 [90] dimostra un aumento della sopravvivenza nei pazienti sottoposti a seconda chirurgia sul letto tumorale e sulle metastasi e sostengono l'utilità di un atteggiamento aggressivo del chirurgo lungo tutto il decorso della malattia, pur considerando l'impatto sulla qualità della vita che interventi potenzialmente demolitivi come questi possono avere.

La surrenectomia laparoscopica, fin da quando fu introdotta da Gagner et al. nel 1992, è stata da subito utilizzata anche nella chirurgia oncologica del surrene [91]. Nel tempo sono state sviluppate diverse tecniche: quella classica transperitoneale in decubito laterale e quella con approccio retroperitoneale [92,93].

Le indicazioni sulle modalità d'uso di questa tecnica sono ancora dibattute e non emerge dai lavori presenti in letteratura un orientamento comune. Secondo alcuni autori [92], ogni tumore, anche se di natura non chiaramente benigna, può essere asportato in laparoscopia se non invade i tessuti circostanti; altri [94,95] suggeriscono la conversione ad una chirurgia "open" nel caso segni di invasione siano riscontrati all'intervento. Altri [96] escludono l'approccio laparoscopico nel sospetto di tumore maligno e, nel caso delle masse surrenaliche, la cui natura può non essere evidente al momento dell'intervento, pongono come limite oltre il quale la massa deve essere considerata maligna dimensioni di 5-6 cm [92,93,95,96]. Recentemente alcuni autori hanno riportato una maggiore incidenza di carcinosi peritoneale nei pazienti sottoposti a ad asportazione laparoscopica di un carcinoma adrenocorticale [97].

### Terapia medica

La terapia medica, sebbene poco efficace, si basa sull'impiego di Mitotane e/o di farmaci chemioterapici.

a) Il Mitotane è un agente adrenolitico, isomero dell'insetticida p,p'DDD e dalla struttura chimica simile al più noto DDT. Molti studi [98] sottolineano l'importanza del monitoraggio della concentrazione plasmatica di questo farmaco sia per controllarne l'effetto terapeutico sia per prevenire i numerosi effetti collaterali e l'insufficienza surrenalica [76,87,98].

L'utilizzo dell'o,p'DDD o Mitotane [1,1 dicloro-2(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano] nella terapia dei carcinomi adrenocorticali, risale al 1959, quando Bergenstal et al. lo usarono con discreto successo, ottenendo la regressione delle metastasi in 7/18 pazienti e la riduzione degli steroidi ematici in altri 7.

Dai dati della letteratura, la concentrazione plasmatica ottimale è compresa tra i 14 e i 20 mg/l o µg/mL; inoltre il farmaco si dimostra particolarmente efficace se utilizzato come terapia a lungo termine per la sua lunga emivita.

La sua reale capacità di indurre regressione o remissione nella malattia metastatica o localmente avanzata rimane ancora oggetto di controversie tra i vari Autori.

Uno studio retrospettivo inglese [60] riporta una risposta a questo farmaco in un terzo circa dei pazienti non eleggibili alla chirurgia; tuttavia alcuni autori [76,87,98,99] contestano la validità degli studi retrospettivi, ritenendoli non affidabili e viziati dal miglioramento della diagnostica degli ultimi anni e dalla variabilità osservata nella storia naturale di questi tumori.

Alcuni [100] sostengono possano beneficiarne soprattutto i pazienti con tumore secernente cortisolo, considerando il fatto che il Mitotane per essere biologicamente attivo, richiede l'intervento del CYP11B, probabilmente espresso dai tumori cortisolo-secernenti [101].

Attualmente l'orientamento generale è quello di utilizzare il Mitotane nel contesto di una polichemioterapia, oppure quando esistano dubbi sulla radicalità dell'intervento [76,98,99], sebbene gli ultimi riscontri [102] indichino che la somministrazione di questo farmaco possa prolungare la sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con carcinoma adrenocorticale resecato completamente.

Altri farmaci non chemioterapici che possono essere utilizzati nella terapia dei tumori adrenocorticali sono gli inibitori degli enzimi steroidogenici P450 (Aminoglutemide, Metirapone, Ketoconazolo e Etomidate), anche se il loro uso sembra essere di qualche utilità più come trattamento palliativo o nel controllo della sintomatologia da eccessiva produzione ormonale [9,76].

b) Per quanto riguarda la chemioterapia tradizionale numerosi farmaci citotossici sono stati utilizzati, quali Cloroetil-cicloesa-Nitrosurea, Carmustina (BCNU), Vinblastina, Metotrexate e Doxorubicina idrocloride. In alcuni casi i risultati sono stati poco soddisfacenti, in altri si è assistito all'arresto di progressione della malattia, soprattutto con l'utilizzazione di 5-azacitidina [9].

Cisplatino, Doxorubicina, Etoposide, Vincristina, 5-Fluorouracile e Streptozoticina sono stati usati da soli o in varie combinazioni: il Cisplatino da solo o in combinazione con l'Etoposide è quello che ha dimostrato l'effetto terapeutico maggiore [76]. In altri studi di fase II l'associazione di questi due farmaci (Cisplatino 100 mg/m<sup>2</sup>/die al 1° giorno; Etoposide 100mg/m<sup>2</sup>/die nei gg. 1-3) con il Mitotane di mantenimento, ha ottenuto una risposta obiettivabile solamente nell'11% dei pazienti [99].

Il tasso di risposta più alto osservato in letteratura in uno studio di fase II è stato del 53,5% (2 CR e 13 PR su 28 pazienti), e prevedeva la somministrazione di Etoposide (100mg/m<sup>2</sup>/die nei gg. 5-7), Doxorubicina (20 mg/m<sup>2</sup>/die nei gg. 1 e 8) e Cisplatino (40 mg/m<sup>2</sup>/die nei gg. 1 e 9) associata alla somministrazione continua di Mitotane (4 g/die) in 3-8 cicli ogni 4 settimane [103].

Il razionale dell'associazione tra agenti antitumorali e Mitotane sembra essere l'effetto inibente di quest'ultimo sull'espressione, da parte delle cellule tumorali, della glicoproteina P, causa della "multidrug resistance" tipica dei tumori adrenocorticali; inoltre a conferma dell'importanza del mantenimento di una certa concentrazione plasmatica del farmaco, è stato accertato come questa inibizione sia massima ad un livello di 15 µg/mL [12,103].

#### Peculiarità di trattamento nei pazienti pediatrici

Dal punto di vista chirurgico non esistono grosse differenze nell'approccio ad una massa surrenalica anche in età pediatrica. Anche nei bambini è abbastanza diffuso l'approccio laparoscopico, che deve comunque garantire la radicalità e la completezza delle procedure [104]. La differenza sostanziale è che, nel paziente pediatrico, è necessario accertare la natura di ogni massa incidentalmente scoperta in epoca postnatale, contrariamente a quanto avviene nell'adulto in cui le masse surrenaliche scoperte occasionalmente (incidentaloma) con massimo diametro inferiore a 4 centimetri vengono solo osservate nel tempo ("wait and see" policy).

Diverso è l'atteggiamento nel caso di neoplasie riscontrate in epoca pre o perinatale. In queste situazioni l'atteggiamento conservativo è accettato anche se esiste la possibilità che la formazione sia un neuroblastoma [104].

Per quanto riguarda l'approccio laparoscopico, anche se le indicazioni per i tumori corticosurrenali sono diffuse e comunemente accettate nell'adulto, in epoca pediatrica l'argomento è controverso, sia per le ridotte dimensioni del paziente sia per la minore esperienza posseduta con questa metodica [105,106,107,108].

Il ruolo della chemioterapia in età pediatrica è ancora oggetto di discussione, sia per la mancanza di casistiche adeguate, sia per la comune opinione che i tumori possano avere caratteristiche diverse rispetto a quelli dell'adulto.

L'uso del Mitotane, per esempio, non è stato indagato fino agli anni '90, quando è stato chiarito che poteva essere utilizzato anche nei bambini, a patto che si tenesse sotto stretto controllo la funzionalità surrenalica (precedentemente veniva somministrato in modo empirico a tali pazienti senza un reale supporto della letteratura) [1,10,12].

Anche l'utilizzo di una polichemioterapia nei tumori in stadi avanzati era stabilito sulla base di studi oncologici dell'adulto [12].

Un articolo di 10 anni fa [109] illustra i primi risultati di un protocollo brasiliano sul trattamento chemioterapico dei carcinomi adrenocorticali avanzati in età pediatrica con un regime costituito da 8 cicli di Cisplatino ( $40 \text{ mg/m}^2$ , ev in 4 ore nei giorni 1 e 9), Etoposide ( $100 \text{ mg/m}^2$ , ev per 1 ora nei giorni dal 5 al 7), Doxorubicina ( $20 \text{ mg/m}^2$ , ev per 1 ora nei giorni 1 e 8) e Mitotane ( $4 \text{ g/m}^2/\text{die}$ ).

I risultati non sono molto promettenti (27% di sopravvivenza con un solo paziente su 11 in remissione completa), ma rappresentano un primo passo verso un trattamento più specifico.

Anche il ruolo della radioterapia non è chiaro: come riportato nella popolazione adulta, solo un esiguo numero di pazienti è stato sottoposto a un trattamento radioterapico ed i risultati non sono stati soddisfacenti [13].

#### Protocolli e registri di malattia in ambito pediatrico

Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento di interesse verso le neoplasie corticosurrenaliche, sia nell'oncologia dell'adulto sia nel campo pediatrico. Oltre al progetto TREP e alla sua proiezione europea EXPERT, attualmente è aperto (dal 1990) un registro internazionale che comprende principalmente la casistica statunitense e quella brasiliana e che è alla base del protocollo di studio COG ARAR0332.

*Il progetto TREP:* le linee guida TREP, oltre a codificare il work-up diagnostico e di follow-up forniscono alcune indicazioni per il trattamento chirurgico e medico dei tumori adrenocorticali in età pediatrica (Tabella IX).

- **Trattamento chirurgico:** L'exeresi iniziale è raccomandata in tutti i casi in cui si possa prevedere una resezione completa del tumore, indipendentemente dalle sue dimensioni, tenendo a mente che questa procedura è in grado, da sola, di garantire la guarigione.

L'asportazione viene di regola eseguita attraverso una laparotomia trasversale sopraombelicale con accesso transperitoneale. Procedure laparoscopiche vanno considerate con cautela e comunque sulla base dell'esperienza di ciascun centro. I linfonodi regionali, anche se non macroscopicamente invasivi, vanno biopsiati. L'invasione locale oltre i limiti della ghiandola, non esclude a priori la possibilità di ottenere un'exeresi completa, anche in caso di parziale coinvolgimento della cava. Se la massa non è dissociabile dal rene, è accettata la nefrectomia.

Se il chirurgo dopo un'attenta valutazione dei dati radiologici sui rapporti della neoplasia e sulle sue dimensioni ritiene che una resezione completa non sia possibile, è meglio optare per una biopsia, poiché un'exeresi con residui macroscopici o con rotture della massa ha valore prognostico sfavorevole. Una biopsia iniziale è consigliata anche nei casi con metastasi a distanza. La biopsia può essere effettuata chirurgicamente o con ago tranciante (18-16 G). In questi casi l'asportazione del tumore verrà programmata dopo un tentativo di terapia medica riduttiva. Le metastasi ancora presenti e asportabili saranno resecate contemporaneamente al tumore primitivo se possibile, o a breve distanza di tempo, in base alla sede.

- **trattamento chemioterapico:** mentre per i pazienti in stadio I vi è consenso a non somministrare alcun ulteriore trattamento, vi è maggior incertezza in tutti gli altri casi. In considerazione di questa incertezza e del numero limitato dei casi di carcinoma adrenocorticale in età pediatrica si è deciso di avviare una collaborazione con gli Oncologi dell'adulto che stanno completando uno studio multicentrico di fase II. Quindi il trattamento raccomandato in accordo alla stadiazione è il seguente:

**Tabella IX. Trattamento proposto dalle linee guida TREP.**

<b>Stadio I:</b>	nessuna terapia medica adiuvante
<b>Stadio II:</b>	trattamento adiuvante con Mitotane (almeno un anno)
<b>Stadio III e IV:</b>	studio di fase II con mitotane + EDP (Etoposide, Doxorubicina e Cisplatino)*

\* sono arruolabili anche pazienti in stadio I o II in recidiva

L'esperienza italiana del progetto TREP ha reso possibile la creazione di un registro europeo di tumori solidi in età pediatrica, denominato EXPERT (European Cooperative Study for Pediatric Rare Tumors) cui partecipano Italia, Francia, Germania, Polonia e Gran Bretagna.

Tra tutti gli istotipi considerati, vi sono anche i tumori adrenocorticali. L'intento principale è di raccogliere un numero più consistente di casi per riuscire ad analizzare e ad individuare con minore approssimazione i punti critici nella diagnosi e nel trattamento di queste neoplasie [110,111].

*GPOH-MET-97 (non-randomized, single arm study)*: si tratta di uno studio del gruppo tedesco a braccio singolo non randomizzato che prevede, oltre al trattamento chirurgico, un trattamento chemioterapico sistemico con vincristina, ifosfamida, adriamicina, carboplatino, etoposide e mitotane in diversi regimi (adiuvante, neoadiuvante e di salvataggio). Negli studi da loro pubblicati è stata rilevata una migliore sopravvivenza qualora il trattamento con il mitotane durava più di sei mesi con concentrazione ematica intorno ai 14 mg/l [112,113].

*IPACTR (International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry)*: è attualmente il più grande registro mondiale dei tumori adrenocorticali in età pediatrica, istituito nel 1990 con centro al St. Jude Children's Research Hospital di Memphis (Tennessee, USA). L'arruolamento in questo registro non prevede che il paziente venga sottoposto ad un preciso protocollo terapeutico, in quanto è stato costituito essenzialmente per raccogliere informazioni mediche e demografiche e per creare una banca di tessuto tumorale con il fine di condurre studi epidemiologici e biomolecolari sul trattamento e sulla storia naturale di questi tumori. La costituzione di tale registro si deve alla consapevolezza



dell'impossibilità di raccogliere adeguate informazioni sui tumori adrenocorticali operando a livello dei singoli istituti specializzati nel campo oncologico pediatrico. (www.stjude.org/ipactr)

Protocollo COG ARAR0332: questo protocollo (aperto nel 2006) è nato da una collaborazione tra il COG (Children Oncology Group) e alcuni istituti brasiliani. È una diretta conseguenza del registro IPACTR.

Gli intenti di tale studio sono di chiarire tre questioni cliniche principali: 1) l'efficacia della sola chirurgia per i tumori in stadio I; 2) il ruolo della linfadenectomia retroperitoneale nel ridurre le recidive locali nei tumori in stadio II; 3) l'impatto del Mitotane e della CT basata sul Cisplatino negli stadi III e IV (Tabella X).

Obiettivo secondario è investigare la biologia dei tumori adrenocorticali e in particolare le mutazioni a carico della proteina p53 [114].

#### **Tabella X. Trattamento proposto nel protocollo COG ARAR 0332**

<b><u>Stadi</u></b>	<b><u>Trattamento</u></b>
<b><u>I</u></b>	Chirurgia
<b><u>II</u></b>	Chirurgia Dissezione dei linfonodi retroperitoneali
<b><u>III</u></b>	Mitotane Cisplatino/Etoposide/Doxorubicina Chirurgia + dissezione dei linfonodi retroperitoneali
<b><u>IV</u></b>	Mitotane Cisplatino/Etoposide/Doxorubicina Chirurgia + dissezione dei linfonodi retroperitoneali

Recentemente sono stati diffusi i dati relativi a questo protocollo che sembrerebbero mostrare che la dissezione sistematica dei linfonodi retroperitoneali non ha efficacia nel controllo locale e a distanza della malattia [115].

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 ASPETTI CLINICI**

Il Progetto TREP comprende i pazienti con tumore raro reclutati tra l'inizio del 2000 e il maggio 2013. Tra i vari tumori registrati, la casistica comprende 32 casi di tumore adrenocorticale, confermato istologicamente. Altri 5 pazienti reclutati per lo studio provengono dai centri inglesi del Royal Marsden Hospital di Sutton, UK e dal St. George's Hospital di Londra, UK e sono stati trattati tra il 2005 e il 2013 (referenti: Dr. Stefano Giuliani, chirurgo pediatra; Dr. Sucheta Vadya, oncologa pediatra; Dr. Assunta Albanese, endocrinologa pediatra; Dr. Ruth Nash, patologa pediatra)

#### **3.2 ASPETTI ISTOPATOLOGICI**

*Materiali.* Sono stati richiesti i campioni di tessuto tumorale dei pazienti ai rispettivi Centri e ne sono stati ottenuti 37 valutabili: per ognuno di questi pazienti il materiale consisteva in un campione tissutale incluso in paraffina e in diverse sezioni di tumore già poste su vetrino e colorate in Ematossilina-Eosina. Inoltre sono stati richiesti e ottenuti dati riguardanti la presentazione clinica e l'outcome di trattamento di ogni paziente.

#### *Metodi.*

*Revisione istologica.* Si è proceduto a revisione della diagnosi istologica sulle sezioni già allestite valutando i parametri prognostici indicati da Wieneke e colleghi (vedi paragrafo "classificazione ed istopatogenesi"), in modo da assegnare ad ogni paziente un punteggio con cui classificare il tumore come benigno, indeterminato o maligno. Tutti i pazienti arruolati nel TREP avevano già una valutazione basata sullo score di Wieneke eseguita al tempo della diagnosi: si è comunque proceduto ad una revisione dei criteri utili per la classificazione prognostica di Wieneke. Anche 2/5 pazienti provenienti dal gruppo inglese erano stati classificati secondo i criteri di Wieneke e sono stati revisionati. Tutti i pazienti non classificati al momento della diagnosi sono stati valutati retrospettivamente sulla base dei vetrini inviati dai centri di trattamento. Si è successivamente proceduto a valutare sugli stessi pazienti, ma in modo retrospettivo, l'algoritmo di Volante e coll. (vedi Figura 1 e Paragrafo 2.3) e a categorizzarli di conseguenza.

Il pezzo su cui effettuare la valutazione del reticolo è stato selezionato in base all'architettura del tumore nelle sezioni colorate in Ematossilina-Eosina. Venivano scelte le aree con pattern diffuso, nodulare o trabecolare, piuttosto che quelle con pattern alveolare,

in quanto le prime più probabilmente potevano presentare un framework reticolinico interrotto.

Lo staining è stato effettuato con un kit disponibile in commercio e basato su una metodica di impregnazione argentica (*Bio Optica, Milan, Italy*).

Sono stati considerati alterati sia i pattern con alterazione qualitativa sia quelli con alterazione quantitativa.

La presenza di un reticolo interrotto o della distruzione della membrana basale veniva definito, allo stesso modo di quanto descritto per altre lesioni endocrine [115,116], come una perdita di continuità delle fibre reticolari o del network della membrana basale per almeno un terzo della lesione valutate a 400 HPF, mentre l'alterazione quantitativa del reticolo ("superintact") veniva definito come un reticolo apparentemente intatto formato da fibre che mostravano uno spessore irregolare e variabile, con un aspetto sfilacciato, che circondava singole cellule o, più raramente, piccoli gruppi di cellule.

In ogni slide, la struttura delle fibre reticolari è stata valutata prima a basso ingrandimento (100 HPF) e poi ad alto (400 HPF).

Per stabilire il tasso di riproducibilità della metodica di interpretazione del reticulon stain, le stesse slide di tutti i pazienti sono state fatte circolare tra gli esaminatori per due tornate (due fasi di analisi).

Durante la prima fase, i partecipanti hanno rivisto e categorizzato le stesse slide scegliendo tra 2 possibili opzioni (pattern reticolinico conservato o pattern reticolinico alterato) sulla base del protocollo esposto nel primo studio di Volante e colleghi (Volante).

La seconda fase è consistita nella revisione dei casi discordanti tra i due gruppi: una rivalutazione in cieco sui risultati della prima fase è stata eseguita dopo un training su casi rappresentativi di differenti pattern reticolinici a differenti ingrandimenti.

La conta mitotica è stata valutata secondo sia i criteri utilizzati nell'adulto (>5/50 HPF) sia quelli segnalati da Wieneke (>15/20 HPF): secondo questi due cut-off si è proceduto a classificare i casi in esame secondo l'algoritmo descritto da Volante (aRA) e secondo un algoritmo pediatrico (pRA). Tale decisione è stata presa in considerazione poichè la conta mitotica > 15/20 HPF nei tumori adrenocorticali in età pediatrica era stata segnalata da Wieneke come predittore indipendente di prognosi [2].

Infine si è proceduto a confrontare i risultati delle due diverse classificazioni prognostiche (Wieneke e Reticolina) e a confrontarli con i dati di outcome dei pazienti: la correlazione tra le diverse classificazioni e l'outcome è stata calcolata mediante Test Esatto di Fisher.

## **4. RISULTATI**

### **4.1 ASPETTI CLINICI**

All'esordio 19/37 bambini si sono presentati con i segni di ipercreazione ormonale sostenuta dal tumore: 15 presentavano sintomi ascrivibili ad una sindrome virilizzante, 12 a sindrome di Cushing. Gli altri 8 piccoli pazienti presentavano sintomi aspecifici (dolore addominale, lombalgia, febbre, calo ponderale). In due pazienti non sono noti i sintomi all'esordio. È opportuno dire che in un paziente con sindrome virilizzante la diagnosi è stata accidentale, in seguito agli accertamenti di routine dopo un trauma, ma che i segni dovuti all'ipersecrezione di steroidi sessuali erano già presenti e furono giustificati a posteriori, una volta accertata l'alterazione dei valori ormonali.

I segni più frequentemente osservati nei pazienti con sindrome virilizzante sono stati pubarca o pubertà precoce, ipertrofia del clitoride, acne, aumento della pigmentazione cutanea e secrezioni sebacee al cuoio capelluto. In un lattante l'iperandrogenismo è esordito con ipotonia generalizzata.

Nei 12 pazienti con sindrome di Cushing pura, la manifestazione più frequente è stato l'habitus cushingoide, caratterizzato da facies lunare, gibbo di bufalo, obesità centrale e strie rubre; il semplice aumento ponderale è stato il secondo sintomo più frequente. Altre manifestazioni più raramente osservate sono state: arresto della crescita, ipertricosi e poi amenorrea, iperglicemia e ipertensione.

Altri sintomi aspecifici osservati in questa casistica sono stati: dolore addominale, cefalea e convulsioni, ma anche calo ponderale, sudorazioni, febbre, vomito.

Gli esami bioumorali hanno generalmente confermato la diagnosi clinica, ma non è possibile escludere una sottostima delle sindromi miste: uno screening ormonale completo è stato effettuato raramente e sono stati spesso trascurate le indagini volte a svelare un aumento della produzione dei mineralcorticoidi e degli estrogeni.

Il tumore interessava il surrene di destra in 16 casi e quello di sinistra in 19: solo in due pazienti non è noto il lato; in nessun caso il tumore ha avuto origine da una ghiandola surrenale accessoria o da tessuto surrenalico ectopico.

Per quanto riguarda le dimensioni del tumore, il diametro massimo medio era di 8,1 cm (mediana 5,5; range 3-25 cm). Il volume variava tra i 4 e i 3556 cm<sup>3</sup> (media 313,5; mediana 58).

Alla diagnosi è stata accertata la presenza di metastasi in 3 pazienti: in 2 casi erano lesioni polmonari, in 1 ossee.

Nella casistica qui presentata dsei pazienti risultavano affetti da una sindrome genetica: 3 sindrome di Li-Fraumeni (quest'ultima sospettata e diagnosticata in seguito al riscontro del tumore adrenocorticale), 1 da sindrome di Prader-Willi, 1 da sindrome di Beckwith-Wiedemann e uno da sindrome di Asperger.

Per due pazienti c'era il dato anamnestico di una malattia neoplastica pregressa: 1 melanoma in una bambina di 144 mesi e 1 leucemia linfoblastica in uno affetto da sindrome di Prader-Willi.

La distribuzione per stadio e' la seguente: stadio I 20 pazienti; stadio II 12 pazienti (6 in virtù del volume tumorale e/o presenza di metastasi ai linfonodi regionali e/o spillage intraoperatorio, 6 per la presenza di residui microscopici ai margini di resezione); stadio III 1 solo paziente inserito a causa di una chirurgia iniziale con residui macroscopici; stadio IV 3 bambini a cui sono state riscontrate alla diagnosi lesioni ripetitive in organi a distanza (polmonari in 2, ossee in 1). In tutti si è comunque tentato l'intervento di exeresi della massa surrenalica, riuscendo ad essere localmente radicali in 2/3 e in 1/3 incorrendo nella rottura intraoperatoria. Tutti e tre i pazienti sono stati successivamente sottoposti alla chemioterapia secondo lo schema consigliato dalle linee guida TREP (Cisplatino, Etoposide e Adriamicina o Doxorubicina). In nessuno di questi pazienti c'è stato un arresto della progressione della malattia tumorale ed i pazienti sono deceduti a 4-9 mesi dalla diagnosi.

Sette su 13 pazienti in stadio II sono andati incontro a recidiva: in 3 casi sia locale (linfonodi loco-regionali, tessuto perisurrenalico) sia a distanza, negli altri casi solo a distanza (polmone e fegato).

Cinque su sette pazienti sono deceduti per progressione di malattia nonostante le cure (chemioterapia di I e II linea, radioterapia, asportazione delle recidive locali e/o a distanza), i restanti due sono in trattamento (vivi con malattia dopo seconda recidiva) (Tabella XI).

### Outcome complessivo

Venticinque pazienti hanno raggiunto una remissione completa con un follow-up medio di 100 mesi (mediana 120; range 26-144). Tre pazienti sono vivi con malattia: un paziente (stadio III) è vivo con malattia stabile a 108 mesi; Gli altri due pazienti (stadio II) sono vivi con malattia. Uno ha presentato due recidive locali ed è attualmente in trattamento per la seconda, l'altro ha presentato una recidiva locale (trattata con chirurgia e mitotane) e una recidiva metastatica (metastasi peritoneale sottodiaframmatica destra) per cui è

attualmente in trattamento. Gli altri otto pazienti (3 in stadio IV e 5 in stadio II con recidiva) sono deceduti per malattia ad una media di 36,8 mesi dalla diagnosi (mediana 24; range 4-117).

**Tabella XI. Caratteristiche cliniche dei 37 casi di ACT in esame.**

	<i>Sex/Età</i>	<i>Sintomi endocrini</i>	<i>Diametro (cm)</i>	<i>Peso (gr)</i>	<i>Stadio</i>	<i>Genetica</i>	<i>Outcome</i>	<i>Follow-up</i>
1 PD	M/2 mo	No	5	80	<b>I</b>	No	CR	84
2 PD	M/3 mo	No	3	6	<b>I</b>	No	CR	132
3 PD	M/159 mo	Cushing	25	3750	<b>IV</b>	No	DOD	7
4 PD	F/106 mo	Virilising	3.5	15	<b>I</b>	No	CR	120
5 PD	F/16 mo	Virilising	5	30	<b>II</b>	No	CR	120
6 PD	F/12 mo	Virilising	6	-	<b>I</b>	Li-Fraumeni	CR	132
7 PD	M/61 mo	Virilising	13.3	-	<b>II</b>	No	DOD	45
8 PD	F/66 mo	Cushing	5.5	50	<b>I</b>	No	CR	72
9 PD	F/24 mo	Virilising	5.5	66	<b>I</b>	No	CR	120
10 PD	M/124 mo	Cushing	5	45	<b>I</b>	No	CR	108
11 PD	F/175 mo	Cushing	14	nnn	<b>II</b>	No	DOD	70
12 PD	M/94 mo	Virilising	24	1075	<b>II</b>	No	DOD	117
13 PD	F/84 mo	Cushing	10	120	<b>II</b>	No	AWD	23
14 PD	F/21 mo	-	-	-	<b>I</b>	-	CR	-
15 PD	F/137 mo	Cushing	5	40	<b>I</b>	No	CR	120
16 PD	F/210 mo	No	11	-	<b>IV</b>	No	DOD	9
17 PD	M/2 mo	No	6	50	<b>II</b>	Beckwith-Wiedemann	CR	48

	<b>Sex/Età</b>	<b>Sintomi endocrini</b>	<b>Diametro (cm)</b>	<b>Peso (gr)</b>	<b>Stadio</b>	<b>Genetica</b>	<b>Outcome</b>	<b>Follow-up</b>
18 PD	F/180 mo	Virilising	7	-	I	No	CR	118
19 PD	F/144 mo	Cushing	2.5	-	II	No	CR	121
20 PD	M/60 mo	No	4.5	25	III	No	AWD	108
21 PD	M/-	-	3.5	50	I	-	CR	-
22 PD	F/50 mo	Virilising	4	50	II	Li-Fraumeni	AWD	60
23 PD	F/14 mo	Cushing	8	-	I	No	CR	120
24 PD	F/65 mo	Cushing	11	305	II	No	DOD	4
25 PD	M/108 mo	Virilising	3	-	I	Prader-Willi	CR	144
26 PD	F/119 mo	Virilising	4.5	-	I	No	CR	144
27 PD	M/166 mo	Cushing	13	60	IV	No	DOD	4
28 PD	F/8 mo	Virilising	5.5	48	II	No	CR	54
29 PD	F/1 mo	No	5	18	I	Li-Fraumeni	CR	26
30 TO	M/37 mo	No	13	-	II	No	AWD	48
31 TO	F/95 mo	Cushing	3	20	I	No	CR	96
32 TO	F/60 mo	Virilising	9	160	I	No	CR	84
33 UK	F/41 mo	Virilising	4.2	9.4	I	Asperger Syndrome	CR	130
34 UK	F/168 mo	Virilising	12.5	585	II	No	CR	34

	<b>Sex/Età</b>	<b>Sintomi endocrini</b>	<b>Diametro (cm)</b>	<b>Peso (gr)</b>	<b>Stadio</b>	<b>Genetica</b>	<b>Outcome</b>	<b>Follow-up</b>
35 UK	M/134 mo	Cushing	12.5	454	II	No	DOD	39
36 UK	F/50 mo	Virilising	5	0.5/50 gr	I	No	CR	120
37 UK	F/55 mo	None	2.4	8	I	No	CR	60



#### 4.2 REVISIONE ISTOLOGICA E CLASSIFICAZIONE PROGNOSTICA

La diagnosi istologica di tumore adrenocorticale è stata confermata in tutti i casi esaminati. Secondo lo score prognostico descritto da Wieneke, 16 tumori sono stati classificati come benigni, 8 con comportamento indeterminato e 13 come maligni (Tabella XII).

La valutazione del reticolo ha dimostrato un'assenza di alterazioni (reticolo "intact") in 8 casi mentre i restanti casi erano interessati da un'alterazione del network delle fibre reticolari: in 15 casi l'alterazione era di tipo quantitativo ("superintact"), in 10 di tipo qualitativo e in 4 casi vi era un pattern misto con alterazioni sia quantitative sia qualitative del reticolo intercellulare.

Dopo il primo round di valutazione vi erano quattro casi discordanti tra i due gruppi (concordanza diagnostica 89,2%) e durante il secondo round in tutti e quattro si è giunti ad un consensus: tutti i casi presentavano un'alterazione quantitativa del reticolo ("superintact").

Per quanto riguarda la riclassificazione dei casi secondo l'algoritmo prognostico proposto da Volante e colleghi [5], utilizzando il cut-off pediatrico del numero di mitosi (pRA) 8 casi presentavano un reticolo intatto (Figura 2) e sono stati quindi classificati come benigni (adenomi adrenocorticali) (Tabella XIII).

**Tabella XII. Outcome e score di Wieneke dei 37 casi di ACT in esame.**

<b>Weineke Score (n 37)</b>	<b>Outcome</b>	<b>Stadio</b>
Benigni (16)	16 CR	15 st. I 1 st. II
Indeterminati (8)	6 CR 2 AWD	4 st. I 3 st. II 1 st. III
Maligni (13)	8 DOD 2 AWD 2 CR	1 st. I 8 st. II 3 st. IV

**Tabella XIII. Parametri di rivalutazione sec. Volante dei 37 casi di ACT in esame.**

	<i>Mitosi 20HPF</i>	<i>Mitosi 50 HPF</i>	<i>Status del Reticolo</i>	<i>Necrosi</i>	<i>Invasione vascolare</i>	<i>pRA</i>	<i>aRA</i>
1 PD	8	20	Qualitative	yes	yes	Malignant	Malignant IR
2 PD	0-1	2	None	no	no	Benign	Benign
3 PD	12	16	Qualitative	yes	yes	Malignant	Malignant HR
4 PD	2	4	Qualitative	no	no	Benign	Benign
5 PD	3	7	Qualitative	no	no	Benign	Malignant LR
6 PD	0-1	3	None	no	no	Benign	Benign
7 PD	9	19	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
8 PD	6	8	Quantitative	yes	yes	Malignant	Malignant LR
9 PD	0-1	2	Quantitative	no	no	Benign	Benign
10 PD	1-2	3	Qualitative	no	no	Benign	Benign
11 PD	2	6	Quantitative + Qualitative	yes	no	Malignant	Malignant LR
12 PD	20	25	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
13 PD	22	34	Quantitative	yes	yes	Malignant	Malignant IR
14 PD	1	3	None	no	no	Benign	Benign
15 PD	2	3	Quantitative	no	no	Benign	Benign
16 PD	12	14	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant HR
17 PD	8	20	Qualitative	yes	yes	Malignant	Malignant IR
18 PD	0-1	2	Quantitative + Qualitative	yes	no	Malignant	Malignant LR
19 PD	0-1	2	None	no	no	Benign	Benign
20 PD	2	6	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
21 PD	1-2	4	Quantitative	no	no	Benign	Benign
22 PD	8	20	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
23 PD	1-2	3-4	Quantitative + Qualitative	yes	no	Malignant	Malignant LR
24 PD	17	20	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
25 PD	0-1	2	Qualitative	no	no	Benign	Benign
26 PD	2	4	Quantitative	no	no	Benign	Benign
27 PD	11	17	Quantitative + Qualitative	yes	no	Malignant	Malignant HR
28 PD	12	35	Quantitative	yes	yes	Malignant	Malignant IR
29 PD	3	6	None	no	no	Benign	Benign
30 TO	6	18	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
31 TO	1	2	None	no	no	Benign	Benign

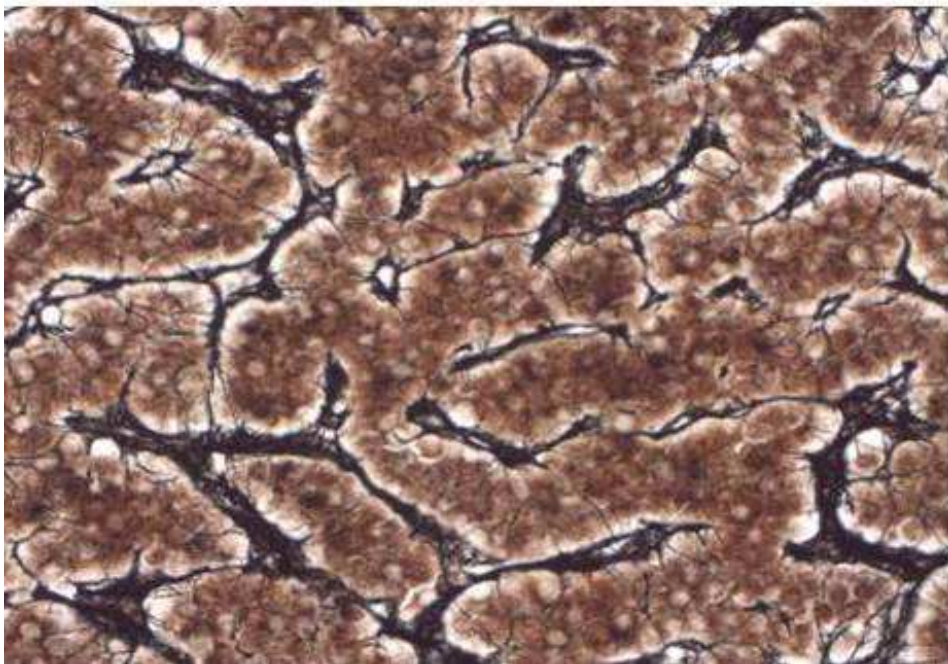
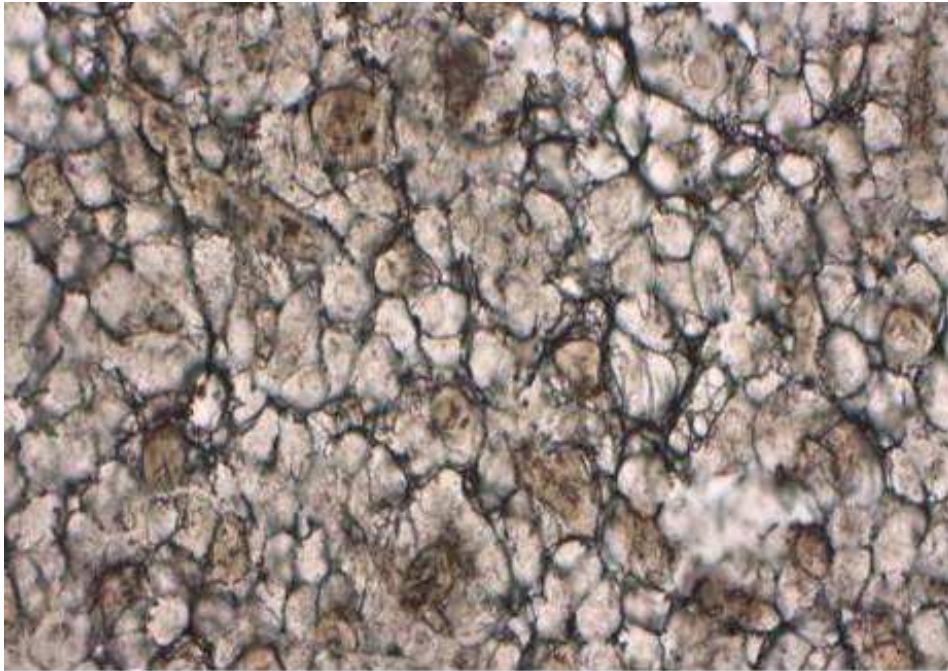
	<i>Mitosi 20HPF</i>	<i>Mitosi 50 HPF</i>	<i>Status del Reticolo</i>	<i>Necrosi</i>	<i>Invasione vascolare</i>	<i>pRA</i>	<i>aRA</i>
32 TO	10	25	Quantitative	yes	no	Malignant	Malignant IR
33 UK	1-2	4	Qualitative	no	no	Benign	Benign
34 UK	4	6	None	yes	no	Benign	Benign
35 UK	17	20	Qualitative	yes	yes	Malignant	Malignant IR
36 UK	0-1	4	Qualitative	yes	no	Malignant	Malignant LR
37 UK	1-2	4	None	no	no	Benign	Benign

Legenda: 0 = parametro assente; 1 = parametro rilevato nel campione; l.r. = low risk; i.r. = intermediate risk; h.r. = high risk

Tra i 29 casi con framework della reticolina alterato (Figura 3), 9 non presentavano alcun parametro aggiuntivo (necrosi, invasione vascolare o numero di mitosi superiore alle 15/20 HPF) e sono stati pertanto classificati come benigni, mentre 20 presentavano almeno uno dei parametri e sono stati classificati come maligni .

Considerando invece tra i parametri una conta mitotica superiore alle 5/50 HPF (aRA) come descritto originariamente da Volante e colleghi, i 29 tumori con alterazione del reticolo sono stati classificati come benigni (n 8) e come maligni (n 21). Successivamente i casi classificati come maligni sono stati stratificati (in base al numero delle mitosi per 50 HPF e allo stadio alla diagnosi) come low risk (n 6), intermediate risk (n 12) and high risk (n 3).

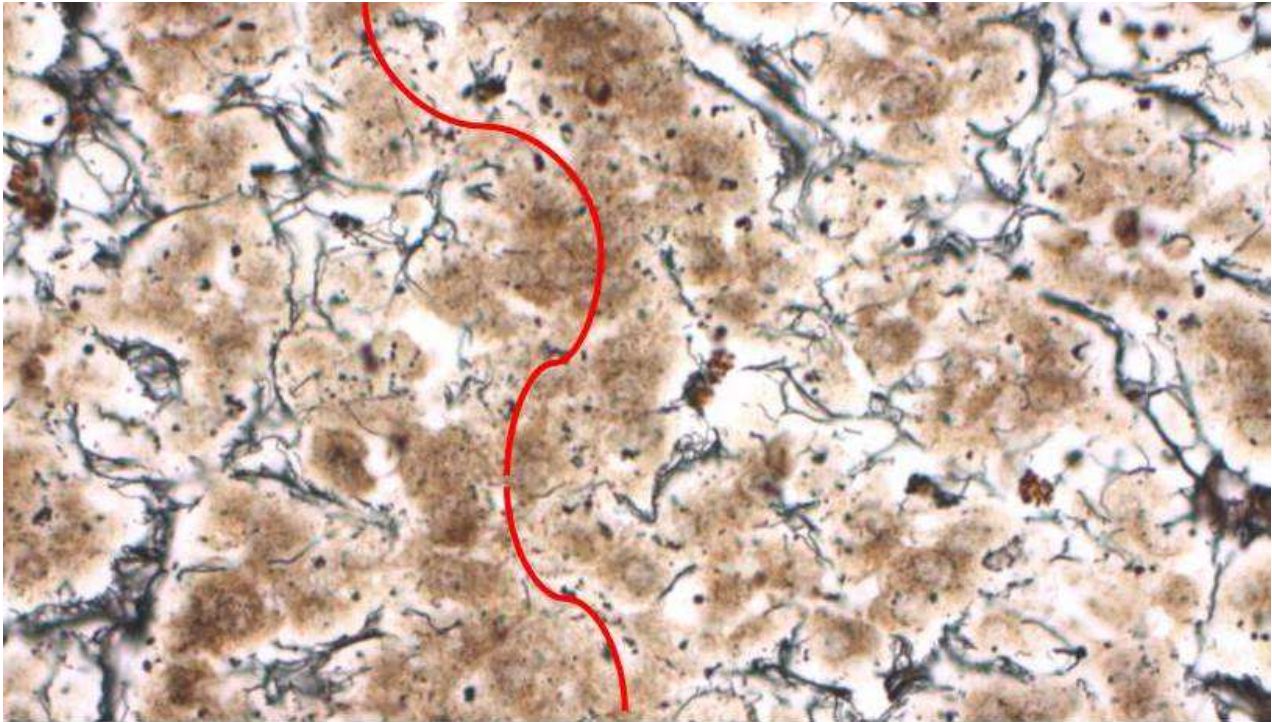
**Figura 2. Framework reticolinico in un tumore adrenocorticale benigno.**



Sopra: reticolo intatto in un tumore adrenocorticale benigno.

Sotto: reticolo "superintact" (alterazione qualitativa) in un tumore benigno

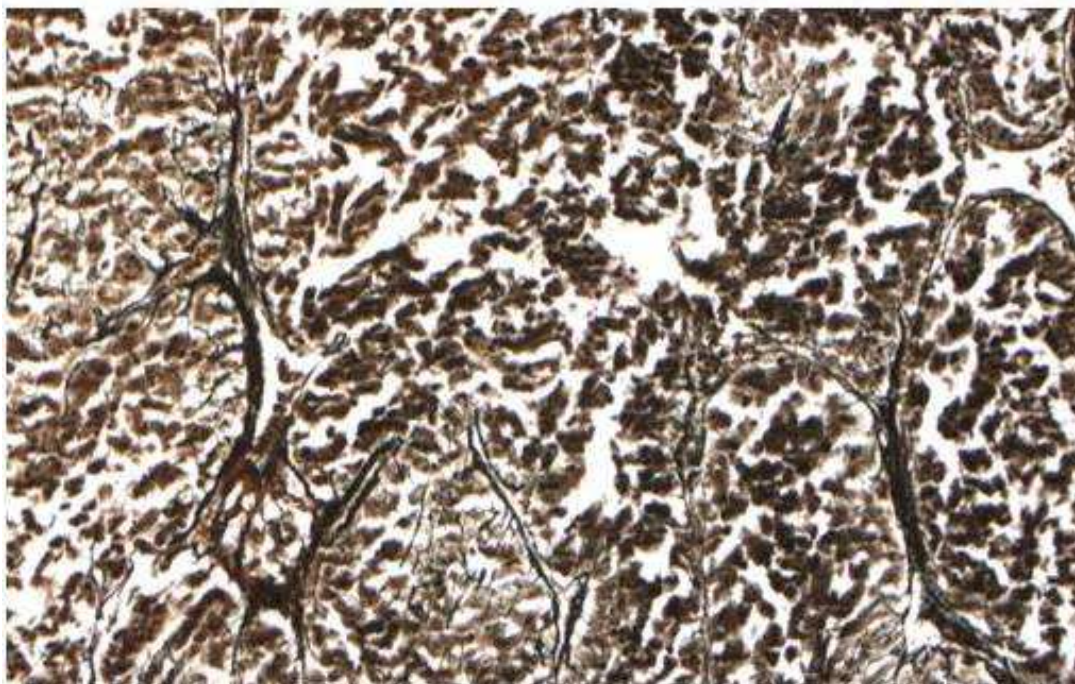
**Figura 3. Framework reticolinico interrotto (linea rossa) in un tumore adrenocorticale benigno.**



Esempio di alterazione qualitativa del pattern reticolare intercellulare: la linea rossa evidenzia il normale andamento che dovrebbe mostrare un reticolo intatto in questo caso.



**Figura 4. Franca interruzione del network reticolare in un carcinoma adrenocorticale.**



Dimostrazione dell'alterazione qualitativa del reticolo in due esempi di carcinoma adrenocorticale: si noti nella figura superiore la completa mancanza del reticolo in alcune zone. Sotto: alle alterazioni qualitative si accompagnano zone con alterazioni quantitative e presenza di reticolo di aspetto sfrangiato e irregolare con trama più spessa ("superintact").

**Tabella XIV. Confronto tra le categorizzazione dei 37 pazienti secondo le classificazioni prognostiche di Volante (pRA e aRA) e Wieneke.**

	Wieneke	pRA	aRA	Stadio	Outcome	FU (months)
1 PD	Ump	Malignant	Malignant IR	I	CR	84
2 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	132
3 PD	Malignant	Malignant	Malignant HR	IV	DOD	7
4 PD	Ump	Benign	Benign	I	CR	120
5 PD	Benign	Benign	Malignant LR	II	CR	120
6 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	132
7 PD	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	DOD	45
8 PD	Benign	Malignant	Malignant LR	I	CR	72
9 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	120
10 PD	Ump	Benign	Benign	I	CR	108
11 PD	Malignant	Malignant	Malignant LR	II	DOD	70
12 PD	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	DOD	117
13 PD	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	AWD	23
14 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	na
15 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	120
16 PD	Malignant	Malignant	Malignant HR	IV	DOD	9
17 PD	Ump	Malignant	Malignant IR	II	CR	48
18 PD	Benign	Malignant	Malignant LR	I	CR	118
19 PD	Benign	Benign	Benign	II	CR	121
20 PD	Ump	Malignant	Malignant IR	III	AWD	108
21 PD	Ump	Benign	Benign	I	CR	Na
22 PD	Ump	Malignant	Malignant IR	II	AWD	60
23 PD	Benign	Malignant	Malignant LR	I	CR	120
24 PD	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	DOD	4
25 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	144
26 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	144
27 PD	Malignant	Malignant	Malignant HR	IV	DOD	4
28 PD	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	CR	54
29 PD	Benign	Benign	Benign	I	CR	26
30 TO	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	AWD	48
31 TO	Benign	Benign	Benign	I	CR	96
32 TO	Malignant	Malignant	Malignant IR	I	CR	84
33 UK	Benign	Benign	Benign	I	CR	130
34 UK	Ump	Benign	Benign	II	CR	34
35 UK	Malignant	Malignant	Malignant IR	II	DOD	39
36 UK	Benign	Malignant	Malignant LR	I	CR	120
37 UK	Benign	Benign	Benign	I	CR	60

Legenda: Ump, indeterminato; LR, low risk; IR, intermediate risk; HR, high risk; CR, remissione completa; AWD, vivo con malattia; DOD, deceduto

Confrontando le classificazioni (Wieneke e pRA) i casi di tumore indeterminato secondo Wieneke sono stati riclassificati prevalentemente come maligni (7 casi) mentre un solo caso è stato riassegnato al gruppo dei tumori benigni. Mettendo a confronto invece l'aRA e il Wieneke, tutti i tumori maligni secondo lo score di Wieneke sono stati riclassificati come maligni: (1 a basso rischio, 8 a rischio intermedio e 3 ad alto rischio), i tumori indeterminati sono stati equamente distribuiti nei due gruppi (4 maligni intermediate risk e 4 benigni) mentre 5 tumori classificati inizialmente come benigni sono stati ridefiniti come maligni (tutti low risk) (Tabella XIV).

L'analisi statistica eseguita mediante test esatto di Fisher ha dimostrato una correlazione tra tutte e tre le classificazioni prognostiche e l'outcome clinico: Wieneke ( $p < 0.0001$ ), pRA ( $p 0.0005$ ), aRA ( $p 0.0015$ ).



## **5. DISCUSSIONE**

I tumori adrenocorticali dell'infanzia sono molto rari, ma la loro reale incidenza in Italia non può essere indicata con certezza a causa della mancanza di un registro di malattia "population based" [8].

Da quanto emerge da un nostro recente lavoro clinico e dai dati continuamente aggiornati del registro, il progetto TREP ha arruolato circa XX pazienti dal 2000 ad oggi, tuttavia pensiamo che il numero di casi dovrebbe essere maggiore se consideriamo che gli adolescenti possono spesso essere trattati in centri dell'adulto. [7,116].

Dal punto di vista clinico la casistica qui considerata, che non comprende tutti i pazienti registrati nel progetto TREP e che è composta anche da pazienti segnalati da altri centri esteri, ai fini della valutazione di questo algoritmo prognostico non si discosta nel trattamento e nei risultati da quanto già riportato in letteratura [7].

L'analisi dei dati clinici disponibili per questa casistica conferma quanto precedentemente osservato da noi e da altri autori. La rimozione completa del tumore alla diagnosi è in grado di portare il paziente alla remissione completa tanto che qualche autore suggerisce il ricorso ad essa anche nel caso di plurime recidive locali e/o metastatiche [117,118].

Il punto critico del trattamento riguarda i pazienti in stadio II e cioè con tumori grandi, residui microscopici alla chirurgia o linfonodi positivi. Per quanto riguarda questi ultimi, il loro esatto peso nella prognosi non è al momento molto chiaro, e per questo riteniamo che la biopsia dei linfonodi regionali debba sempre essere eseguita [10,114], anche se i risultati preliminari dallo studio del COG sulla dissezione dei linfonodi retro peritoneali sembrerebbero mostrare che la linfoadenectomia non dia alcun vantaggio di OS e di EFS nei pazienti con stadio II o superiore [115]. Nemmeno il significato dei residui microscopici o del volume tumorale è completamente chiaro: il buon outcome di alcuni di questi pazienti e le inaspettate recidive di altri sembrerebbero far presupporre che a far da ago della bilancia sia principalmente la biologia del tumore [119]. Diversi studi hanno indicato alcuni parametri clinici, come lo stadio di malattia, l'età alla diagnosi, i sintomi alla presentazione come importanti fattori prognostici [1,12,51,63,81,83].

Come già detto ampiamente [63,112], l'efficacia della chemioterapia è quantomeno controversa. Nella nostra casistica precedentemente pubblicata [7], il mitotane, da solo o in associazione con altri farmaci (tipicamente cisplatino, doxorubicina e etoposide), è stato in grado di controllare la malattia in 8 pazienti, mentre ha avuto un scarso effetto o nullo in

altri 11 e questo a conferma della letteratura sia nell'adulto [72,99] sia in ambito strettamente pediatrico [12,120].

Sebbene i tumori adrenocorticali in età pediatrica abbiano una prognosi migliore di quelli dell'adulto, le forme maligne nei bambini possono essere molto aggressive con un rapido e fatale decorso.

Per tutti i motivi sopraelencati, sembra essere chiara l'importanza di una corretta diagnosi anatomopatologica, che non definisca solo l'istotipo ma che sperabilmente permetta una stratificazione del rischio come per altre neoplasie.

I criteri utilizzati per distinguere le forme benigne da quelle maligne nell'adulto, inclusi per esempio i parametri istologici previsti dallo score di Weiss o altri parametri immunoistochimici come l'antigene Ki67 [40,121], non sono stati utili nel predire il comportamento biologico delle stesse forme nel bambino [2, 114].

Negli ultimi anni si è assistito ad una interessante e corposa discussione a questo riguardo, considerata la rarità di queste forme [2,63,81,122,123,124].

Tradizionalmente il peso o le dimensioni del tumore sono stati considerati i principali strumenti prognostici e vari cut-off sono stati proposti negli anni [1,2,11,63,81,99,125,126]. Dehner et al. per esempio hanno suggerito l'importanza dell'invasione della vena cava come unico predittore indipendente di outcome sfavorevole, ma hanno suggerito il peso della massa come il principale fattore prognostico [122]. Lo stesso Denher ha sottolineato nel suo importante lavoro quanto siano peculiari dal punto di vista istologico i tumori adrenocorticali in età pediatrica rispetto alla loro controparte nell'adulto. Ha osservato infatti che categorizzando gli ACT pediatrici secondo i criteri comunemente utilizzati (vedi Weiss soprattutto ma anche van Slooten), vi sia un'alta percentuale di tumori maligni dal punto di vista istopatologico a cui però non corrisponde ad un comportamento clinico aggressivo. Denher ipotizza che gli ACT pediatrici originino dalla surrenale fetale a differenza degli ACT dell'adulto. A corroborare questa ipotesi ci sarebbe l'importante ruolo di IGF-2 (gene cardine nella crescita della corteccia surrenalica fetale) nell'oncogenesi degli ACT pediatrici insieme ad una mutazione di p53. Le caratteristiche delle cellule corticali fetali (citomegalia, abbondante citoplasma eosinofilo e nuclei prominenti) che porterebbero ad un erroneo giudizio di malignità sarebbero quindi indice di una regressione biologica piuttosto che di una progressione verso la malignità [122].

Nel 2003, Wieneke [2] ha proposto la categorizzazione dei tumori adrenocorticali in età pediatrica in 3 diverse categorie prognostiche "benigni", "maligni" e "indeterminati" in base

ad uno score che include 9 parametri istopatologici, microscopici e macroscopici, tra i quali peso del tumore e invasione della vena cava.

Nella nostra esperienza lo score proposto da Wieneke si è rivelato un forte predittore di prognosi e si è dimostrato essere uno strumento adeguato nella diagnosi dei tumori adrenocorticali in età pediatrica [4,63,81]. Successivamente al nostro studio prospettico del 2013 [4], altri autori hanno confermato i nostri risultati seppur applicando lo score di Wieneke in maniera retrospettiva [15,16].

L'analisi del reticolo è alla base di un nuovo algoritmo e prognostico per i tumori adrenocorticali dell'adulto [5]. Questo algoritmo, in due passaggi, permette di classificare un tumore adrenocorticale come maligno allorquando, insieme ad un reticolo interrotto, siano presenti un o più criteri tra i seguenti: invasione vascolare, necrosi e una conta mitotica superiore alle 5 unità per 50 HPF. Di conseguenza un tumore adrenocorticale può essere classificato come adenoma qualora a) presenti un reticolo preservato (indipendentemente dalla presenza degli altri criteri) b) presenti un reticolo interrotto ma senza nessuno degli altri criteri considerati. I carcinomi poi possono ulteriormente essere suddivisi in 3 categorie: a basso rischio (reticolo alterato, conta mitotica  $\leq 9/50$  HPF e Stadio I/II), a rischio alterato (reticolo interrotto + conta mitotica  $\leq 9/50$  HPF e Stadio III/IV oppure conta mitotica  $>9/50$  HPF e Stadio I/II) o ad alto rischio (reticolo alterato, conta mitotica  $>9/50$  HPF e Stage III/IV).

La parte di questo studio dedicata alla valutazione della riproducibilità, ha riguardato il primo step del Reticulin Algorithm che sostanzialmente è fondato sulla colorazione argentica delle fibre di collagene III che formano il network reticolinico.

I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano che la colorazione immunohistochimica in esame è di facile esecuzione e di facile interpretazione ed, inoltre, che la riproducibilità di questa tecnica, sia in termini di effettuazione sia in termini di interpretazione, ha un alto tasso di concordanza tra diversi osservatori.

La decisione di restringere lo studio di riproducibilità solo sul primo step si basa sulla considerazione che la colorazione immunohistochimica del reticolo è uno strumento diagnostico relativamente nuovo nel campo dei tumori adrenocorticali e che viene qui applicato per la prima volta in assoluto nei tumori adrenocorticali dell'età pediatrica. La colorazione immunohistochimica del reticolo era già ampiamente usata nella routine diagnostica di altre neoplasie endocrine, come i tumori delle paratiroidi o dell'ipofisi [22], del fegato [21] o di altre condizioni non tumorali come la mielodisplasia [127].

Al contrario, gli altri 3 criteri considerati per il secondo step (conta mitotica, necrosi tumorale ed invasione vascolare) erano già valutati di routine nei tumori adrenocorticali dell'adulto e del bambino in quanto presenti tra i criteri dello score di Weiss e di Weineke rispettivamente. Inoltre uno studio francese del 2012 [128] aveva ampiamente dimostrato come fosse alta la riproducibilità, tra diversi osservatori, della valutazione di questi parametri nell'ambito dello score di Weiss.

In definitiva si è riusciti a dimostrare quanto questo score permetta un alto tasso di riproducibilità tra diversi osservatori. Il consensus diagnostico ottenuto è stato notevole con un tasso di concordanza che è arrivato al 89,4% per la prima fase di analisi e al 100% per la seconda. In particolare in questa ultima fase si è con facilità riusciti ad avere un accordo interpretativo su tutti i casi dubbi. Inoltre è apparso chiaro come l'interpretazione della colorazione argentica del reticolo sia abbastanza facile anche per patologi non esperti e per ricercatori non patologi.

Tali risultati sono in linea con quanto dimostrato da Duregon et al. Su una casistica di ACT dell'adulto in cui similmente il tasso di riproducibilità di tale tecnica era stata valutata coinvolgendo anatomopatologi di varia esperienza [6].

Da sottolineare che nessuna differenza nella riuscita tecnica e nell'interpretazione è stata trovata considerando la provenienza dei vetrini: le colorazioni eseguite da diversi laboratori di anatomia patologica sono risultate essere di ottima fattura senza differenza sostanziale tra loro.

Una più approfondita esamina dei casi risultati discordanti durante il primo round ha evidenziato come i casi dubbi presentassero un pattern apparentemente più complesso: alcuni presentavano un alterazione focale del reticolo in un contesto di tessuto tumorale con architettura perlopiù conservata mentre altri presentavano un reticolo più spesso a circondare singole cellule o piccoli gruppi di cellule andando a configurare un alterazione quantitativa (cosiddetto pattern "superintact").

La prima situazione è stata trovata associarsi ai tumori oncocitici: che sono una variante composta in modo preponderante o esclusivamente da oncociti e cioè larghe cellule poligonali con citoplasma eosinofilo di aspetto granulare [129,130]. In particolare 8 casi nella serie qui esaminata presentavano la variante oncocitica: di questi solo 2 presentavano un'alterazione esclusivamente quantitativa del reticolo intercellulare (in uno di questi vi erano anche alterazioni qualitative) mentre solo 2 non presentavano alterazioni del reticolo e solo 2 su 8 sono stati valutati come tumori maligni low risk (benigni secondo lo score di Wieneke).

La seconda invece era un caratteristica di tumori maligni che probabilmente riflette una diversa crescita tumorale con diverse capacità di invasività locale.

Inoltre è importante sottolineare come la colorazione per il reticolo funzioni indipendentemente per i diversi sottotipi istologici di ACT. Usando gli score usuali alcuni varianti mixoidi possono essere erroneamente considerate benigne per la difficoltà a valutare i criteri morfologici mentre al contrario molte varianti oncocitiche possono essere ascritte come maligne sulla base della frequente presenza di atipie, citoplasma eosinofilo e pattern di crescita diffusa anche se in verità tali problematiche sono più rilevanti nell'ambito degli ACT dell'adulto (10,12,28,29).

I risultati del nostro studio, insieme a quanto già riportato in letteratura, indicano come l'algoritmo di Volante sia una tecnica veloce, di facile interpretazione e altamente riproducibile anche qualora nella valutazione del reticolo siano considerate sia le variazioni qualitative sia quantitative.

Inoltre sia l'algoritmo "pediatrico" (pRA), cioè che teneva in considerazione il numero di mitosi segnalato da Wieneke et coll, come predittore indipendente di malignità, sia l'algoritmo originario (aRA) si sono rivelati forti predittori di prognosi, pur mancando nel primo caso la stratificazione in classi di rischio.

A questo proposito resta da stabilire, ma per questo serviranno serie più numerose, se vi sia, e quanto possa essere predetta dal Reticulin algorithm, una differenza di comportamento clinico e di outcome tra le diverse classi di rischio di carcinoma adrenocorticali e di conseguenza quale variante dell'Algoritmo della Reticolina, pRA o aRA, sia quello da utilizzare di routine in età pediatrica.

Nella nostra casistica, seppur valutata retrospettivamente, l' algoritmo alla reticolina appare essere uno strumento promettente nel management. Confrontato poi con lo score di Wieneke, si è dimostrato più semplice e maneggevole, oltre che di più facile ripetibilità come d'altronde già dimostrato negli ACT dell'adulto [6]. La stratificazione secondo l'algoritmo proposto da Volante e colleghi non è dissimile dai risultati ottenuti con lo score di Wieneke: entrambi sembrano predire in modo attendibile quanto poi confermato dall'andamento clinico.

Questo algoritmo ha il suo maggior vantaggio nel ridurre l'analisi di parametri quali l'atipia nucleare, il citoplasma eosinofilo, l'invasione dei sinusoidi e capsulare, che, nonostante siano spesso incontrati nelle lesioni maligne, possono essere fonte di equivoci e

valutazioni non oggettive, specialmente da parte di patologi non esperti [5], e che, come esposto precedentemente, potrebbero essere l'espressione di un fenotipo fetale comune nei casi di tumore adrenocorticale in età pediatrica [122].

È importante sottolineare inoltre che nella maggior parte dei casi la definizione di malignità è stata data dalla presenza di almeno due criteri aggiuntivi, oltre alla distruzione del framework del reticolo.

La definizione anatomopatologica di malignità nei tumori adrenocorticali interpreta un ruolo rilevante nella stratificazione dei pazienti sia per ulteriori studi molecolari sia per eventuali trattamenti mirati. Come tutti gli score prognostici o algoritmi per la valutazione di malignità, necessita di essere chiaramente definito in modo che questa sia valutata mediante criteri omogenei universalmente riconosciuti [6].

Il maggior punto critico forse può essere individuato nell'alta frequenza di adenomi con reticolo interrotto nella nostra piccola serie di pazienti. La ragione per cui alcuni tumori presentino un reticolo interrotto (più del 50% dei nostri casi) senza presentare al contempo la stessa aggressività biologica non è noto, ma qualche ipotesi può essere avanzata facendo appello a studi precedenti.

Differenti meccanismi biologici (aumento dell'attività proliferativa, alterazione della matrice extracellulare, e inadeguato intervento del sistema reticolo-endoteliale) sono stati chiamati in causa per spiegare l'aggressività di alcuni tumori adrenocorticali.

L'espressione di SF-1 nei tumori adrenocorticali, dovuta a un gain della regione cromosomica 9q33-q34, è stata riportata da diversi Autori [34,50,131,132]. Tra i suoi effetti, SF-1 promuove la proliferazione cellulare ed inibisce l'apoptosi attraverso la regolazione di altri geni quali *NR0B1* (DAX-1) e *NOV/CCN3* (Nephroblastoma Overexpressed/Cysteine-Rich Protein 61/Connective Tissue Growth Factor/Nephroblastoma Overexpressed Gene-3) [133]. NOV è coinvolto anche nella regolazione della matrice extracellulare, dell'adesione cellulare e dell'angiogenesi ed è stato trovato essere sottoespresso nei tumori adrenocorticali pediatrici [133].

Al contrario, la perdita della regione cromosomica 11p15 conduce all'attivazione della cascata di mTor con effetto finale di aumentare la proliferazione cellulare.

L'attivazione delle metalloproteinasi (MMPs) è stata già osservata sia negli adulti [5,15] sia nei bambini [4]. Inoltre, nei casi di tumore adrenocorticale dell'adulto, è stata proposta come strumento atto a discriminare le forme benigne da quelle maligne: il dato più interessante risultava essere l'espressione di MMP2 limitata ai tumori maligni, con un'alta

specificità (98.8%) ma bassa sensibilità (74%). Inoltre un'espressione di MMP2 expression in più del 20% delle cellule neoplastiche correlava con un andamento clinico più aggressivo [5].

Più recentemente, West et al. [46], basandosi su un'analisi di gene expression profiling analysis, hanno identificato livelli aumentati da 6 a 8 volte di HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLADRA, and HLA-DPA1 nei carcinomi adrenocorticali pediatrici rispetto alle controparti benigne. Nonostante l'espressione immunistochimica di alcune MMP e antigeni HLA di classe II [55,56] siano stati indagati nell'adulto con risultati al tempo promettenti, in età pediatrica l'espressione di MMP2 o la perdita degli antigeni HLA di II classe non aiutano al momento a discriminare con sicurezza tra tumori benigni o maligni [4], pur se alcune recenti osservazioni sembrerebbero dimostrare il contrario [58,59].

È comunque possibile ipotizzare che le MMP siano responsabili di un certo grado di distruzione della membrane basale intercellulare, come evidenziato dallo staining del reticolo. Questo, a sua volta, probabilmente porta all'attivazione del sistema reticolo-endoteliale e all'intervento delle cellule dendritiche. Di conseguenza potrebbe essere ipotizzato che le cellule HLA DR+, evidenziate in un nostro recente lavoro [4] non siano cellule neoplastiche ma cellule dendritiche responsabili della risposta immunitaria nei confronti del tumore e che queste entrino in gioco quando la neoplasia comincia a diffondersi oltre la matrice intercellulare a causa dell'interruzione della membrana basale. Il nostro studio precedente ha infatti mostrato l'espressione di queste cellule HLA-ristrette, la cui presenza, pur non avendo un significato prognostico, può essere letta in altro modo alla luce di queste nuove osservazioni.

L'intervento del sistema reticolo-endoteliale sembra avvenire sia nei carcinomi sia negli adenomi, anche se in pattern differenti (le cellule HLA nei carcinomi sono sparse e meno numerose) cosa che potrebbe portare a pensare che nei tumori maligni la risposta immunitaria sia meno intensa o, per qualche ragione non nota, inefficace [54]. Recentemente alcuni autori hanno dimostrato, al contrario degli studi precedenti, che l'espressione di HLA di tipo II sembrerebbe avere un significato prognostico positivo e che sia dovuto alla maggiore attivazione immunitaria delle cellule reticolari [58,59].

In conclusione l'algoritmo della reticolina sembra essere un strumento promettente nella diagnosi e nella stratificazione dei tumori adrenocorticali in età pediatrica. Da questo punto di vista, necessita sicuramente di una validazione con una analisi prospettica su un

numero più ampio di pazienti. E' doveroso dire che al momento attuale, mancando una terapia medica efficace e mirata al trattamento della malattia sistemica e/o alla prevenzione delle recidive, la sua applicazione ha soprattutto un valore prognostico. In secondo luogo, ulteriori studi sulla distruzione della membrane basale e sul meccanismo ad essa sottostante possono condurre ad una maggiore comprensione del comportamento di questi tumori, in particolar modo quando particolarmente aggressivi, e all'identificazione di possibili futuri target terapeutici.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. *Childhood Adrenocortical Tumors*. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(7):2027-2031
2. Wieneke JA, Thompson LDR, Heffess CS. *Adrenal Cortical Neoplasm in the Pediatric Population. A Clinicopathologic and Immunophenotypic Analysis of 83 Patients* Am J Surg Pathol 2003; 27(7):867-881
3. Lack EE. *Tumors of the Adrenal Gland and Extra Adrenal Paraganglia* in: Atlas of Tumor Pathology (vol. 19). Armed Forces Institute of Pathology Washington, 1997, pp 91-168
4. Magro G, Esposito G, Cecchetto G, et al. *Pediatric adrenocortical tumors: morphological diagnostic criteria and immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase type 2 and human leucocyte-associated antigen (HLA) class II antigens. Results from the Italian Pediatric Rare Tumor (TREP) Study project*. Hum Pathol 2012;43:31-39
5. Volante M, Bollito E, Sperone P, et al. *Clinicopathological study of a series of 92 adrenocortical carcinomas: from a proposal of simplified diagnostic algorithm to prognostic stratification*. Histopathology. 2009;55:535-543
6. Duregon E, Fassina A, Volante M, et al. *The reticulin algorithm for adrenocortical tumor diagnosis: a multicentric validation study on 245 unpublished cases*. Am J Surg Pathol. 2013;37:1433-1440
7. Dall'Igna P, Virgone C, De Salvo GL, et al. *Adrenocortical tumors in italian children: analysis of clinical characteristics and p53 status. Data from the national registries*. J Pediatr Surg
8. Ferrari A, Bisogno G, De Salvo GL, et al. *The Challenge of Very Rare Tumors in Childhood: The Italian TREP Project* Eur J Cancer 2007; 43:654-659

9. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. *Adrenal Cortical Carcinoma* J Urol 1978; 120:660-665
10. Ribeiro RC, Figueiredo B. *Childhood Adrenocortical Tumours* Eur J Cancer 2004; 40:1117-1126
11. Sbragia L, Oliveira-Filho AG, Vassallo J, et al. *Adrenocortical Tumors in Brazilian Children: Immunohistochemical Markers and Prognostic Factors* Arch Pathol Lab Med 2005; 129:1127-1131
12. Rodriguez-Galindo C, Figueiredo B, Zambetti G, et al. *Biology, Clinical Characteristics, and Management of Adrenocortical Tumors in Children* Pediatr Blood Cancer 2005; 45:265-273
13. Parigi GB, Siracusa F, Cecchetto G, et al. *Carcinoma Adrenocorticale: dati da uno studio retrospettivo nazionale* Rass It Chir Ped 1995; 37:109-115
14. Lack EE. *Recommendations for the Reporting of Tumors of the Adrenal Cortex and Medulla* Virchows Arch 1999; 435:87-91
15. Das S, Sengupta M, Islam N, Roy P, et al. *Weineke criteria, Ki-67 index and p53 status to study pediatric adrenocortical tumors: Is there a correlation?* J Pediatr Surg. 2016;51:1795-1800.
16. Chatterjee G, DasGupta S, Mukherjee G, et al. *Usefulness of Wieneke criteria in assessing morphologic characteristics of adrenocortical tumors in children.* Pediatr Surg Int. 2015;31:563-71.
17. Bornstein P, Sage H. *Structurally distinct collagen types.* Ann. Rev. Biochem. 1980;48, 957-1003.
18. von der Mark K. *Localization of collagen types in tissue.* Connect. Tissue Res. 1981;9, 265-324.

19. Jackson DS, Williams G. *Nature of reticulin*. *Nature*. 1956;178:915–916.
20. Papotti M, Volante M, Bussolati G. *Applied histochemistry in disorders of the endocrine system*. In Wick MR ed. *Diagnostic histochemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008;280–306
21. Jarzembowski J, Lloyd R, McKeever P. *Type IV collagen immunostaining is a simple, reliable diagnostic tool for distinguishing between adenomatous and normal pituitary glands*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007;131:931–935
22. Lefkowitz JH. *Special stains in diagnostic liver pathology*. *Semin Diagn Pathol.* 2006 Aug-Nov;23(3-4):190-8.
23. Kjellman M, Larsson C, Bäckdahl M. *Genetic Background of Adrenocortical Tumor Development* *World J Surg* 2001; 25:948-956
24. Smith AC, Choufani S, Ferreira JC, et al. *Growth Regulation, Imprinted Genes, and Chromosome 11p15.5* *Pediatr Res* 2007; 61(5):1-5
25. Ogita S, Tokiwa K, Takahashi T, et al. *Adrenocortical Carcinoma in a Child with Congenital Hemihypertrophy* *Z Kinderchir* 1989; 44:166-168
26. Rahman N. *Mechanisms predisposing to childhood overgrowth and cancer* *Curr Opin Gen Develop* 2005; 15:227-233
27. Boikos SA, Statakis CA. *Carney Complex: Pathology and Molecular Genetics* *Neuroendocrinology* 2006; 83:189-199
28. Boikos SA, Stratakis CA. *Carney complex: the first 20 years* *Curr Opin Oncol* 2007; 19:24-29
29. Waldmann J, Bartsch DK, Kann PH, et al. *Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening* *Langenbeck's Arch Surg* 2007; DOI 10.1007/soo423-006-0124-7

30. Varley JM. *Germline TP53 Mutations and Li-Fraumeni Syndrome* Hum Mutat 2003; 21:313-320
31. Cavalier ME, Davis MM, Croop JM. *Germline p53 Mutation Presenting as Synchronous Tumors* J Pediatr Hematol Oncol 2005; 27:441-443
32. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. *An inherited p53 mutation that contribute in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma* PNAS 2001; 98: 9339-9335
33. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. *A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer* Nature Struct Biol 2002; 9(1):12-16
34. Figueiredo B, Sandrini R, Zambetti G, et al. *Penetrance of adrenocortical tumors associated with the germline TP53 R337H mutation* J Med Genet 2006; 43:91-96
35. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares Fragoso MC, et al. *Deletion Mapping of Chromosome 17 in Benign and Malignant Adrenocortical Tumors Associated with the Arg337His Mutation of the p53 Tumor Suppressor Protein* J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:2976-2981
36. Letouzé E, Rosati R, Komechen H, et al. *SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes.* J Clin Endocrinol Metab. 2012;97:E1284-1293
37. Longui CA, Lemos-Marini S, Figueiredo B, et al. *Inhibin  $\alpha$ -subunit (INHA) gene and locus change in paediatric adrenocortical tumors from TP53 R337H mutation heterozygote carriers* J Med Genet 2004;41:354-359
38. Zhang PJ, Genega EM, Tomaszewski JE, et al. *The Role of Calretinin, Inhibin, Melan-A, BCL-2, and C-kit in Differentiating Adrenal Cortical and Medullary Tumors: A Immunohistochemical Study* Mod Pathol 2003;16:591-597

39. Orhan D, Kale G, Çağlar M, et al. *Histone mRNA in situ Hybridization and Ki 67 Immunohistochemistry in Pediatric Adrenocortical Tumors* Virchows Arch 2006;448:591-596
40. Gross DJ, Munter G, Bitan M, et al. *The Role of Imatinib Mesylate (Glivec) for Treatment of Patients with Malignant Endocrine Tumors Positive for C-kit or PDGF-R* Endocrine-Related Cancer 2006;13:535-540
41. Koch CA, Gimm O, Vortmeyer A, et al. *Does The Expression of c-kit (CD117) in Neuroendocrine Tumors Represent a Target for Therapy?* Ann NY Acad Sci 2006;1073:517-526
42. Cao D, Antonescu C, Wong G, et al. *Positive immunohistochemical staining of KIT in solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas is not associated with KIT/PDGFRA mutations* Mod Pathol 2006;19:1157-1163
43. Kjellman M, Enberg U, Höög A, et al. *Gelatinase A and Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase mRNA: Expressed in Adrenocortical Cancers but not in Adenomas* World J Surg 1999;23:237-242
44. Volante M, Sperone P, Bollito E, et al. *Matrix metalloproteinase type 2 expression in malignant adrenocortical tumors: diagnostic and prognostic significance in a series of 50 adrenocortical carcinomas* Mod Pathol 2006;19:1563-1569
45. Kamio T, Shigematsu K, Sou H, et al. *Immunohistochemical Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Human Adrenocortical Carcinoma* Hum Pathol 1990;21:277-282
46. Sasano H, Suzuki T, Shizawa S, et al. *Transforming Growth Factor  $\alpha$ ; Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor expression in Normal and Diseased human Adrenal Cortex by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization* Mod Pathol 1994;7:741-746

47. Lee J, Jang KT, Ki CS, et al. *Impact of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Kinase Mutations, EGFR Gene Amplifications, And KRAS Mutations on Survival of Pancreatic Adenocarcinoma* Cancer 2007;109:1561-1569
48. Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, et al. *Mechanisms of EGFR Gene Transcription Modulation: Relationship to Cancer Risk and Therapy Response* Clin Cancer Res 2006;12:7251-7260
49. Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, et al. *Polymorphisms, Mutations, and Amplifications of the EGFR Gene in Non-Small Cell Lung Cancer* PLoS Med 2007;4:e125
50. Pianovsky M, Cavalli L, Figueiredo B, et al. *SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumors* Eur J Cancer 2006;42:1040-1043
51. Luciani P, Ferruzzi P, Arnaldi G, et al. *Expression of the novel Adrenocorticotropin-Responsive Gene Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 in the Normal Adrenal Cortex and in Adrenocortical Adenomas and Carcinomas* J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1332-1339
52. Slater EP, Diehl SM, Langer P, et al. *Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors* Eur J Endocrinol 2006;154:587-598
53. Giordano TJ, Thomas D, Kuick R, et al. *Distinct Transcriptional Profiles of Adrenocortical Tumors Uncovered by DNA Microarray Analysis* Am J Pathol 2003;162:521-531
54. West AN, Neale GA, Pounds S, et al. *Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors* Cancer Res 2007;67:600-608
55. Marx C, Wolkersdörfer GW, Brown JW, et al. *MHC Class II Expression - A New Tool to Assess Dignity in Adrenocortical Tumors* J Clin Endocrinol Metab 1996;81:4488-4491

56. Marx C, Bornstein S, Wolkersdörfer GW, et al. *Relevance of Major Histocompatibility Complex Class II Expression as a Hallmark for the Cellular Differentiation in the Human Adrenal Cortex* J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3136-3140
57. Wolkersdörfer GW, Marx C, Brown J, et al. *Prevalence of HLA-DRB1 Genotype and Altered Fas/Fas Ligand Expression in Adrenocortical Carcinoma* J Clin Endocrinol Metab 2005;90:1768-1774
58. Leite FA, Lira RC, Fedatto PF, et al. *Low expression of HLA-DRA, HLA-DPA1, and HLA-DPB1 is associated with poor prognosis in pediatric adrenocortical tumors (ACT)*. Pediatr Blood Cancer. 2014;61:1940-8.
59. Pinto EM, Rodriguez-Galindo C, Choi JK, et al. *Prognostic Significance of Major Histocompatibility Complex Class II Expression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A St. Jude and Children's Oncology Group Study*. Clin Cancer Res. 2016 Jun 15. (epub ahead of print)
60. Wooten MD, King DK. *Adrenal Cortical Carcinoma: Epidemiology and Treatment with Mitotane and a Review of the Literature* Cancer 1993;72:3145-3155
61. Sabbaga CS, Avilla S, Schulz C, et al. *Adrenocortical Carcinoma in Children: Clinical Aspects and Prognosis* J Pediatr Surg 1993;28:841-843
62. Narasimhan KL, Samujh R, Bhansali A, et al. *Adrenocortical Tumors in Childhood* Pediatr Surg Int 2003;19:432-435
63. Michalkiewicz E, Sandrini R, et al. *Clinical and Outcome characteristic of Children with Adrenocortical Tumors: A Report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* J Clin Oncol 2004;22:838-845

64. Ambrosi B, Dall'Asta C. *Malattie del Coricosurrene* in: *Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo*. Faglia G eds McGraw-Hill publ Milano, 2002, pp 185-224
65. Cordera F, Grant C, van Heerden J, et al. *Androgen-secreting adrenal tumors* Surgery 2003;134:874-880
66. Bonfig W, Bittmann I, Bechtold S, et al. *Virilising adrenocortical tumours in children* Eur J Pediatr 2003;162:623-628
67. Masiakos PT, Flynn Ce, Donahoe PK. *Masculinizing and Feminilizing Syndromes Caused by Functioning Tumors* Sem Pediatr Surg 1997;6:147-155
68. Andreoni B, Beck-Peccoz P, Radice F. *Neoplasie del Surrene* in: *Manuale di Oncologia Chirurgica*. Staudacher V, Veronesi U, Andreoni B, Costa A eds Masson publ Milano, 1994, pp 771-784
69. Press M. *Syndromes of Cortcosteroid Excess* in: *Surgical Endocrinology*. Lynn J, Bloom SR eds Butterworth-Heinemann publ Oxford, 1993, pp.411-425
70. Dickson BA, Franks RC. *Aldosterone-producing adenoma presenting with hypokaliemic myopathy. Case report and review*. Clin Pediatr 1988;27:344-347
71. Baranwal AK, Singhi SC, Narshimhan KL, et al. *Aldosterone-producing Adrenocortical Adenoma in Childhood: A Case Report* J Pediatr Surg 1999;34:1878-1890
72. Abasiyanik A, Oran B, Kaymakçi A, et al. *Conn Syndrome in a Child, Caused by Adrenal Adenoma* J Pediatr Surg 1996;31:430-432
73. Lin JT, Shu SG, Chi CS. *Aldosterone-secreting adrenal cortical adenoma in an 11-years old child and collective review of the literature* Eur J Pediatr 1994;153:715-717



74. Hsiao HP, Chao MC, Lin CY, et al. *Feminizing adrenocortical adenoma presenting as heterosexual precocious puberty: report of one case* Acta Pediatr Taiwan 2005;46:97-100
75. Comite F, Schiebinger RJ, Albertson BD, et al. *Isosexual precocious puberty secondary to a feminizing adrenal tumor* J Clin Endocrinol Metab 1984;58:435-440
76. Allolio B, Hanher S, Weismann D, et al. *Management of adrenocortical carcinoma* Clin Endocrinol 2004;60:273-287
77. Federici S, Galli G, Ceccarelli PI, et al. *Adrenocortical Tumors in Children: A Report of 12 Cases* Eur J Pediatr Surg 1994;4:21-25
78. Ciftci AO, Şenocak ME, Tanyel FC, et al. *Adrenocortical Tumors in Children* J Pediatr Surg 2001;36:549-554
79. Bergadà I, Venara M, Maglio S, et al. *Functional Adrenal Cortical Tumors in Pediatric Patients: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of a Long Term Follow-up Series* Cancer 1996;77:771-777
80. Mayer Sk, Oligny LL, Deal C, et al. *Childhood Adrenocortical Tumors: Case Series and Reevaluation of Prognosis - A 24-Year Experience* J Pediatr Surg 1997;32:911-915
81. Klein JD, Turner CG, Gray FL, et al. *Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome.* J Pediatr Surg. 2011;46:1201-1207
82. Hanna AM, Pham TH, Askegard-Giesmann JR, et al *Outcome of adrenocortical tumors in children.* J Pediatr Surg. 2008;43:843-849.
83. Sakoda A, Mushtaq I, Levitt G, et al. *Clinical and histopathological features of adrenocortical neoplasms in children: retrospective review from a single specialist center.* J Pediatr Surg. 2014;49:410-415

84. Ahmed AA. *Adrenocortical neoplasms in young children: age as a prognostic factor.* Ann Clin Lab Sci. 2009;39:277-282
85. McAteer JP, Huaco JA, Gow KW. *Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study.* J Pediatr Surg. 2013;48:1025-1031.
86. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PV, et al. *Tumors of Endocrine Organs* in: WHO Classification of Tumors IARC Press publ, Lyon 1994, pp 135-172
87. Brennan MF. *Adrenocortical Carcinoma* Cancer 1987;37:348-365
88. Hughes S, Lynn J. *Surgical Anatomy and Surgery of the Adrenal Glands* in: Surgical Endocrinology. Lynn J, Bloom SR eds Butterworth-Heinemann publ Oxford, 1993, pp 458-467
89. Chiche L, Dousset B, Kieffer E, et al. *Adrenocortical carcinoma extending into the inferior vena cava: Presentation of a 15-patient series and review of the literature* Surgery 2006;139:15-27
90. Schulick RD, Brennan MF. *Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma* Ann Surg Oncol 1999;6:719-726
91. Kalady MF, McKinlay R, Olson JA, et al. *Laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma: a comparison to aldosteronoma and incidentaloma* Surg Endosc 2004;18:621-625
92. Pisanu A, Cois A, Montisci A, et al. *Current indications for laparoscopic adrenalectomy in the era of minimally invasive surgery* Chir Ital 2004;56:313-320
93. Bennet IC, Ray M. *Hand-assisted laparoscopic adrenalectomy: an alternative minimal invasive surgical technique for the adrenal gland* ANZ J Surg 2002;72:801-805

94. Palazzo FF, Sebag F, Sierra M, et al. *Long-term outcome following laparoscopic adrenalectomy for large solid adrenal cortex tumors* World J Surg 2006;30:893-898
95. Liao C, Chueh S, Lai M, et al. *Laparoscopic adrenalectomy for potentially malignant adrenal tumors greater than 5 centimeters* J Clin Endocrinol Metab 2006;91:3080-3083
96. Walz M, Petersenn S, Koch J, et al. *Endoscopic treatment of large primary adrenal tumours* Brit J Surg 2005;92:719-723
97. Heloury Y, Muthucumaru M, Panabokke G, et al. *Minimally invasive adrenalectomy in children.* J Pediatr Surg. 2012;47:415-21
98. Allolio B, Fassnacht M. *Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update* J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2027-2037
99. Williamson SK, Lew D, Miller G, et al. *Phase II evaluation of Cisplatin and etoposide followed by Mitotane at disease progression in patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma* Cancer 2000;88:1159-1165
100. Abiven G, Coste J, Groussin L, et al. *Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients* J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2650-2655
101. Schteingart DE. *Adjuvant Mitotane Therapy of Adrenal Cancer - Use and Controversy* N Engl J Med 2007;356:2415-2418
102. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, et al. *Adjuvant Mitotane Treatment for Adrenocortical Carcinoma* N Engl J Med 2007;356:2372-2380
103. Berruti A, Terzolo M, Pia A, et al. *Mitotane associated with etoposide, doxorubicin and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma* Cancer 1998;83:2194-2200

104. Masiakos P, Gerstle J, Cheang T, et al. *Is surgery necessary for incidentally discovered adrenal masses in children?* J Pediatr Surg 2004;39:754-758
105. Stewart JN, Flageole H, Kavan P. *A surgical approach to adrenocortical tumors in children: the mainstay of treatment* J Pediatr Surg 2004;39:759-763
106. Kadamba P, Hahib Z, Rossi L. *Experience with laparoscopic adrenalectomy in children* J Pediatr Surg 2004;39:764-767
107. Ammourey RF, Heptulla R, Tatevian N, Elenberg E, et al. *Laparoscopic adrenalectomy of adrenal adenoma with myelolipoma relieves severe hypertension in a 16-years old patient* Pediatr Nephrol 2006;21:433-436
108. Tobias-Machado M, Cartum J, Santos-Machado T, et al. *Retroperitoneoscopic adrenalectomy in a infant with virilizing adrenocortical tumor* Rev Paul Med 2002;120:87-89
109. Zancanella P, Pianovski MAD, Oliveira B, et al. *Mitotane associated with Cisplatin, Etoposide, and Doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma* J Pediatr Hematol Oncol 2006;28:513-524
110. Bisogno G, Ferrari A, Bien E, et al. *Rare cancers in children - The EXPeRT Initiative: a report from the European Cooperative Study Group on Pediatric Rare Tumors.* Klin Padiatr. 2012;224:416-20
111. Ferrari A, Schneider DT, Bisogno G, EXPeRT Board. *The founding of the European Cooperative Study Group on Pediatric Rare Tumors--EXPeRT.* Expert Rev Anticancer Ther. 2013;13:1-3
112. Redlich A, Boxberger N, Strugala D, et al. *Systemic treatment of adrenocortical carcinoma in children: data from the German GPOH-MET 97 trial.* Klin Padiatr. 2012;224:366-371

113. Hubertus J, Boxberger N, Redlich A, et al. *Surgical aspects in the treatment of adrenocortical carcinomas in children: data of the GPOH-MET 97 trial*. *Klin Padiatr*. 2012;224:143-7
114. Ribeiro RC, Pinto EM, Zambetti GP, et al. *The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors*. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:37-43.
115. Rodriguez-Galindo C. *Treatment of childhood adrenocortical carcinoma (ACC) with surgery plus retroperitoneal lymph node dissection (RPLND) and multiagent chemotherapy: Results of the Children's Oncology Group ARAR0332 protocol*. *J Clin Oncol* 2016;34:suppl; abstr 10515 (ASCO 2016 annual meeting)
116. Pastore G, De Salvo GL, Bisogno G et al. *Evaluating Access to Pediatric Cancer Care Centers of Children and Adolescents with Rare Tumors in Italy: the TREP Project*. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:152-155
117. Shulick RD, Brennan MF. *Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma*. *Ann Surg Oncol* 1999; 6:719-726
118. De León DD, Lange BJ, Walterhouse D, et al. *Long-term (15 years) outcome in an infant with metastatic adrenocortical carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4452-4456
119. Tucci A Jr, Martins ACP, Haylton JS et al. *The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma*. *J Urol* 2005;174:2338-2342
120. Rescorla FJ. *Malignant adrenal tumors*. *Semin Pediatr Surg* 2006;15:48-56
121. Weiss LM. *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenal cortical tumors*. *Am J Surg Pathol* 1984;8:163-169

122. Dehner LP, Hill DA. *Adrenal cortical neoplasms in children: why so many carcinomas and yet so many survivors?* *Pediatr Develop Pathology* 2009;12:284-291
123. Faria AM, Almeida MQ. *Differences in the molecular mechanism of adrenocortical tumorigenesis between children and adults.* *Mol Cell Endocrinology* 2012;351:52-57
124. Dehner LP. *Pediatric adrenocortical neoplasms.* *Am J Surg Path* 2003;27:1005-1007
125. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL Jr. *Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma.* *Am J Surg Pathol* 1989;13:202-206
126. Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, et al. *Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors.* *Am J Clin Pathol* 1994;101:625-629
127. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, et al. *Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study.* *Histopathology.* 2016;68:905-15.
128. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, et al. *Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtualmicroscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE.* *Am J Surg Pathol.* 2012;36:1194–1201.
129. Mearini L, Del Sordo R, Costantini E, et al. *Adrenal oncocytic neoplasm: a systematic review.* *Urol Int.* 2013;91:125-33.
130. Duregon E, Volante M, Bollito E, et al. *Pitfalls in the diagnosis of adrenocortical tumors: a lesson from 300 consultation cases.* *Hum Pathol.* 2015;46:1799-807.

131. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, et al. *Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults.* J Clin Endocrinol Metab. 2010;95:1458-62.
132. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, et al. *Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer.* Mol Endocrinol. 2007;21:2968-87.
133. Doghman M, Arhatte M, Thibout H, et al. *Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors.* J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:3253-60.