



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Metodologia Clinica e Scienze Endocrinologiche

CICLO 21°

## **Ruolo dei recettori dell'LH e del GnRH nell'iperaldosteronismo primitivo: studi clinici e molecolari**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Franco Mantero

**Dottorando:** Paola Sartorato

AA 2007/2008

## INDICE

<i>Summary</i> .....	4
<i>Riassunto</i> .....	6
<i>Introduzione</i>	
1. La regolazione della secrezione dell'aldosterone nel surrene normale.....	8
2. L'iperaldosteronismo primitivo .....	13
3. I recettori ectopici nella corticale surrenalica: evidenze <i>in vivo</i> ed <i>in vitro</i> .....	22
I. Il recettore del GIP.....	24
II. Il recettore della vasopressina.....	25
III. Il recettore della serotonina.....	26
IV. I recettori dell' LH/hCG e del GnRH.....	27
4 I meccanismi molecolari dei recettori ormonali ectopici.....	29
<i>Scopo dello studio</i> .....	32
<i>Materiali e Metodi</i> .....	34
<i>Risultati</i> .....	38
<i>Discussione</i> .....	46
<i>Conclusioni</i> .....	52
<i>Bibliografia</i> .....	54



## SUMMARY

Primary aldosteronism (PA) is characterized by a chronic, excessive and autonomous adrenal aldosterone secretion. The mechanism causing steroids production in adrenal adenoma and hyperplasia remains poorly defined. Within the adrenal gland, ectopic expression of G-protein-coupled receptors (GPCRs) has been shown to cause excessive production of cortisol in some cases of ACTH-independent Cushing's syndrome. Recently, it has been demonstrated that some GPCRs (serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor, V<sub>1</sub>-vasopressin receptor, GIP receptor, LH/hCG and GnRH receptors) are abnormally expressed in aldosteronomas.

The aim of our study was to investigate the role of LH-GnRH receptors as potential regulators of aldosterone secretion. We first investigated a patient (index case) with new diagnosis of PA during pregnancy and then extended our study to a wider group of patients to evaluate through, *in vivo* and molecular analysis, the possible clinical fallout of the data previously reported.

A GnRH stimulation test was performed in 12 patients affected by PA and in 5 controls. In the index case we also measured aldosterone levels after chorionic gonadotropin and a long-acting GnRH analogue. RTPCR was performed to evaluate GnRH and LH receptors in 23 PA and 6 normal tissues. Immunohistochemistry was done in 16 and 7 samples for LH and GnRH receptors respectively.

*In vivo* GnRH test showed a variable increase of aldosterone levels in 10 patients with a positive response (>50%) in 3 of them (in 2 higher than 100%). An increase of plasma aldosterone was also observed after chorionic gonadotropin injection and Triptorelin administration in the index case. Aldosterone levels were not modified by GnRH infusion in control subjects. RT-PCR showed the presence of LH receptor in 22 out of 23 PAs and in normal tissues with comparable levels. GnRH receptor was detected at low levels in normal tissues whereas 7 PA tissues presented an expression significantly higher than normal adrenal glands. Two single APA samples exhibited the highest GnRH receptor expression (95-fold and 109-fold). Immunostaining identified the presence of the LHR protein in 12/16 PA and GnRHR protein in 7/7 APA tissues. In the index case GnRH staining was positive mainly in the aldosteronoma and lesser in the adjacent adrenal.

In conclusion, we observed that in a high percentage of patients with PA, plasma aldosterone seems to respond variably to GnRH stimulation; in a subset of patients, aldosterone response is significantly elevated. Molecular and immunohistochemical studies for LH receptor showed a

similar expression in normal and tumoral tissues. The expression of GnRH receptor was significantly elevated in a subgroup of patients with PA compared to normal adrenal glands. In the index case, clinical and molecular data suggest that during pregnancy the patient may have been exposed to high levels of placental GnRH that can potentially activate the overexpressed adrenal GnRH receptor. These results support the concept of LH or GnRH dependent aldosterone secretion in a subset of patients with APA and IHA. The use of GnRH test in patients with a suggestive medical history (pregnancy, menopause, primary hypogonadism) can provide useful data to clarify PA pathogenesis and for the clinical follow-up.

## RIASSUNTO

L'iperaldosteronismo primitivo (PA) è caratterizzato da una cronica, eccessiva e autonoma secrezione di aldosterone da parte delle ghiandole surrenaliche. I meccanismi che guidano la sintesi degli steroidi negli adenomi e nelle iperplasie surrenaliche rimangono da chiarire. Recenti studi hanno dimostrato che in alcuni casi di sindrome di Cushing ACTH indipendente la secrezione di cortisolo può essere regolata dalla presenza di recettori ormonali illeciti legati alle proteine G (GPCR) espressi nel tessuto surrenalico. Recenti studi molecolari suggeriscono che alcuni GPCR (il recettore serotoninergico 5-HT<sub>4</sub>, il recettore per la vasopressina V<sub>1</sub>, il recettore per il GIP, e i recettori per LH/hCG e per GnRH) possono essere espressi in maniera aberrante anche in tumori surrenalici secernenti aldosterone.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di approfondire il ruolo dei recettori dell'LH e del GnRH come potenziali regolatori dell'iperincretione di aldosterone. Il lavoro si è svolto partendo dallo studio clinico di una paziente affetta da PA insorto in gravidanza (caso indice) e successivamente esteso ad una casistica più ampia di pazienti per indagare attraverso test *in vivo* e studi molecolari la possibile ricaduta clinica dei dati molecolari finora riportati in letteratura.

Per effettuare questo lavoro abbiamo valutato la risposta *in vivo* dell'aldosterone al GnRH in 12 pazienti affetti da PA e in 5 soggetti sani; nel caso indice abbiamo valutato la risposta dell'aldosterone plasmatico anche dopo gonadotropina corionica e un analogo long-acting del GnRH. Abbiamo studiato l'espressione tissutale attraverso *Real Time* PCR dei recettori dell'LH/hCG e del GnRH in 23 tessuti patologici e in 6 surreni sani; l'indagine immunohistochimica per i due recettori è stata condotta rispettivamente in 16 adenomi per il recettore LH/hCG e in 7 per il recettore del GnRH. Il Test al GnRH ha documentato un incremento variabile dei livelli di aldosterone in 10 sui 12 pazienti studiati con una risposta positiva (>50%) in 3 casi in due dei quali l'incremento è stato superiore al 100%. Il caso indice ha evidenziato una risposta positiva dell'aldosterone anche dopo gonadotropina corionica mentre dopo triptorelina si è osservata un progressivo aumento dei livelli plasmatici di aldosterone. In nessuno dei soggetti di controllo vi è stato un incremento dei livelli di aldosterone dopo stimolo. Lo studio del recettore per LH attraverso RTPCR ha evidenziato la presenza del recettore nei surreni normali e in 22 su 23 campioni patologici con dei livelli di espressione comparabili tra i due gruppi. Il recettore per il GnRH è risultato essere presente nei surreni normali anche se con un valore medio

di espressione molto basso mentre in 7 tessuti patologici l'espressione del gene è risultata significativamente elevata (in due casi di 95 e 109 volte rispetto al tessuto surrenalico normale). L'analisi immunohistochimica ha identificato il recettore dell'LH in 12 su 16 casi di aldosteronoma e il recettore del GnRH in tutti e 7 i campioni studiati. La paziente del caso indice presentava una intensa positività per il recettore del GnRH del tessuto adenomatoso e meno nel tessuto peritumorale circostante. In conclusione, nella nostra casistica, in un'elevata percentuale di pazienti con PA l'aldosterone plasmatico sembra rispondere, seppur in modo variabile, allo stimolo con GnRH; in un sottogruppo di pazienti la percentuale di risposta dell'ormone è significativamente elevata. Gli studi molecolari e di immunohistochimica condotti per il recettore dell'LH hanno evidenziato che si tratta di un recettore che oltre che presentare un'espressione eutopica è presente anche nella maggior parte dei tessuti patologici con dei livelli di espressione simili. L'espressione del recettore del GnRH è risultata significativamente elevata in un sottogruppo di pazienti affetti da PA rispetto ai surreni normali. I dati molecolari e di immunohistochimica e i risultati dei test condotti in vivo nel pre e nel post operatorio del caso indice suggeriscono che durante la gravidanza la paziente possa essere stata esposta ad elevati livelli di GnRH di origine placentare in grado potenzialmente di attivare i recettori surrenalici del GnRH iperespressi. I risultati del nostro lavoro supportano l'ipotesi che in un sottogruppo di pazienti affetti da PA la secrezione di aldosterone possa essere LH o GnRH dipendente. L'utilizzo del test al GnRH in pazienti con una storia clinica suggestiva (gravidanza, menopausa, ipogonadismo primitivo) potrebbe fornire dati utili per chiarire la patogenesi dell'iperaldosteronismo e per il successivo follow-up clinico.

# INTRODUZIONE

## LA REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE DI ALDOSTERONE NEL SURRENE NORMALE

Nel 1953 Simpson e Tait per primi isolarono l'aldosterone da ghiandole surrenaliche animali, un anno dopo fu descritta la struttura dell'aldosterone e due anni dopo Conn descrisse per la prima volta un quadro clinico caratterizzato dalla coesistenza di elevati livelli di aldosterone, tumore surrenalico, ipertensione arteriosa e ipopotassiemia, quello che oggi viene definito iperaldosteronismo primitivo.

L'aldosterone è il principale ormone ad attività mineralcorticoide sintetizzato nella zona glomerulare surrenalica; è l'unica zona della corteccia surrenalica priva dell'enzima 11-idrossilasi, enzima chiave per la sintesi del cortisolo, e nella quale è presente l'enzima aldosterone sintasi (Fig 1). I precursori dell'aldosterone: il 18-idrossicorticosterone, il corticosterone e il desossicorticosterone hanno debole attività mineralcorticoide e possono essere sintetizzati in tutte e tre le zone della corteccia surrenalica anche se il 18-idrossicorticosterone è sintetizzato soprattutto nella glomerulosa e pertanto la sua secrezione correla con quella dell'aldosterone; il corticosterone e il desossicorticosterone sono prodotti soprattutto nella zona fasciolata e la loro secrezione correla con il cortisolo ed è ACTH dipendente. L'enzima aldosterone sintasi è un citocromo P450 multifunzionale che si trova nella membrana mitocondriale interna e che catalizza tre successivi passaggi di metil-ossidazione e ossidazione. La sintesi dell'aldosterone avviene a partire dal colesterolo che è convertito successivamente in pregnenolone, progesterone, 11-deossicorticosterone, corticosterone, 18-idrossicorticosterone ed infine in aldosterone (1).

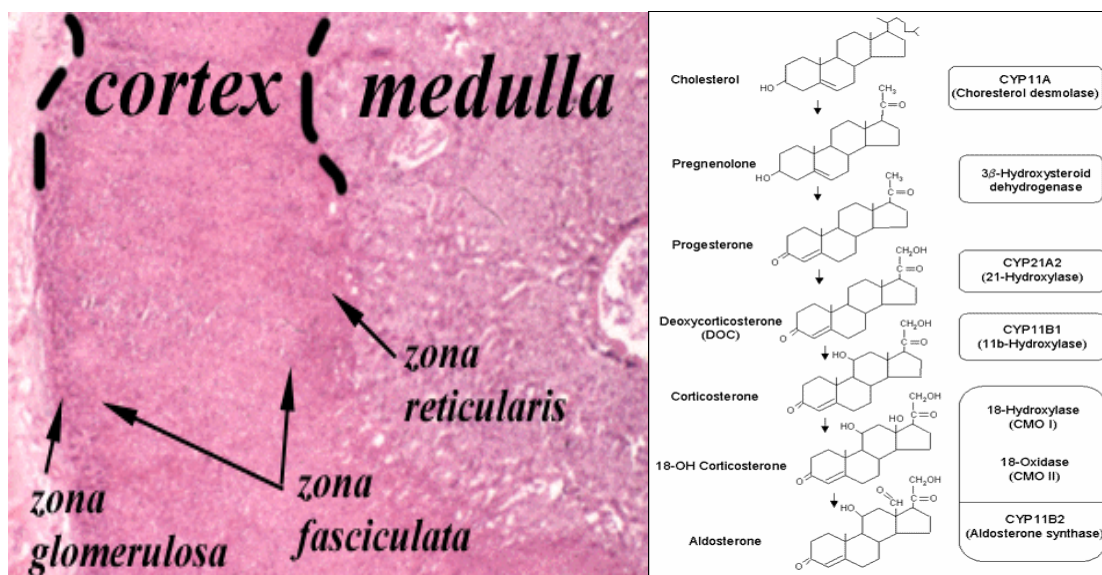
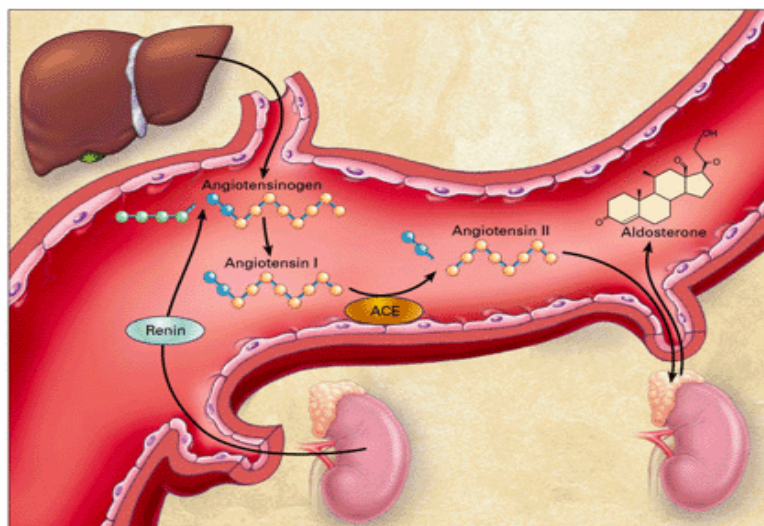


Figura 1. Rappresentazione della corticale del surrene e delle tappe della biosintesi dell'aldosterone



I principali stimoli alla secrezione di aldosterone sono l'angiotensina II e il potassio mentre giocano un ruolo secondario il sodio, il calcio, il magnesio, l'ACTH, altri peptidi derivati dal POMC e altri agenti quali dopamina, vasopressina, serotonina e somatostatina.

La secrezione di aldosterone nella zona glomerulare risente in maniera predominante della regolazione da parte del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS- Fig.2). La renina è un enzima prodotto dall'apparato iuxtaglomerulare dei glomeruli renali a partire dalla prorenina e agisce sull'angiotensinogeno, un polipeptide prodotto dal fegato, trasformandolo in un decapeptide, l'angiotensina I. L'angiotensina I viene a sua volta idrolizzata in angiotensina II attraverso l'azione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), il quale viene sintetizzato in maniera predominante a livello polmonare. L'angiotensina II legandosi ai suoi recettori specifici, AT1R e AT2R, stimola la vasocostrizione periferica, l'aumento della matrice extracellulare, l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei monociti, il rilascio di adrenalina dal sistema simpatico e il rilascio di noradrenalina dalla midollare surrenalica, la sintesi di NO e prostaglandine e l'apoptosi; d'altra parte inibisce il rilascio di renina, di prolattina e di ADH. Tra le sue azioni principali l'angiotensina II stimola la produzione di aldosterone nella glomerulare del surrene e solo in condizioni di soppressione della stessa, come avviene nell'iperaldosteronismo primitivo, l'aldosterone può risentire in modo predominante dell'influsso delle variazioni circadiane dell'ACTH. L'azione dell'angiotensina II sulla glomerulosa surrenalica è mediata da recettori di membrana ad alta affinità che sono accoppiati a una o più proteine G. Il primo meccanismo di trasduzione del segnale intracellulare è l'attivazione della fosfolipasi C con conseguente attivazione della protein-chinasi c e il conseguente incremento dei livelli intracellulari di calcio, questi eventi avviano quindi i successivi passaggi di conversione del corticosterone in aldosterone (2). I livelli circolanti di renina rappresentano la tappa limitante di questo processo e la sua sintesi è controllata dalla pressione del flusso arteriolare renale, dalla concentrazione del sodio nel fluido tubulare percepito dalla macula densa e dall'attività del sistema nervoso simpatico renale. Fattori che riducono il flusso renale quali la disidratazione, le emorragie, la restrizione sodica, la posizione ortostatica o la stenosi delle arterie renali aumentano i livelli di renina. Fattori che aumentano il flusso renale quali l'introito di sodio, la vasocostrizione periferica o il clinostatismo riducono la secrezione di renina (3).



**Figura 2.** Sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS)

Anche le concentrazioni sieriche di potassio hanno un ruolo importante nella regolazione della secrezione di aldosterone. L'ipokaliemia aumenta e l'iperkaliemia riduce il rilascio di renina; esiste un rapporto reciproco tra i livelli sierici di potassio e le concentrazioni di aldosterone. Il potassio aumenta direttamente la secrezione di aldosterone da parte della glomerulosa e l'aldosterone riduce i livelli di potassio, stimolando la sua escrezione a livello renale. Anche piccole modificazioni delle concentrazioni sieriche di potassio nel range di normalità interferiscono sulla secrezione di aldosterone. Un elevato apporto di potassio con la dieta aumenta la secrezione di aldosterone plasmatico (4).

La secrezione di aldosterone è regolata anche dall'introito di sodio, in parte tramite effetti indiretti sulla secrezione di renina e, in minor misura, tramite un'azione diretta sulla responsività della zona glomerulosa all'angiotensina II. Un elevato introito di sodio aumenta il volume circolante che sopprime la secrezione di renina e la sintesi di angiotensina II, mentre la deprivazione di sodio comporta un aumento della secrezione di renina. Una dieta a basso contenuto di sodio aumenta, mentre una dieta ad alto contenuto di sodio riduce, la sensibilità e l'entità della risposta dell'aldosterone all'angiotensina II sia *in vivo* che *in vitro* (5).

Tra i fattori ipofisari che regolano la secrezione di aldosterone è importante ricordare prima di tutto l'ACTH. In seguito alla somministrazione di CRH o di condizioni stressanti che determinano un incremento dei livelli di ACTH si osserva un incremento dei livelli circolanti di aldosterone plasmatico. L'effetto stimolante dell'ACTH sulla secrezione di aldosterone si osserva in acuto ma non nella somministrazione cronica; la mancanza di una risposta prolungata all'ACTH sembra dovuta ad un effetto diretto sulle cellule della glomerulosa per fenomeni di down-regulation dei recettori dell'ACTH o dei meccanismi di trasduzione post recettoriale più che per la

soppressione della renina e la riduzione dei livelli di potassio secondari all'azione mineralcorticoide del cortisolo. L'ACTH stimola la secrezione di aldosterone legandosi a specifici recettori di membrana e attivando l'adenilato-ciclastasi con conseguente incremento delle concentrazioni intracellulari di cAMP (6).

Numerose evidenze indicano che la steroidogenesi della corticale surrenalica è modulata non solo dall'ACTH ma anche da altri peptidi, neuropetidi, neurotrasmettitori, ioni e citochine (7).

Studi *in vivo* ed *in vitro* hanno chiaramente dimostrato che la vasopressina (AVP) stimola la secrezione di aldosterone e cortisolo in surreni bovini e la secrezione di aldosterone in surreni di ratto (8,9). Studi *in vitro* su surreni umani normali hanno evidenziato che l'AVP stimola la secrezione sia di aldosterone che di cortisolo legandosi ai recettori V1-AVP localizzati soprattutto nelle cellule compatte della zona reticolare e meno nelle zone glomerulosa e fascicolata (10). La stimolazione dei recettori V2-AVP, identificati anch'essi tramite RT-PCR nella corticale surrenalica, non sembra modulare la steroidogenesi (11). La vasopressina sembrerebbe avere degli effetti diretti sulla steroidogenesi corticale sia con effetto endocrino che paracrino ma il suo ruolo nella fisiologia surrenalica non è ancora stato chiarito.

Studi *in vitro* hanno evidenziato che le catecolamine hanno un effetto stimolatorio sulla secrezione di aldosterone e cortisolo in bovini e maiali e che tale effetto sarebbe mediato dai recettori  $\beta_1$ , esperimenti simili su cellule surrenaliche umane non hanno confermato tali risultati (12).

La serotonina (5-HT) è un altro neurotrasmettitore che sembrerebbe giocare un ruolo importante nel controllo della steroidogenesi. La 5-HT è in grado di stimolare direttamente la secrezione di cortisolo e aldosterone come dimostrato *in vitro* in esperimenti condotti su ratti, rane e cellule surrenaliche umane (13) ma anche indirettamente stimolando il flusso sanguigno surrenalico (14). Il sottotipo recettoriale che media tali effetti è il 5-HT<sub>4</sub>R che è in grado di attivare le vie post-recettoriali del c-AMP e del calcio (15). Studi *in vivo* condotti nell'uomo con agonisti della serotonina (cisapride e zacopride) hanno indotto un significativo incremento dei livelli di aldosterone plasmatico (16,17).

Anche i peptidi VIP e PACAP sono in grado di regolare attraverso una secrezione paracrina la steroidogenesi surrenalica nel ratto e nell'uomo, i due peptidi sono secreti dalle cellule cromaffini della midollare surrenalica (18). Il VIP stimola la secrezione di aldosterone attraverso l'attivazione di recettori specifici (VIPR2/VIPR3) mentre sembra che la secrezione del cortisolo sia mediata da una non specifica attivazione del recettore dell'ACTH (19).

La sintesi dell'aldosterone può essere inibita dalla dopamina che ha un effetto diretto indipendente dalla sua azione su prolattina, ACTH, elettroliti e sistema RAAS. Tale inibizione

sembra essere secondaria al legame diretto ai recettori dopaminergici D2 presenti a livello delle cellule della glomerulosa (20). Un altro fattore inibitorio noto è il peptide natriuretico atriale (ANP) che agisce direttamente inibendo la secrezione di aldosterone e bloccando gli effetti stimolatori di angiotensina II, potassio e ACTH in parte interferendo con il flusso intracellulare di calcio (21). Infine anche la somatostatina inibisce la produzione di aldosterone tramite il legame a siti specifici sulle cellule della glomerulosa surrenalica (22).

L'aldosterone circola per lo più legato all'albumina mentre si lega debolmente alla globulina legante i corticosteroidi a differenza degli steroidi prodotti nella zona fascicolata. La quota libera di aldosterone ammonta circa al 30-50% della quota plasmatica totale, di conseguenza si tratta di un ormone con un'emivita relativamente breve dell'ordine dei 30 minuti (23). L'aldosterone viene metabolizzato principalmente a livello epatico dove viene trasformato in tetraidroaldosterone; un altro metabolita l'aldosterone 18-glucuronide viene prodotto a livello renale e rappresenta generalmente il 5-10% dell'aldosterone secreto. Una piccola quantità di aldosterone libero viene secreta a livello urinario dove può essere dosata. La secrezione giornaliera di aldosterone varia tra 50-250 mg/die, quando l'assunzione di sodio sia nel range di 100-150 mmol al giorno.

I più noti effetti dell'aldosterone sono mediati dal recettore mineralcorticoide (24), si tratta di un recettore a localizzazione intracellulare che appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari che comprende gli altri recettori per gli ormoni steroidei, il recettore per la vitamina D, per gli ormoni tiroidei, per l'acido retinoico e un vasto numero di recettori orfani. Il recettore mineralcorticoide, in assenza di ormone, interagisce con un complesso proteico costituito da hsp90, hsp70 e immunofilline necessario per ottenere una conformazione che consenta il legame dell'ormone al recettore. L'aldosterone dopo diffusione attraverso la membrana cellulare si lega al recettore e provoca una modificazione conformazionale del recettore, la dissociazione del complesso proteico, la dimerizzazione di due complessi ormone-recettore e la successiva traslocazione nel nucleo del dimero. Il recettore attivato si lega ad una sequenza specifica del DNA detta HRE (hormones response elements) che a sua volta attiva una serie di fattori di trascrizione che modulano la sintesi delle proteine indotte dall'aldosterone. Si ritiene comunque che molti degli effetti genomici dei recettori nucleari siano HRE indipendenti, questi meccanismi sono caratterizzati meglio per il recettore dei glucocorticoidi che esercita molte delle sue azioni, in particolare quelle antiinfiammatorie, regolando i fattori di trascrizione attraverso un'interazione diretta proteina-proteina. Nelle cellule epiteliali questi effettori dell'azione mineralcorticoide regolano l'attività del canale del sodio (EnaC), localizzato sulla membrana apicale, e della Na, K-ATPasi, localizzata sulla membrana basolaterale.

L'aldosterone una volta entrato in circolo ed equilibratosi con le proteine plasmatiche raggiunge i tessuti periferici. Solo i tessuti bersaglio sono in grado di riconoscere l'ormone e rispondere ad esso, in quanto sono forniti di recettori cellulari specifici. I classici tessuti bersaglio dell'aldosterone sono rappresentati dai tessuti epiteliali (rene, intestino, ghiandole salivari e sudoripare), in questi tessuti l'ormone agisce principalmente ritenendo sodio ed eliminando potassio. In questo modo l'aldosterone contribuisce al mantenimento di un complesso meccanismo omeostatico che permette di preservare il bilancio sodico e di conseguenza la stabilità del volume del liquido extracellulare, e il mantenimento della pressione arteriosa(25). Numerosi altri tessuti, non epiteliali, esprimono il recettore mineralcorticoide e sono quindi considerati organi bersaglio dell'aldosterone (cuore, SNC, leucociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vasali, spermatozoi). L'aldosterone può essere sintetizzato anche a carico di tessuti extra-surrenali quali il tessuto cerebrale, cardiaco e i vasi sanguigni ed esercitare a questi livelli attività paracrine ed autocrine (26). Numerosi dati sperimentali e clinici pubblicati nel corso dell'ultima decade hanno riconosciuto le conseguenze che l'aldosterone ha in particolare a livello cardiaco e vascolare. Nell'animale l'eccesso di aldosterone e sodio implica marcate alterazioni cardiache e vascolari (27) e nell'uomo l'iperaldosteronismo è associato a svariate complicanze cardiache e vascolari. L'aldosterone sembra in grado di indurre processi fibrotici, in particolare a livello cardiaco, che si realizzano attraverso l'attivazione del recettore mineralcorticoide e l'induzione aldosterone-dipendente di stress ossidativi (28).

## **L'IPERALDOSTERONISMO PRIMITIVO**

L'iperaldosteronismo primitivo (PA) è considerato la più comune causa di ipertensione secondaria ed è caratterizzata da ipersecrezione primitiva di aldosterone, non conseguente cioè ad un aumento di nessuno dei suoi fattori di stimolo (in particolare la renina). Negli ultimi anni l'applicazione su vasta scala di un semplice test di screening (misura del rapporto renina/aldosterone plasmatico) in tutti gli ipertesi, anche normokalemici, ha dimostrato una prevalenza di iperaldostronismo primitivo nettamente superiore rispetto al passato con percentuali variabili dal 1,4 al 32% degli ipertesi, a seconda delle casistiche (29) Quest'ampia variabilità di stime riflette vari fattori, quali la popolazione selezionata, i diversi criteri d'inclusione ed esclusione dei pazienti, il criterio (o set di criteri) utilizzati per porre la diagnosi ed infine la disponibilità di un "gold standard" per porre una diagnosi di certezza.

Un recente studio prospettico multicentrico italiano (Studio PAPPY, PA Prevalence in hYpertensives) condotto su un'ampia casistica di nuovi ipertesi (30) mirante ad accertare la prevalenza di PA in Italia ha riportato una prevalenza di tale patologia dell' 11,2 % sui pazienti studiati. Questi dati

suggeriscono che questa forma di ipertensione endocrina guaribile dovrebbe essere ricercata in tutti i pazienti soprattutto se presentano un'ipokaliemia 'spontanea' o indotta da diuretici, un'ipertensione resistente, una storia di ipertensione o ictus giovanile o un incidentaloma surrenalico. Il riconoscimento di un PA è fondamentale per evitare, ove possibile, le conseguenze di un eccesso di mineralcorticoidi; studi recenti infatti suggeriscono un ruolo primario dell'aldosterone nel danno renale, cardiaco e cerebrovascolare indipendentemente dai valori pressori (31).

L'iperaldosteronismo primitivo da adenoma è la forma più comune (circa il 60-70% dei casi) ed è più frequente nelle donne, nella terza-quarta decade di vita. L'iperaldosteronismo idiopatico (25-30% dei casi) colpisce con lieve prevalenza il sesso maschile nella quarta-quinta decade, è tuttavia difficile dire quando il fenomeno morboso inizi.

#### **Tabella 1 CLASSIFICAZIONE DEGLI IPERALDOSTERONISMI PRIMITIVI:**

- 
- Iperaldosteronismo primitivo da adenoma surrenalico (APA)
  - Iperaldosteronismo da iperplasia surrenalica bilaterale (IHA)  
micronodulare  
macronodulare
  - Iperaldosteronismo da iperplasia nodulare surrenalica monolaterale (MUAN)
  - Iperaldosteronismo Familiare di tipo 1 (FH-1) noto anche come GRA (Glucocorticoid Remediable Aldosteronism)
  - Iperaldosteronismo Familiare di tipo 2 (FH-2)
  - Iperaldosteronismo da carcinoma surrenalico
  - Iperaldosteronismo da secrezione ectopica di aldosterone
- 

La classificazione si basa su criteri clinici, anatomo-patologici e morfologici. La distinzione non è netta e la diagnosi differenziale tra APA ed IHA è complicata dal fatto che esistono APA bilaterali ed APA in un contesto di IHA o MUAN, esistono casi di iperplasia unilaterale autonoma guariti dalla surrenectomia e per l'assenza di criteri istopatologici condivisi non è chiaro il confine tra un APA microscopico ed una MUAN (32-34).

L'iperaldosteronismo glucocorticoide-sensibile (GRA) è una rara malattia autosomica dominante con iperplasia bilaterale nella quale i test biochimici mostrano un'autonomia funzionale della secrezione di aldosterone simile a quella riscontrata nell'adenoma ed una spiccata sensibilità all'ACTH. In questi pazienti, nei quali l'ipertensione arteriosa è presente ma l'ipopotassiemia è meno marcata, la somministrazione di desametasone porta alla normalizzazione della sindrome con riduzione dei livelli di aldosterone. La diagnosi molecolare di questa peculiare forma di iperaldosteronismo risale al 1992 con l'identificazione di un gene chimerico. I geni che codificano per l'enzima aldosterone sintetasi e per l'11 beta-idrossilasi si trovano nel cromosoma 8, condividono un alto grado di omologia (>90%) ma differiscono per la regione deputata al controllo

dell' espressione genica; infatti, quella dell'11beta-idrossilasi, espresso nella zona fascicolata e nella zona glomerulosa, è sensibile all'ACTH mentre l' aldosterone sintetasi, espresso solo nella zona glomerulosa, viene regolato principalmente dai livelli di angiotensina II. Nel genoma dei pazienti con GRA é stata dimostrata la presenza di un gene chimerico o ibrido, formato per crossing-over diseguale, nel quale la zona regolatrice dell'11 beta-idrossilasi (ACTH sensibile) è contigua alla regione codificante per l'aldosterone sintetasi. Quindi, questa attività viene espressa anche nella zona fascicolata, (appunto regolata dall'ACTH) ossidando il C 18 del corticosterone a 18 idrossicortisterone e aldosterone, e del cortisolo a 18 idrossicortisolo a 18 oxo-cortisolo (35).

L' iperaldosteronismo primitivo familiare di tipo 2 (FH2) è stato definito studiando alcune famiglie con alta incidenza di iperaldosteronismo primitivo. Questi rari casi si possono presentare sia con iperplasia che con adenoma, questi ultimi indifferentemente angiotensino-responsivi o non responsivi. Non vi é in questi casi sopprimibilità con desametazone e la ricerca del gene ibrido del GRA (FH-1) risulta negativa sia con Southern blot che con PCR (36).

La sintomatologia del PA è costituita da ipertensione sistodiastolica, di grado medio e talora anche elevato, spesso refrattaria al trattamento farmacologico . Il quadro clinico può essere talvolta completato da relativa ipotensione posturale, disturbi neuromuscolari (debolezza e spesso crampi muscolari fino a episodi di paralisi, parestesie), poliuria, astenia (37). Per molti anni si è considerata l'ipopotassiemia come una delle principali manifestazioni del PA, oggi si sa che molti pazienti sono normokaliemici e che l'ipopotassiemia è presente in circa il 50% dei pazienti con APA e nel 17% dei pazienti con IHA (31). L'ipopotassiemia è conseguente all'aumentata azione dell'aldosterone a livello degli organi bersaglio, in particolare del rene ove si ha un aumentato riassorbimento di sodio e di acqua, responsabili dell'espansione di volume, e una perdita di potassio. Anche il magnesio si abbassa e il quadro elettrolitico porta a un'alcalosi metabolica. La sodiemia è di solito nella norma, ma talora può essere moderatamente elevata. Non si manifesta una sindrome edemigena in quanto l'organismo presenta un meccanismo di difesa, il cosiddetto fenomeno dell' "escape" del tubulo renale all' azione dell'aldosterone, che provoca una natriuresi una volta che sia stata raggiunta un'espansione di volume critica. Le complicanze più gravi della malattia nelle sue varie forme sono legate all' ipopotassiemia che può, se non corretta, portare a gravi disturbi cardiaci e a paralisi ipokalemiche. I pazienti con GRA, oltre alla familiarità, hanno differenti gradi di ipertensione che può esordire anche tardivamente dopo i 20 anni, hanno una potassiemia generalmente normale ed iperaldosteronismo modesto. Questi pazienti hanno però una maggior tendenza ad accidenti cerebrovascolari. La variabilità genotipica e fenotipica del GRA lascia supporre che la malattia possa essere molto più frequente di quanto non si pensasse in

passato, e costituisce uno stimolo a considerare con attenzione quest'ipotesi diagnostica di fronte all'ipertensione giovanile ed alle ipertensioni essenziali a bassa renina (38).

Le tappe diagnostiche devono innanzitutto stabilire la presenza di un'iperaldosteronismo primitivo e quindi individuare forma e sede della malattia. L'anamnesi deve cogliere i sintomi legati all'ipopotassiemia (astenia, crampi poliuria etc.), escludere altre cause note di ipopotassiemia (abuso di lassativi, diuretici o di sostanze mineralcorticoido-simili come liquerizia, carbenoxolone, cortisonici per uso topico etc). Inoltre si devono considerare altre forme di ipermineralcorticismo, associate ad altri quadri morbosi (soprattutto associate ad anomalie dei caratteri sessuali nei difetti della 17 $\alpha$ - e della 11 $\beta$ idrossilasi) e la sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi (deficit dell'11 $\beta$  idrossisteroide deidrogenasi). La diagnosi differenziale andrà anche posta nei confronti degli iperaldosteronismi secondari caratterizzati da un aumento dell' aldosterone secondario ad un' abnorme attivazione del sistema renina-angiotensina. Queste condizioni possono presentarsi con ipertensione, quando lo stimolo é direttamente a livello renale (stenosi dell'arteria renale, ipertensione maligna, ipertensione arteriosa ad alta renina, reninoma), o con normotensione, quando il sistema é attivato come risposta ad una relativa ipovolemia sistemica (quale si può avere nello scompenso congestizio, nella sindrome nefrosica, nella cirrosi ascitica, nell'edema ciclico-idiopatico, nella sindrome di Bartter e nell'abuso di diuretici o lassativi).

Un paziente iperteso con un sospetto clinico di PA deve essere sottoposto ad una prima serie di test, definiti test di screening, con lo scopo di confermare l'iniziale sospetto e successivamente, se i test di screening orienteranno il clinico verso una diagnosi di iperaldosteronismo primitivo, saranno necessari ulteriori test di conferma.

Il metodo considerato oggi il più affidabile per lo screening di pazienti ipertesi è rappresentato dalla misurazione del rapporto plasmatico aldosterone/renina (ARR) misurato in ortostatismo; l'affidabilità di questo test dipende dall'accuratezza con cui viene eseguito sia perché è necessario tener conto di numerosi fattori che possono modificare le concentrazioni di aldosterone e renina sia perché è necessario considerare l'utilizzo di tecniche affidabili per la misurazione dei due ormoni. La sensibilità e la specificità dell'ARR sono condizionate dal valore scelto come cut-off. Un rapporto ARR >20 con un aldosterone plasmatico  $\geq$  15 ng/dl e la renina espressa in ng/ml/h è considerato sospetto per un iperaldosteronismo primitivo (39). Nello studio PAPPY si è considerato significativo un rapporto ARR superiore a 40 tenendo conto di un precedente lavoro italiano in cui con un cut-off di 40 e livelli di PRA di almeno 0,2 ng/ml/h mostravano una sensibilità del 100% e una specificità dell'84,4% con un valore predittivo positivo dell'80,3% e negativo del 100% (40). I dosaggi di aldosterone plasmatico e di renina presi singolarmente mancano di specificità. Molti pazienti con iperaldosteronismo primitivo (spesso affetti da APA) presentano livelli di aldosterone



plasmatici che si mantengono ampiamente entro il range di normalità (5-30 ng/dl, 139-832 pmol/l) (41,42). Per questo “normali” valori di aldosterone sono stati considerati come “innappropriatamente normali” di fronte ad una soppressione del sistema renina-angiotensina che, nei pazienti non affetti da PA, di solito si presentano ridotti. E’ importante valutare anche la possibile interferenza della dieta o dei farmaci sui dosaggi di aldosterone plasmatico e renina che possono determinare falsi positivi o falsi negativi. I beta bloccanti e la clonidina possono essere responsabili di un aumento dei falsi positivi all’ARR in quanto riducono i livelli di PRA più di quanto riducano i livelli di aldosterone (43). I diuretici invece determinano una riduzione dell’ARR con aumento della proporzione di falsi negativi, a causa sia delle perdite di potassio cui consegue una riduzione dei valori plasmatici di aldosterone che dell’aumento dei valori di PRA; anche gli antagonisti dei recettori dell’angiotensina II e gli ACE-inibitori determinano un aumento dei falsi negativi causando una riduzione dei valori di aldosterone e un aumento dei valori di PRA (44). Nelle ipertensioni severe i calcio antagonisti e gli alfa-bloccanti possono essere una valida alternativa senza interferire con i dosaggi ormonali. Se gli ACE-inibitori, i sartani e i diuretici non possono essere sospesi bisognerà riconsiderare il cut-off del rapporto ARR. E’ importante inoltre considerare la contemporanea assunzione di FANS che possono determinare dei falsi positivi sopprimendo i livelli di renina e contemporaneamente determinando una ritenzione di potassio che comporta la stimolazione della produzione di aldosterone (45) e di contraccettivi orali o preparati contenenti estrogeni che possono dare dei rapporti ARR falsi positivi quando la renina è misurata come renina attiva (46). Il riscontro di un elevato rapporto ARR richiede ulteriori test di conferma per dimostrare una inappropriata secrezione di aldosterone. I test di conferma che vengono utilizzati sono rappresentati da: carico orale di sodio (OST), infusione salina (SIT), soppressione con fludrocortisone (FST) e test al Captopril (CAPT) (Tab.2).

<b>Test</b>	<b>Protocollo</b>	<b>Interpretazione dei Test</b>
<b>Carico orale di sodio (OST)</b>	Supplementi orali di NaCl (300 mmol al giorno) per 3 giorni e dosaggio di aldosterone urinario al terzo giorno	PA è improbabile se l'aldosterone urinario è inferiore a 10 ug/24h
<b>Infusione salina (SIT)</b>	Infusione ev di 2000 ml di soluzione fisiologica allo 0,9% in 4 h iniziando tra le 8-9.30 e dosando PRA, aldosterone, cortisolo e potassio ai tempi 0' e 4h.	Livelli aldosterone plasmatico a 4 h: <5ng/dl PA è improbabile >10 ng/dl PA è molto probabile Valori tra 5-10 ng/dl ?
<b>Soppressione con Fludrocortisone (FST)</b>	Fludrocortisone acetato (0,1 mg ogni 6 h), NaCl (30 mmol ogni 8 h) e supplementazione di potassio per 4 giorni. Il 4° giorno aldosterone e PRA in ortostasi sono dosati alle ore 10 e il cortisolo plasmatico alle ore 7 e alle ore 10.	Nei pazienti con PA: Aldosterone plasmatico superiore ai 6 ng/dl; PRA < 1 ng/ml/h Cortisolemia delle ore 10 non maggiore di quella delle ore 7
<b>Test al Captopril (CAPT)</b>	25-50 mg di Captopril per os e dosaggio di aldosterone, PRA e cortisolo al tempo 0 (paziente in ortostasi da almeno un'ora) e 1 ora dopo la somministrazione del farmaco p.o	Normalmente l'aldosterone plasmatico è soppresso dal captopril, in caso di PA rimane elevato (ARR>30).

**Tab.2** Test di conferma utilizzati per la diagnosi di PA

### **Carico orale di sodio (OST)**

Ai pazienti viene somministrato un elevato carico di Na (> 200 mmol/l al dì) per 3 giorni e viene dosato l'aldosterone urinario delle 24h in terza giornata. Una diagnosi di iperaldosteronismo primitivo è considerata improbabile nel caso in cui la concentrazione di aldosterone risulti < a 10 µg/24h. Questo test non può essere eseguito nei pazienti con grave ipertensione, insufficienza renale, cardiaca, aritmie o severa ipokaliemia. Spesso si rende necessaria una supplementazione con KCl

### **Infusione salina (SIT)**

Il test implica che il paziente rimanga in clinostasi da un'ora prima e durante l'infusione di 2 L di soluzione fisiologica 0,9 % ev in 4 ore, iniziando l'infusione intorno alle 8-9:30 del mattino. Viene eseguito un prelievo ematico per renina, aldosterone, cortisolo e potassio al tempo 0 e dopo 4 ore monitorando la pressione arteriosa durante il test. Con valori plasmatici di aldosterone < 5 ng/dl è inverosimile che si tratti di iperaldosteronismo mentre valori > 10ng/dl sono considerati molto

indicativi. Valori compresi fra 5-10 ng/dl sono di più difficile interpretazione. In un recente studio retrospettivo (42) condotto su 61 pazienti affetti da PA (26 con APA) e 157 con ipertensione essenziale, il valore cut-off di aldosterone plasmatico  $\geq 7$  ng/dl ha mostrato una sensibilità dell'88% e una specificità del 100% in 76 pazienti con un rapporto ARR  $>40$  (ng/dl su ng/ml/h). Uno studio recentemente pubblicato condotto sulla casistica dello studio italiano multicentrico PAPY ha dato risultati meno promettenti infatti il valore di aldosterone di 6,8 ng/dl dopo carico salino ha mostrato una sensibilità dell'83% e una specificità del 75% (47).

### **Test di soppressione con fludrocortisone (FST)**

I pazienti devono assumere 0,1 mg di fludrocortisone per os 4 volte al dì (ogni 6 ore) per 3 giorni insieme ad una supplementazione di KCl e una dieta ipersodica ( $>200$  mmol) controllando i valori della potassiemia per il rischio di una grave ipokaliemia. Al quarto giorno si eseguono prelievi per aldosterone e renina alle 10 del mattino mantenendo la posizione seduta e per cortisolo alle 7 e alle 10. Nei pazienti con PA i valori di aldosterone si aggirano intorno a 6 ng/dl, la PRA risulta  $< 1$  ng/ml/h e il cortisolo plasmatico risulta più basso alle 10 del mattino rispetto al controllo delle 7 (48). Si tratta di un test meno utilizzato rispetto agli altri per il rischio di una grave ipokaliemia e la necessità di ricovero per l'esecuzione.

### **Test al Captopril**

I pazienti dopo essere stati seduti o in ortostatismo per almeno un'ora devono assumere 25-50 mg di Captopril per os. Vengono eseguiti i prelievi per PRA, aldosterone e cortisolo basali e dopo 1-2 ore dall'assunzione del farmaco sempre con paziente in posizione seduta. Nei soggetti sani (e nei pazienti con ipertensione essenziale) l'aldosterone plasmatico viene normalmente soppresso dal Captopril ( $<30\%$ ) mentre nei pazienti affetti da PA l'aldosterone rimane elevato e la PRA soppressa. Un rapporto ARR  $> 20$  è indicativo di PA mentre se  $>30$  in un paziente con test di screening positivo conferma la diagnosi di iperaldosteronismo primitivo (49). Si possono osservare delle differenze nei pazienti con APA rispetto a quelli con IHA per cui in quest'ultima situazione si può riscontrare occasionalmente una riduzione dei livelli di aldosterone dopo captopril.

Una volta confermata la diagnosi di PA la successiva tappa diagnostica consiste nel distinguere le forme suscettibili di terapia chirurgica da quelle per le quali si prevederà una terapia medica. Questa fase può richiedere più indagini partendo innanzitutto dallo studio morfologico. La TAC ad alta risoluzione (2,5-3 mm) è la tecnica radiologica che mostra la migliore sensibilità nell'identificazione dei noduli surrenalici (50), tuttavia la maggioranza degli APA attualmente identificati sono meno di 20 mm e persino di 10 mm di diametro massimo e quindi possono

sfuggire persino con le TAC di ultima generazione e nonostante l'impiego sistematico di scansioni sottili e mezzo di contrasto. La RMN ha una sensibilità minore rispetto alla TAC (51) e dovrebbe essere riservata ai pazienti che presentano controindicazioni all'uso del mezzo di contrasto. Bisogna inoltre tener presente che il riscontro di incidentalomi surrenalici "masse surrenaliche apparentemente non funzionanti" nella popolazione generale è frequente, 2-10% degli adulti (52) e considerata l'alta prevalenza dell'ipertensione arteriosa e del PA, una massa surrenalica può essere presente casualmente in un iperteso con quadro biochimico compatibile con PA. Poiché né TAC né MR forniscono informazioni esaustive sulla lateralizzazione dell'eccesso di aldosterone, l'imaging surrenalico da solo è insufficiente a distinguere tra APA e IHA.

Il cateterismo venoso selettivo delle vene surrenaliche (AVS, Adrenal Venous Sampling) rappresenta il *gold standard* nella diagnosi di sottotipo del PA. Consiste nel prelievo di sangue refluo dalle vene surrenaliche e dalla vena cava dopo incannulamento delle vene surrenaliche ottenuto con approccio per cutaneo attraverso la vena femorale; sui campioni ematici ottenuti si dosano l'aldosterone e il cortisolo plasmatico. Questa procedura, tecnicamente difficile e non priva di rischi, va riservata ai pazienti che abbiano una diagnosi certa di PA e che siano candidati "plausibili" alla surrenectomia. Indubbiamente essa richiede un radiologo esperto e dedicato, un protocollo rigoroso ed esperienza nell'interpretazione dei dati ormonali. Dovrebbe essere eseguita solo in condizioni di normokalemia (ottenibile con adeguati supplementi orali o e.v di KCl), perché l'ipokaliemia riduce la secrezione di aldosterone e pertanto può ridurre la lateralizzazione. Tecnicamente tale procedura è complicata dal fatto che le vene surrenaliche sono piccole ed è difficile un posizionamento corretto del catetere in particolare a destra dove la vena surrenalica è assai corta e drena direttamente in cava. Va anche ricordato che a destra la vena surrenalica spesso condivide lo sbocco in cava con una o più vene epatiche accessorie, nelle quali per il metabolismo epatico degli ormoni e per la diluizione del flusso ematico (relativamente basso) dal surrene da parte del flusso (maggiore) epatico la concentrazione di cortisolo ed aldosterone è assai inferiore che nel sangue venoso periferico.

La misurazione delle concentrazioni di cortisolo ed il calcolo dell'indice di selettività (IS), cioè del rapporto cortisolo venoso surrenalico su cortisolo in vena cava inferiore, viene utilizzato per stimare la selettività del cateterismo e correggere per la diversa selettività tra i due lati. Sfortunatamente non esiste unanimità di consensi sui cut-off che determinano il successo dell'AVS e permettono di stabilire la lateralizzazione della secrezione di aldosterone (53). L'utilizzo di un  $IS \geq 1.1$  consentirebbe l'identificazione degli APA con un'accuratezza non significativamente diversa da quella ottenibile con cut-off maggiori (54) che invece ridurrebbero il numero di AVS bilateralmente selettivi e quindi utilizzabili a fini diagnostici. Se il cateterismo è risultato selettivo è possibile poi

calcolare il rapporto aldosterone dal lato maggiore su aldosterone dal lato minore ( $A_{\text{dominante}}/A_{\text{nondominante}}$ ) dividendolo per i valori di cortisolemia simultaneamente misurati allo scopo di correggere per il grado di selettività (diluizione). Molti gruppi considerano l'indice di lateralizzazione (IL), calcolato come rapporto aldosterone(A):cortisolo (C) dal lato dominante su A:C dal lato nondominante, l'indice migliore per determinare la lateralizzazione. Tuttavia, anche sul cutoff ottimale per questo indice non c'è unanimità di consensi: sono stati proposti valori tra 2 e 5 (53,54,55). Nonostante le difficoltà tecniche e di interpretazione dei dati ottenuti il cateterismo selettivo delle vene surrenaliche è una tappa essenziale nella differenziazione dei sottotipi di PA e se eseguito correttamente fornisce un'indicazione solida alla surrenectomia. In presenza di adenomi surrenalici di dimensioni relativamente grandi (>1,5 cm) per la dimostrazione della lateralizzazione della secrezione di aldosterone è possibile utilizzare la scintigrafia surrenalica con analoghi del colesterolo marcati con  $^{131}\text{I}$  come il [ $6\beta$ - $^{131}\text{I}$ -metil-19norcolesterolo (NP59)]; una settimana prima dell'esecuzione dell'esame è necessario somministrare desametasone (1mgx4/die) per sopprimere la captazione del radiofarmaco da parte della zona fascicolata. La sensibilità di questa indagine dipende dall'iperfunzione e dalle dimensioni del tumore, considerando che gli APA sono spesso piccoli e non marcatamente iperfunzionanti tale tecnica non trova ampia diffusione (56).

Una volta stabilita con certezza la presenza di PA e una volta definito il sottotipo se la terapia di elezione è quella chirurgica il paziente è sottoposto a surrenalectomia monolaterale oggi ben eseguibile anche con tecnica laparoscopica. Dopo l'intervento di solito la potassiemia si normalizza e i livelli pressori migliorano in quasi il 100% dei pazienti (57). La pressione arteriosa si normalizza (PAO <140/90 mmHg) in circa il 50% dei casi (range 35-60%) di pazienti con APA sottoposti ad intervento (58,59). La persistenza di elevati livelli pressori dopo l'intervento sembra correlata alla coesistenza di un'ipertensione essenziale (57) e alla durata dell'ipertensione.

Nelle forme di iperaldosteronismo primitivo secondario ad una patologia surrenalica bilaterale si deve preferire la terapia medica. I farmaci di prima scelta devono essere gli antagonisti del recettore mineralcorticoide e quindi lo spironolattone, il canreonato di potassio o in alternativa l'eplerenone (non disponibile in Italia). La dose iniziale consigliata di spironolattone è di 12.5-25 mg a seconda della gravità dei sintomi in un'unica somministrazione; il dosaggio dovrà essere adeguato fino a ottenere la dose minima o in grado di controllare la pressione limitando al massimo l'insorgenza di effetti collaterali quali polimenorrea, ginecomastia e calo della libido. Studi osservazionali sull'efficacia della terapia medica hanno riportato una riduzione media dei valori di pressione sistolica del 25% e dei valori di diastolica del 22% in risposta al trattamento con spironolattone (50-400mg/die) per 1-96 mesi (60). Alla terapia possono essere aggiunti bassi dosaggi di diuretici

tiazidici, trimaterene o amiloride per poter utilizzare dosaggi inferiori di spironolattone e quindi ridurre gli effetti collaterali. L'eplerenone, nuovo antagonista selettivo del recettore dei mineralcorticoidi, ha una ridotta affinità per il recettore degli androgeni e del progesterone e quindi una maggiore tollerabilità. Il dosaggio iniziale è di 25 mg che per la breve emivita dovrebbe essere dato in due somministrazioni quotidiane (61).

## **I RECETTORI ECTOPICI NELLA CORTICALE SURRENALICA: EVIDENZE *IN VITRO* ED *IN VIVO***

Nel 1971 Ney Robert e collaboratori per primi dimostrarono che mentre in cellule di surrene normale di ratto l'adenilato-ciclasi e quindi le protein-chinasi cAMP dipendenti erano attivate solo dall'ACTH, in cellule di carcinoma surrenalico tale via poteva essere attivata anche da epinefrina, norepinefrina e TSH (62). Studi successivi dimostrarono che anche FSH e LH erano in grado di attivare l'c-AMP mentre glucagone, insulina, vasopressina, paratormone e calcitonina non avevano nessun effetto (63). In questi studi iniziali fu proposto il concetto di recettori ectopici di membrana espressi dalla corticale di surreni patologici ma non si riuscì a dimostrare un effetto diretto sulla steroidogenesi surrenalica. Gli autori conclusero che il significato fisiopatologico di questa risposta "anomala" delle cellule tumorali surrenaliche non era chiaro; d'altra parte era possibile ipotizzare che in certi casi il comportamento "autonomo" dei tumori endocrini fosse più apparente che reale e che potesse essere il risultato di una stimolazione anomala da parte di ormoni "aberranti" per una determinata ghiandola (64).

Successivi studi *in vitro* supportarono le ipotesi iniziali dimostrando in tumori surrenalici umani benigni e maligni la presenza di diversi recettori di membrana, per la maggior parte accoppiati alle proteine G, in grado di regolare la steroidogenesi. Nel 1980 Matsukura e collaboratori studiarono l'attività dell'adenilato-ciclasi in tessuti surrenalici cortisolo secernenti di adenomi, carcinomi e iperplasie nodulari; negli adenomi l'attività dell'adenilato-ciclasi era aumentata da epinefrina, norepinefrina, TSH, LH e angiotensina II mentre un caso di iperplasia nodulare rispondeva al glucagone e all'ACTH e nessuno dei carcinomi studiati presentava un incremento dell'attività enzimatica dopo stimolo (65). Successivi studi dimostrarono la presenza di recettori  $\beta$ -adrenergici in due adenomi secernenti cortisolo, in un aldosteronoma ma non in tessuto surrenalico normale (66). In uno studio condotto su tessuti di sei carcinomi surrenalici umani si evidenziò un incremento dell'attività enzimatica dell'adenilato ciclasi dopo trattamento con beta-agonisti in quattro dei sei casi ma in nessun tessuto surrenalico normale; in uno dei tumori l'enzima era attivato anche dal TSH (67). Al contrario Saez e collaboratori nel 1978 non trovarono nessun incremento

dell'attività dell'adenilatociclastasi dopo trattamento di 11 tessuti surrenalici di adenoma e carcinoma con norepinefrina, glucagone e TSH (68).

Inizialmente solo su studi condotti *in vitro* si dimostrò la presenza di recettori ormonali ectopici sul tessuto surrenalico; nel 1987 fu descritto il primo caso di un paziente affetto da sindrome di Cushing in cui la produzione di cortisolo era regolata dal cibo e così per la prima volta vi fu un riscontro *in vivo* di quello che finora era stato descritto *in vitro* (69). Numerosi lavori successivi dimostrarono che la secrezione di cortisolo in molti casi di iperplasia surrenalica macronodulare ACTH indipendente (AIMAH) e in alcuni casi di adenoma surrenalico può essere regolata da ormoni diversi rispetto all'ACTH attraverso l'espressione di recettori ectopici o l'iperespressione di recettori eutopici di membrana. Lacroix e collaboratori hanno proposto un protocollo clinico per lo studio dei recettori ormonali aberranti nella sindrome di Cushing surrenalica. Lo studio si basa sulla misurazione dei livelli plasmatici degli steroidi di base e dopo diversi test di stimolo potenzialmente in grado di modulare la secrezione ormonale in presenza di recettori ectopici. Il protocollo include la misurazione di ACTH, cortisolo e altri ormoni quali aldosterone, testosterone libero, DHEA-S, ed estradiolo di base e ad intervalli di 30/60 minuti per 2 o 3 ore dopo lo stimolo; i test devono essere eseguiti a digiuno e iniziati dopo che i pazienti sono stati supini per almeno un'ora. Lo screening iniziale per lo studio dei recettori ectopici richiede almeno tre giorni: 1) inizialmente il paziente esegue un test posturale utilizzato per studiare i recettori per l'angiotensina II, la vasopressina, le catecolamine o il peptide natriuretico atriale; 2) successivamente con l'ingestione di un pasto misto si valuta la presenza del recettore del GIP o di altri recettori ormonali gastrointestinali; 3) la somministrazione di GnRH serve a valutare la presenza di eventuali recettori per LH, FSH e per il GnRH; 4) l'iniezione di TRH si effettua per valutare se la steroidogenesi surrenalica può essere modulata da TRH, TSH o prolattina; 5) la metoclopramide o il cisapride vengono utilizzati per indagare la presenza dei recettori serotoninergici 5-HT<sub>4</sub>; 6) possono essere somministrati anche il glucagone o 7) l'arginin-vasopressina. Un cambiamento di meno del 25% dei valori basali di cortisolo plasmatico è considerato come una non risposta; un incremento tra il 25 e il 50% in assenza di un incremento dei valori di ACTH è definito come una risposta parziale mentre una risposta superiore al 50% è considerata come positiva. Se la risposta positiva viene confermata e chiaramente documentata dai test iniziali successivi test di stimolo possono essere impiegati per valutare se altri ormoni sono coinvolti o eventualmente per definire un recettore specifico (7).

Nell'iperaldosteronismo primitivo i meccanismi che regolano la secrezione di aldosterone, in presenza di una soppressione di renina e angiotensina II, rimangono ancora ampiamente sconosciuti e rappresentano un argomento di rilevante interesse dato che si tratta della causa più frequente di

ipertensione secondaria. La dimostrazione che in casi di iperplasia o adenomi surrenalici secernenti cortisolo e/o androgeni la presenza di recettori aberranti sia grado di modulare la steroidogenesi ha spinto i ricercatori a condurre studi in vivo ed in vitro per identificare un possibile ruolo di questi recettori anche nella fisiopatologia dell' iperaldosteronismo.

## **II RECETTORE DEL GIP** (Gastric Inhibitory Polipeptide)

Si tratta del primo recettore ectopico identificato in studi in vivo in pazienti affetti da sindrome di Cushing. Oltre al caso descritto nel 1987, nel 1992 due gruppi diversi caratterizzarono in vivo altri due casi di AIMAH in cui la produzione di cortisolo era stimolata dal fisiologico incremento post-prandiale dei livelli plasmatici di GIP (70), la presenza dei recettori per il GIP fu supportata anche da metodiche di imaging utilizzando il GIP marcato con I<sup>123</sup> (71). Ad oggi sono stati descritti circa 17 pazienti con AIMAH e 7 pazienti con adenoma unilaterale con sindrome di Cushing legata all'espressione aberrante del recettore del GIP (72). Questo recettore normalmente non è espresso nella corteccia surrenalica normale adulta e fetale, pertanto ha un'espressione ectopica in surreni patologici. L'analisi di sequenza ha evidenziato che il recettore non è mutato e che la sua espressione è presente già nelle prime fasi dell'iperplasia surrenalica. Studi in vitro hanno dimostrato che trattando con GIP colture primarie di cellule di adenoma surrenalico GIP-dipendente vi è un incremento dell'c-AMP e della sintesi di DNA suggerendo pertanto che questo ormone possa indurre sia l'ormonogenesi che la proliferazione cellulare (73). Un'ulteriore evidenza del ruolo di questo recettore ectopico nella fisiopatologia di alcuni casi di sindrome di Cushing è emersa da un altro studio in cui il recettore del GIP è stato transfettato in cellule bovine surrenaliche che sono state poi iniettate in sede subcapsulare renale nei topi e si è osservato lo sviluppo di iperplasia surrenalica e ipercortisolismo (74).

Uno studio pubblicato recentemente (75) ha identificato il primo caso di aldosteronoma in cui è stata documentato *in vivo* un incremento dei livelli di aldosterone dopo pasto misto e OGTT suggerendo la presenza di recettori aberranti per il GIP nel tumore surrenalico. I dati ottenuti con i test eseguiti nel paziente sono stati confermati nel post-operatorio sul tessuto surrenalico attraverso real-time RT-PCR, studi di perfusione e di immunoistochimica. I test condotti sul paziente descritto hanno evidenziato un marcato incremento dei livelli di aldosterone plasmatici dopo un pasto misto (68%), dopo OGTT (115%) e dopo l'infusione di GIP (221%) mentre in altri 5 pazienti con aldosteronoma i livelli di aldosterone plasmatici non si sono modificati. Nello stesso paziente l'aldosterone è aumentato in maniera significativa anche dopo tegaserod, agonista specifico dei recettori 5-HT<sub>4</sub>, e vasopressina mentre non c'è stato un incremento dell'ormone dopo



l'ortostatismo, il GnRH, il TRH e la somministrazione di desmopressina. Gli studi di perfusione hanno documentato che il trattamento delle cellule dell'adenoma con GIP determinava un incremento dei livelli di aldosterone mentre il surrene normale adiacente non rispondeva; l'RT-PCR ha evidenziato un'espressione del recettore del GIP significativamente aumentata rispetto al tessuto surrenalico normale e agli altri aldosteronomi non rispondenti al *test in vivo*. L'immunoistochimica ha rilevato nel tessuto patologico due sottotipi cellulari: cellule simili a quelle della zona fascicolata e cellule simili a quelle della glomerulosa. Il recettore per il GIP era presente soprattutto in quest'ultime e in misura minore nella zona reticolare e nelle cellule endoteliali mentre era assente nella capsula, nella zona fascicolata e nella midollare. Il recettore non era presente in un altro aldosteronoma studiato e in due tessuti surrenalici normali. Il fatto che il recettore del GIP fosse espresso nella zona glomerulosa ma non nella zona fascicolata fa ipotizzare che mentre negli adenomi cortisolo secernenti il recettore si può considerare ectopico negli aldosteronomi si tratta di un'iperespressione di un recettore normalmente espresso e quindi eutopico.

## **IL RECETTORE DELLA VASOPRESSINA**

In diversi pazienti con ipercortisolismo ACTH indipendente, adenomi o AIMAH, è stato documentato che la vasopressina, sia esogena che endogena, è in grado di stimolare la secrezione di cortisolo (11,76). Nella maggior parte dei casi è stato possibile dimostrare che l'azione dell'ormone è mediata dal sottotipo recettoriale V1 la cui espressione nel tessuto patologico è simile o maggiore rispetto ai controlli. In colture di cellule surrenaliche incubate con vasopressina si sono osservati un esagerato flusso di calcio e di secrezione di cortisolo, effetti che venivano inibiti dall'utilizzo di antagonisti specifici del recettore V1 (77). Il recettore V1 è normalmente espresso nella corteccia surrenalica e la sua attivazione determina *in vitro* un modesto incremento della steroidogenesi pertanto, è plausibile supporre, che la risposta esagerata rappresenti una risposta aberrante di un recettore eutopico; questo potrebbe essere il risultato di un'iperespressione del recettore e/o di più efficienti meccanismi intracellulari post-recettoriali (72). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato anche l'espressione ectopica dei recettori V2 e V3 nel tessuto surrenalico di pazienti con iperplasia macronodulare ma non è stata documentata una risposta *in vivo* a questi recettori (78).

Kuhn e collaboratori (79) nel 2006 hanno pubblicato uno lavoro in cui hanno messo in evidenza il possibile ruolo della vasopressina nel controllo della secrezione di aldosterone nell'iperaldosteronismo primitivo. Lo studio ha dimostrato che negli aldosteronomi la vasopressina non è presente solo nelle cellule cromaffini come succede nel surrene normale ma anche nelle

cellule deputate alla steroidogenesi modulando probabilmente in modo autocrino e/o paracrino la secrezione di aldosterone. L'utilizzo di un antagonista specifico del recettore V1 ha consentito di dimostrare che questo sottotipo recettoriale è quello verosimilmente coinvolto nella modulazione dell'ormonogenesi da parte della vasopressina e attraverso RT-PCR questo recettore è stato identificato nella maggior parte degli adenomi studiati. Un altro studio (80), recentemente pubblicato, condotto su 10 pazienti affetti da iperaldosteronismo da adenoma surrenalico, ha analizzato la risposta dell'aldosterone alla vasopressina sia in termini di secrezione ormonale che di valutazione dei livelli di espressione del recettore V1a nei tessuti operati. I test alla vasopressina hanno determinato un incremento variabile dei livelli di aldosterone e non si sono osservate differenze rispetto a un gruppo di controllo rappresentato da soggetti con adenomi surrenalici non funzionanti. Due dei soggetti studiati in cui prima dell'intervento si era documentato un incremento dei valori di aldosterone dopo il test rispettivamente del 55,5% e del 70,5% hanno ripetuto il test nel post operatorio ed in entrambi i casi non c'è stato nessun incremento dei valori di aldosterone dopo l'iniezione di vasopressina. L'espressione del recettore V1 negli aldosteronomi studiati è risultata estremamente variabile con dei valori risposarti in un range tra 0,07 e 8,7. Un'osservazione interessante emersa dallo studio è che esiste una correlazione negativa tra la risposta dell'aldosterone alla vasopressina e la percentuale di riduzione dei livelli di aldosterone misurati alle 8 e alle 20; è possibile che la vasopressina possa influenzare il ritmo circadiano dell'aldosterone inibendo la fisiologica riduzione serale dei livelli plasmatici di questo ormone attraverso i recettori V1a surrenalici.

## **IL RECETTORE DELLA SEROTONINA**

Nei surreni normali gli agonisti dei recettori serotoninergici 5-HT<sub>4</sub> sono dei potenti stimolatori della secrezione di aldosterone mentre, *in vitro*, vi è una debole risposta del cortisolo; negli studi *in vivo* questi agonisti non sembrano indurre una risposta del cortisolo nei soggetti normali (81). In letteratura sono riportati alcuni casi di Cushing surrenalico da adenoma o iperplasia nei quali vi è una risposta aberrante del cortisolo al cisapride e in alcuni di questi è stata documentata anche una elevata espressione del recettore 5-HT<sub>4</sub> nel tessuto tumorale (82,83).

Anche nei pazienti con iperaldosteronismo primitivo è stato dimostrato che la somministrazione di Cisapride, agonista del recettore 5-HT<sub>4</sub>, determina un incremento significativo dei livelli di aldosterone senza significative variazioni di cortisolo, renina o potassio e che in alcuni casi dopo l'asportazione chirurgica del tumore si è osservata una significativa riduzione della risposta allo stimolo addirittura minore di quanto osservato in volontari sani; è verosimile che la fisiologica risposta della glomerulosa alla serotonina sia stata inibita dal prolungato stato di iperaldosteronismo

precedente all'intervento. La stimolazione *in vitro* del tessuto patologico con Cisapride induce la secrezione di aldosterone e l'utilizzo di un antagonista specifico del recettore 5-HT<sub>4</sub> la inibisce (84). Studi di espressione hanno dimostrato che i recettori 5-HT<sub>4</sub> sono iperespressi negli aldosteronomi rispetto al tessuto surrenalico normale e che sono contenuti nella maggior parte delle cellule del tessuto tumorale; sono state caratterizzate anche le isoforme del recettore e sembra che il profilo di espressione delle varianti di splicing nei tumori differisca rispetto al tessuto surrenalico normale. Questo spiegherebbe la ridotta risposta *in vivo* al Cisapride nei pazienti affetti rispetto al gruppo di controllo nonostante l'iperespressione dei recettori negli aldosteronomi documentata *in vitro*. Nella corteccia surrenalica normale la serotonina è contenuta solamente nei mastociti mentre sembra che negli adenomi e nelle iperplasie surrenaliche cortisolo secernenti sia presente nel citoplasma di una sottopopolazione di cellule deputate alla steroidogenesi. Negli aldosteronomi la serotonina sembra localizzata sia in quest'ultime che nei mastociti; queste osservazioni fanno supporre che la serotonina con un'azione autocrina/paracrina possa avere un effetto stimolatorio sulla secrezione dell'aldosterone e possa giocare un ruolo nella fisiopatologia degli adenomi surrenalici secernenti aldosterone (85).

## **IL RECETTORE DELL'LH/hCG e DEL GnRH**

Negli ultimi 10 anni diversi lavori hanno descritto la presenza di recettori per LH/hCG nel tessuto surrenalico normale adulto e fetale così come in tessuti surrenalici patologici. I primi lavori che hanno documentato un effetto stimolatorio dell'LH e dell'hCG sul tessuto surrenalico sono stati pubblicati nel 1976 da Millington e coll.(86) e successivamente nel 1980 da Matsukura e coll (87). In questi studi si dimostrava che il trattamento *in vitro* di adenomi e carcinomi surrenalici con LH determinava un incremento dei livelli di c-AMP e della secrezione di cortisolo e androgeni e si ipotizzava che questi effetti fossero recettore mediati. Nel 1996 studi di immunostochimica e di ibridizzazione *in situ* hanno identificato l'mRNA e la proteina del recettore per LH/hCG nel tessuto surrenalico normale localizzandolo soprattutto a carico della zona fascicolata e reticolare (88). Nel 2004 questi dati sono stati confermati anche da studi di RT-PCR (89) successivamente estesi anche a surreni fetali (90) e ai surreni di pazienti affetti da Cushing ipofisario (91).

I surreni fetali rappresentano un organo con una struttura diversa rispetto ai surreni del neonato e dell'adulto. Nel periodo fetale questi organi sono deputati alla sintesi di precursori degli ormoni steroidei che vengono utilizzati dalla placenta per la sintesi di estrogeni; questi steroidi sono secreti dalla cosiddetta zona fetale della corteccia surrenalica che si atrofizza dopo la nascita (92). Sebbene sia stato documentato che l'attività di questa zona fetale sia regolata dall'ACTH alcuni investigatori hanno suggerito che anche altri ormoni possono essere coinvolte nella regolazione di questa regione

del surrene fetale. Esistono dati controversi sia sulla presenza o meno dei recettori per LH/hCG nel surrene fetale che sul loro ruolo ; in alcuni lavori condotti su studi *in vitro* è riportato che il trattamento di tessuto surrenalico fetale con hCG è in grado di indurre la sintesi di cortisolo e DHEA-S mentre studi successivi non hanno confermato questi dati (93).

L'espressione ectopica patologica del recettore dell'LH fu documentata per la prima volta da Lacroix e collaboratori che descrissero un caso di una donna che presentava una Sindrome di Cushing insorta alcuni anni dopo la menopausa ma che si era già manifestata in modo transitorio durante le precedenti gravidanze (94). La paziente presentava un'iperplasia surrenalica bilaterale e gli studi *in vivo* documentavano un incremento dei livelli di cortisolo dopo la somministrazione di GnRH, hCG ed LH; nella stessa paziente un incremento del cortisolo era evocato anche dalla somministrazione di cisapride e metoclopramide. Il trattamento della paziente con analoghi long-acting del GnRH inizialmente aveva indotto un incremento di LH, FSH e dei livelli di cortisolo ma dopo dieci giorni la soppressione delle gonadotropine aveva determinato la normalizzazione dei livelli di cortisolo. L'iperespressione del recettore dell'LH è stata successivamente identificata in diversi studi *in vitro* condotti su iperplasie macronodulari, adenomi e carcinomi surrenalici. Numerosi studi hanno messo in luce che nella maggior parte dei casi di sindrome di Cushing LH/hCG dipendente vi è la concomitante espressione anche di altri recettori aberranti. D'altra parte è stato dimostrato *in vitro* che anche un singolo evento genetico, quale appunto l'espressione inappropriata del gene del recettore per LH/hCG, potrebbe essere sufficiente per indurre delle modificazioni del fenotipo tali da causare lo sviluppo di neoplasie surrenaliche benigne (95). In letteratura sono riportati anche alcuni casi, che si riferiscono soprattutto a donne in menopausa, di tumori surrenalici secernenti androgeni in cui la steroidogenesi è stimolata dalla somministrazione *in vivo* di hCG (93).

Il ruolo dell'LH e dell'espressione aberrante del suo recettore nell'iperaldosteronismo primitivo è stato studiato per la prima volta nel 2006 da Rainey e collaboratori (96) Lo studio condotto su tessuti di 20 pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo ha documentato, attraverso RT-PCR, che il 50% degli APA presentava elevati livelli di recettore per l'LH e che in un caso l'espressione era superiore alle 2 SD rispetto ai controlli. Inoltre si sono valutati contemporaneamente i livelli di espressione dell'aldosterone sintasi (CYP11B2) che sono risultati correlati ai livelli del recettore dell'LH. Infine attraverso esperimenti di trasfezione cellulare si è dimostrato che il recettore dell'LH è in grado di modulare l'attività del promotore della CYP11B2 e quindi di indurre la sintesi di aldosterone. Un successivo studio (97) degli stessi autori ha evidenziato un'espressione significativamente aumentata del recettore del LH negli aldosteronomi rispetto al tessuto normale in una percentuale nettamente inferiore rispetto al lavoro precedente (1/28 casi). In questo lavoro sono

stati identificati attraverso microarrays e RT-PCR diversi recettori accoppiati alle proteine G potenzialmente coinvolti nello sviluppo degli adenomi corticali in particolare il recettore serotoninergico HTR4, il recettore del glutammato GRM3, il recettore GPR 37 (putative endothelin receptor type B-like protein), il recettore per l'ACTH, il recettore per l'LH e il recettore per il GnRH. Per quest'ultimo recettore è stato documentato un livello di espressione significativamente aumentato (superiore ai 2 SD rispetto alla media dei normali) in 11 adenomi su 28 rispetto ai surreni non patologici. La scoperta dell'espressione ectopica di questo recettore è di estremo interesse se si considera che negli ultimi anni diversi lavori hanno descritto come tale recettore sia espresso oltre che a livello ipofisario anche a carico di altri tessuti sani (seno, endometrio, ovaio, prostata) e nei tumori derivati da questi tessuti (98). Inoltre numerose studi hanno evidenziato un ruolo di questo recettore nella proliferazione cellulare e, più recentemente, si è ipotizzato un possibile coinvolgimento del GnRH nella progressione tumorale e in particolare nel complesso sistema dell'angiogenesi (99). I dati pubblicati finora su test *in vivo* condotti in pazienti con iperaldosteronismo primitivo si limitano ad una recente pubblicazione in cui 12 pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo sono stati sottoposti al protocollo per lo studio dei recettori aberranti già proposto da Lacroix per il Cushing. Da questo studio emerge che nel PA vi è una risposta variabile dell'aldosterone a diversi peptidi; dati particolarmente interessanti sembrano emergere dallo studio del recettore del GnRH che appare iperespresso in 4 su 15 tessuti studiati e in uno dei casi il dato molecolare correla con la risposta del test di stimolo (100).

## **I MECCANISMI MOLECOLARI DEI RECETTORI ORMONALI ECTOPICI**

I meccanismi molecolari attraverso i quali i recettori aberranti si esprimono nei surreni dei pazienti con AIMAH e meno frequentemente negli adenomi surrenalici sono sconosciuti. Negli anni si sono avanzate diverse ipotesi, si è ipotizzato che l'espressione di questi recettori possa rappresentare un evento primitivo essenziale nella patogenesi delle iperplasie macronodulari ACTH indipendenti ma anche che potrebbe essere solo un epifenomeno derivante dalla proliferazione e differenziazione cellulare. A favore della prima ipotesi depongono numerose osservazioni tra cui la presenza di recettori aberranti in tutti i pazienti indagati affetti da AIMAH (101), i risultati dei test *in vitro* che dimostrano la capacità da parte dei diversi ligandi di indurre l'ormonogenesi e la divisione cellulare (73) e la reversibilità dell'iperplasia descritta nei casi di sindrome di Cushing LH/hCG dipendenti insorti durante la gravidanza (102). Successivamente all'evento primitivo rappresentato dall'espressione dei recettori aberranti, altri eventi genetici si sovrapporrebbero nel tempo e, come

suggerito dai dati di microarray (103), sarebbero in grado di attivare segnali addizionali in grado di indurre la proliferazione cellulare e la formazione di noduli monoclonali.

L'inappropriata espressione dei recettori ormonali a carico del tessuto surrenalico potrebbe essere secondaria ad un riarrangiamento genico. Questo meccanismo è noto per altre neoplasie endocrine quali alcuni casi di adenoma paratiroideo e di carcinoma papillare della tiroide; ad oggi nessuno dei recettori aberranti individuati è localizzato nello stesso cromosoma del promotore del recettore dell'ACTH e nei casi descritti non sono stati riportati riarrangiamenti genici. Un altro possibile meccanismo potrebbe essere la presenza di alterazioni a carico dei fattori di trascrizione o dei loro coattivatori o corepressori (7). Un'ipotesi interessante proposta da Kero e collaboratori deriva dall'osservazione che il trattamento cronico con LH di topi transgenici determina oltre all'insorgenza di policistosi ovarica e tumori ovarici anche un ipercortisolismo surrenalico ACTH indipendente secondario all'espressione di recettori surrenalici ectopici per LH7hCG assenti nei controlli. L'induzione di questi recettori è assente nei topi sottoposti a gonadectomia pertanto l'ipotesi dei ricercatori è che gli elevati livelli di estrogeni possano indurre l'espressione dei recettori illeciti nella corteccia surrenalica e che pertanto l'espressione aberrante di un recettore possa derivare da una esagerata stimolazione di un gene normalmente silente (104).



## SCOPO DELLO STUDIO

L'iperaldosteronismo primitivo (PA) è caratterizzato da una cronica, eccessiva e autonoma secrezione di aldosterone da parte delle ghiandole surrenaliche. Si stima che la prevalenza di questa forma di ipertensione secondaria sia tra il 5 e il 13% rappresentando quindi la principale causa curabile di ipertensione arteriosa. I meccanismi che guidano la sintesi degli steroidi negli adenomi e nelle iperplasie surrenaliche rimangono da chiarire. Studi di diversi gruppi di ricercatori hanno chiaramente dimostrato che in alcuni casi di sindrome di Cushing da adenoma surrenalico o iperplasia surrenalica bilaterale la secrezione di cortisolo può essere regolata dalla presenza di recettori ormonali ectopici (aberranti, illeciti, inappropriati) espressi nel tessuto surrenalico. Tali evidenze da una parte contribuiscono a spiegare i meccanismi che regolano la secrezione autonoma di steroidi e dall'altra offrono la possibilità di identificare nuove strategie terapeutiche che mirino ad interferire con l'unione di specifici ligandi ai recettori aberranti. Mentre per la sindrome di Cushing esiste un'ampia letteratura sia di studi condotti *in vitro* che di studi *in vivo* che documentano come la secrezione del cortisolo in alcuni casi possa essere regolata dall'espressione aberrante di questi recettori, per l'iperaldosteronismo primitivo i dati pubblicati si riferiscono per la maggior parte a *studi in vitro*. Attraverso tecniche di immunistochemica e biologia molecolare in alcuni studi si è potuto dimostrare che anche gli aldosteronomi possono esprimere questi recettori illeciti. I dati pubblicati finora su studi condotti *in vivo* nei pazienti affetti da iperaldoosteronismo per indagare gli effetti dei recettori aberranti sulla secrezione di aldosterone sono aneddotici.

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di approfondire il possibile ruolo dei recettori dell'LH e del GnRH nella fisiopatologia dell'iperaldosteronismo primitivo. Il lavoro si è svolto partendo dallo studio clinico di una paziente affetta da iperaldoosteronismo primitivo insorto in gravidanza e successivamente esteso ad una casistica più ampia di pazienti per indagare attraverso test *in vivo* e studi molecolari la possibile ricaduta clinica dei dati finora riportati in letteratura.

Gli obiettivi del lavoro svolto sono stati:

- valutare la risposta *in vivo* dell'aldosterone al GnRH in pazienti affetti da iperaldoosteronismo primitivo e in un gruppo di controllo.
- studiare l'espressione tissutale del recettore dell'LH/hCG e del GnRH in pazienti affetti da iperaldoosteronismo primitivo confrontandola con l'espressione dei recettori nel tessuto surrenalico normale.
- eseguire studi di immunistochemica sul tessuto dei pazienti sottoposti all'intervento chirurgico per identificare se e dove era presenti rispettivamente il recettore per LH/hCG e il recettore per il GnRH.





## MATERIALI E METODI

Caso indice: una donna di 32 aa è giunta alla nostra osservazione per il riscontro di ipertensione arteriosa (livelli pressori medi (155/95 mmHg) e ipokaliemia (2,2 mmol/L) diagnosticata durante il settimo mese di gravidanza. Per la persistenza di ipertensione arteriosa dopo il parto la paziente, in trattamento farmacologico con calcio antagonisti e potassio, è stata sottoposta ad alcuni accertamenti che hanno evidenziato rispettivamente: PRA in clinostatismo 0,1 ng/ml/h; aldosterone in clinostatismo 38 ng/dl; cortisolo in clinostatismo 6 ug/dl; PRA in ortostatismo 0,2 ng/ml/h; aldosterone in ortostatismo 61,6 ng/dl; cortisolo plasmatico in ortostatismo 9 ug /dl; PRA dopo Captopril (50 mg) 0,1 ng/ml/h; aldosterone dopo Captopril 125,8 ng/dl e PRA e aldosterone plasmatico dopo infusione salina rispettivamente di 0,2 ng/ml/h e 63 ng/dl. La RMN addominale ha evidenziato una massa surrenalica sinistra di 2x1x1 cm. Il cateterismo venoso surrenalico ha deposto a favore di una lateralizzazione sinistra pertanto la paziente è stata sottoposta ad adrenalectomia sinistra con normalizzazione dei livelli pressori e della potassiemia nel post-chirurgico.

Pazienti e tessuti: per valutare *in vivo* l'effetto della somministrazione del GnRH sui livelli di aldosterone plasmatico all'interno della nostra casistica di pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo abbiamo selezionato 12 pazienti (6 maschi e 6 femmine, età media di diagnosi 49±14 aa); sono stati arruolati anche 5 soggetti sani come gruppo di controllo. In tutti i pazienti la diagnosi di iperaldosteronismo primitivo è stata posta utilizzando inizialmente come test di screening il dosaggio di aldosterone e PRA in ortostatismo e considerando significativo un rapporto plasmatico aldosterone/renina (ARR) superiore a 40. Il riscontro di un elevato rapporto ARR ha richiesto ulteriori test di conferma per dimostrare una inappropriata secrezione di aldosterone. I pazienti hanno eseguito un test al captopril e in questo caso si è considerato positivo un rapporto ARR > 30 dopo lo stimolo. Successivamente tutti sono stati sottoposti al test di infusione salina; in questo caso si è considerato significativo il riscontro di un valore di aldosterone plasmatico  $\geq 7$  ng/dl dopo carico salino. Dopo la conferma biochimica dell'iperaldosteronismo primitivo i pazienti sono stati sottoposti a una valutazione strumentale per lo studio delle logge surrenaliche con TAC o RMN. Dei 12 pazienti sui quali abbiamo effettuato il test *in vivo* 11 casi sono stati sottoposti a cateterismo delle vene surrenaliche.

I tessuti utilizzati per gli studi di espressione sono stati selezionati dall'oncoteca della nostra Unità Operativa. Le analisi sono state condotte su 21 tessuti di adenomi aldosterone secernenti e 2 casi di iperplasia surrenalica monolaterale. I campioni sono stati collezionati subito dopo l'intervento

chirurgico e conservati in RNAlater (Ambion, USA) a  $-20^{\circ}$  C fino all'analisi molecolare. I campioni di surrene normale sono stati ottenuti da 6 pazienti sottoposti a trapianto renale. Gli studi di immunostochimica per il recettore dell'LH sono stati condotti sui tessuti raccolti in formalina. L'analisi è stata effettuata rispettivamente per il recettore dell' LH in 17 casi e per il recettore del GnRH in 7 tessuti patologici .

Studi in vivo: Dei 12 pazienti studiati 9 presentavano un adenoma secernente aldosterone e 3 un iperaldosteronismo con un quadro di iperplasia micro/macronodulare. In tutti i pazienti è stata valutata la risposta dell'aldosterone plasmatico dopo iniezione ev di 100 mcg di GnRH (Relefact LHRH®). Per eseguire il test i pazienti dovevano essere a digiuno, aver sospeso i farmaci antiipertensivi da almeno 20 giorni o nei casi di ipertensione grave proseguire trattamento con calcio-antagonisti, in caso di ipokaliemia correggere opportunamente la potassiemia e rimanere in posizione supina almeno un'ora prima dell'esecuzione del test. Tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato alla procedura. Dopo l'iniezione sono stati eseguiti prelievi ematici ai tempi - 15', 0', 30', 60', 90', 120', 180', 240' per il dosaggio di aldosterone, cortisolo, LH/FSH, e PRA. Il dosaggio di PRA e cortisolo plasmatico è stato condotto per escludere che un eventuale incremento dei livelli di aldosterone fosse secondario all'attivazione del sistema RAAS o dell'asse corticotropo. Si è considerato un test positivo in presenza di un incremento dei valori di aldosterone plasmatico maggiore o uguale al 50% dopo lo stimolo rispetto ai valori basali , una risposta parziale è stata considerata per un incremento percentuale tra il 25 e il 50% e un aumento dei livelli di aldosterone plasmatico inferiori al 25% sono stati giudicati come non significativi. La scelta di questi cut-off deriva dalle precedenti pubblicazioni sull'espressione di recettori illeciti nella sindrome di Cushing non essendoci ancora sufficienti dati inerenti l'iperaldosteronismo.

Nel caso indice abbiamo eseguito anche le seguenti misurazioni:

-dosaggio di aldosterone, PRA e cortisolo ai tempi -15', 0', 60', 120', 180' 240' 300' e a 24h dopo la somministrazione IM di gonadotropina corionica (Gonasi® 5000 IU i.m ).

-dosaggi seriati di aldosterone e PRA nelle diversi fasi del ciclo mestruale e in particolare durante la fase follicolare precoce, ovulatoria, periovulatoria e luteinica.

-dosaggi seriati per 1 mese a distanza di 2-4 gg di aldosterone, PRA, cortisolo, LH, FSH e potassio dopo la somministrazione intramuscolo del GnRH analogo Triptorelina 3,75 mg IM (Decapeptyl®).

-test al GnRH (100 mcg ev, Relefact LHRH®) con le determinazioni ormonali già indicate eseguito a distanza di un mese dall'intervento di surrenectomia monolaterale.

I dosaggi di aldosterone e cortisolo plasmatico, LH, FSH sono stati eseguiti con metodica RIA mentre i dosaggi dell'ACTH sono stati effettuati in IRMA .

Studi molecolari: I tessuti sono stati omogeneizzati e l'RNA è stato estratto con 1 ml di Trizol (Invitrogen) in accordo con il protocollo raccomandato dal produttore. La qualità dell'RNA è stata confermata tramite Agilent Bioanalyser (Agilent). Successivamente si è eseguita la retrotrascrizione. Per quantificare il gene oggetto dello studio abbiamo utilizzato la *Real Time PCR*. Abbiamo utilizzato la metodica del SYBR green PCR che utilizza una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA utilizzando il sistema ABI9700 (Applied Biosystem).

I primers utilizzati per l'amplificazione delle sequenze target sono stati costruiti sulla base delle sequenze pubblicate per il recettore umano dell'LH/hCG, per il recettore umano del GnRH e per la  $\beta$ -actina. Nello specifico i primers utilizzati sono stati rispettivamente per il recettore dell'LH/hCG F 5'-TCTGGAGAAGATGCACAATGGA-3' e R 5'GCCTGCAATTTGGTGGGAAGA3' per il recettore del GnRH F5'GGACCGCTCCCTGGCTAT 3'e R5'ACTGTCCGACTTTGCTGTTGCT3' e per la  $\beta$ -actina F 5'CCTGGCACCCAGCACAAT3' e R 5'GCCGATCCACACGGAGTACT 3'. La PCR è stata fatta in un volume totale di 30  $\mu$ l per reazione utilizzando i parametri per la reazione raccomandati. Tutte le reazioni per i recettori e il gene housekeeping sono state fatte allo stesso momento. I dati sono stati ottenuti come un valore di  $C_t$  (ossia il numero del ciclo a cui il *plot* logaritmico della PCR interseca una linea soglia prestabilita) e sono stato utilizzati per determinare il  $\Delta C_t$  ( $\Delta C_t = C_t$  del gene target -  $C_t$  del gene housekeeping). Per calcolare di quante volte cambia l'espressione genica tra due categorie di campioni è stata utilizzata la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Le misure sono state condotte in triplicato.

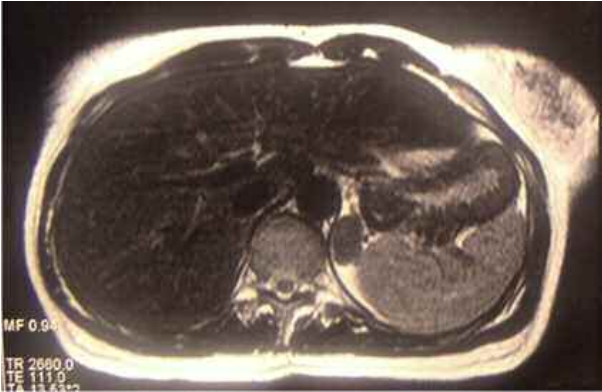
Studi di immunoistochimica: l'analisi immunoistochimica è stata condotta su 16 tessuti patologici per il recettore dell'LH/hCG e su 7 tessuti patologici per il recettore del GnRH. È stato impiegato un apparecchio per la colorazione (Vision Biosystems 'Define' Polymer Detection System, Newcastle, UK) impiegando il sistema automatizzato Bond-maX che prevede l'utilizzo di sezioni di tessuto precedentemente trattato in formalina di 5  $\mu$ m di spessore. Le sezioni vengono trasferite su vetrini e posti a 62°C per 30 minuti. L'anticorpo anti-LH/hCG (L6792, Sigma Aldrich Inc) è stato diluito 1:200 mentre l'anticorpo anti-GnRH (G0920) è stato diluito 1:50. Le sezioni sono state pretrattate con l'enzima Bond per 10 minuti e incubate con l'anticorpo primario per trenta minuti e con un successivo anticorpo secondario per venti minuti e in diaminobenzidine Define per dieci minuti e colorate con ematossilina.



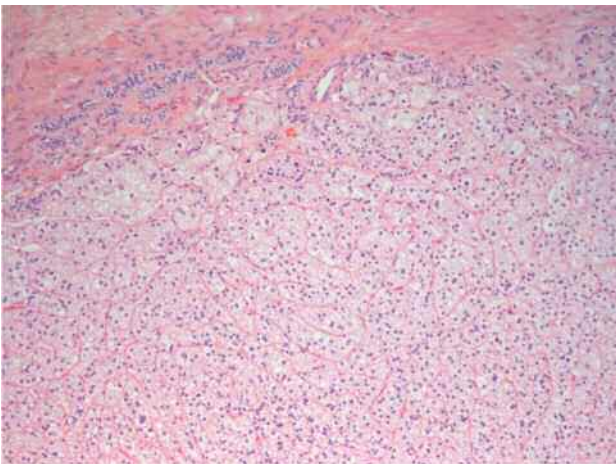
## RISULTATI

### Caso indice

Nelle Fig.1 e 2 sono riportate rispettivamente l'immagine della RMN surrenalica in cui si è evidenziata la massa surrenalica sinistra di 2x1x1 cm e l'istologia dell'aldosteronoma.

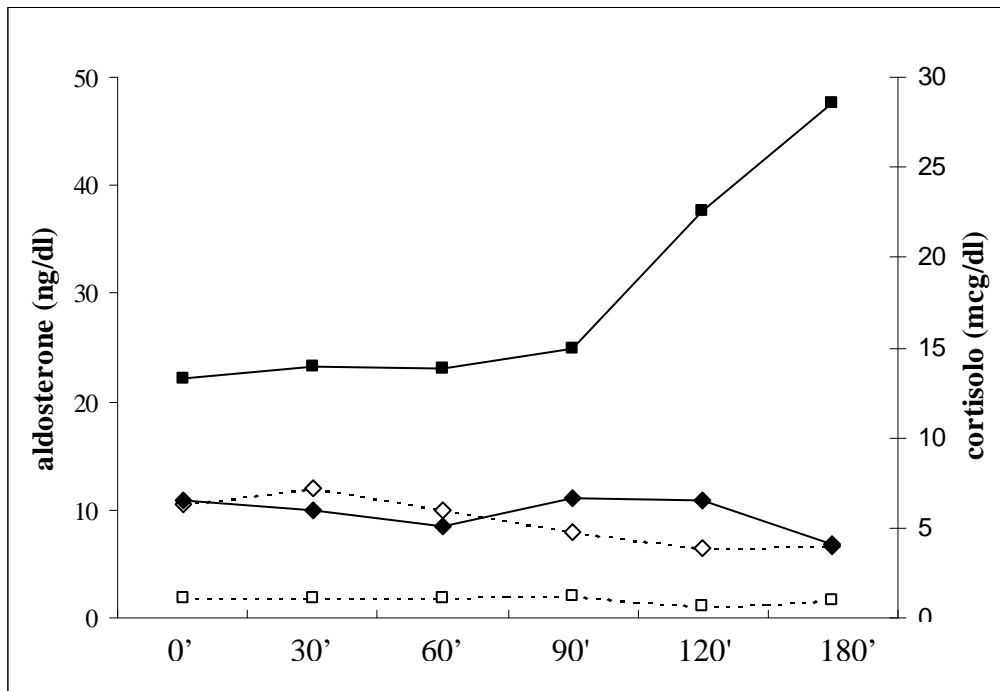


**Fig.1** RMN addome del caso indice che evidenzia una massa surrenalica sinistra di 2x1x1 cm.



**Fig.2** Esame istologico del tumore surrenalico che evidenzia un adenoma della corticale.

I risultati dei test al GnRH condotti nel pre e post operatorio nel caso indice sono visualizzati nella Fig.3. Il test di stimolo condotto prima dell'intervento ha evidenziato un incremento dei valori di aldosterone plasmatico del 114% rispetto al prelievo basale, il picco è stato raggiunto al 180'. Il test ripetuto dopo un mese dall'intervento di surrenectomia monolaterale non ha evidenziato alcun incremento dell'aldosterone dopo stimolo. Nella figura sono riportati anche i dosaggi del cortisolo plasmatico che non subiscono alcuna variazione significativa durante l'esame. La PRA dosata durante il test prima dell'intervento è sempre stata inferiore a 0,1 ng/ml/h e nel post-chirurgico tra 1 e 2 ng/m/h.

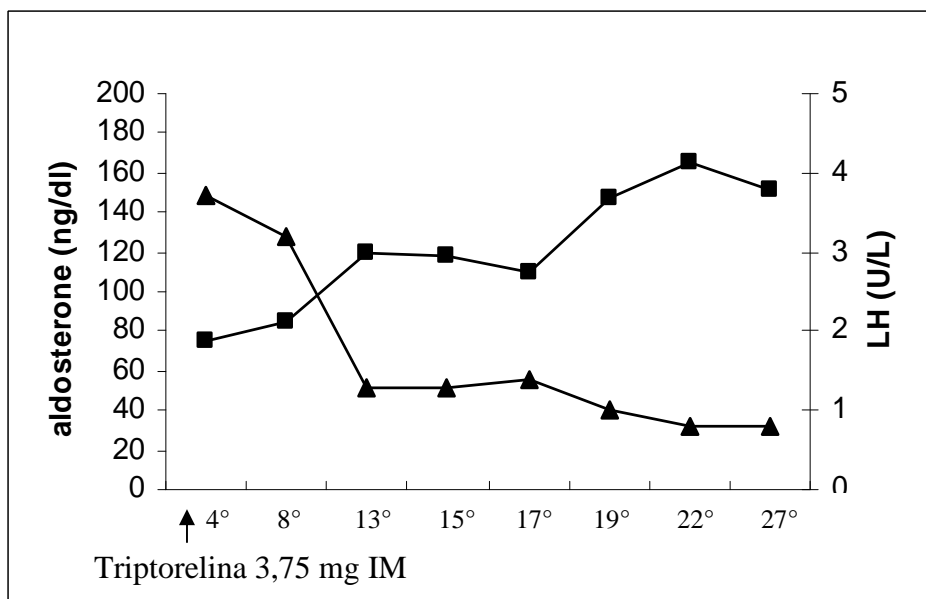


**Fig. 3.** Effetto dell'iniezione di GnRH sui livelli di aldosterone (■) e cortisolo (◆) prima dell'intervento e di aldosterone (□) e cortisolo (◇) dopo l'intervento.

I dosaggi di aldosterone plasmatico effettuati dopo l'iniezione della gonadotropina corionica hanno evidenziato una risposta positiva con un incremento dell'aldosterone del 73% rispetto ai valori basali passando da 48,5 a 85,8 ng/dl dopo 3 ore dalla somministrazione, anche in questo caso i valori di cortisolo plasmatico e PRA non hanno subito significative variazioni durante il test.

I dosaggi dell'aldosterone plasmatico durante il ciclo mestruale sono risultati rispettivamente in fase follicolare di 22,2 ng/dl (8° giorno), in fase ovulatoria di 129 ng/dl (13° giorno) e in fase luteinica di 53,8 ng/dl (21° giorno).

In Fig.4 sono rappresentate le variazioni dei livelli di aldosterone plasmatico e LH misurate il 4°, 8°, 13°, 15°, 17°, 19°, 22° e 27° giorno dopo la somministrazione nella paziente di Triptorelina IM



**Fig.4** Effetto della somministrazione di Triptorelina sui livelli di aldosterone (■) e LH (▲)

La somministrazione dell’analogo del GnRH ha determinato nella paziente la comparsa di amenorrea; i valori di aldosterone plasmatico sono progressivamente aumentati arrivando ad un incremento massimo del 120% rispetto al basale il 22° giorno dopo l’iniezione del farmaco. I valori di LH come atteso si sono progressivamente ridotti; la PRA è risultata di 2,6 ng/ml/h l’ottavo giorno dopo l’iniezione e poi è sempre risultata inferiore a 0,5 ng/ml/h. La cortisolemia è sempre stata nella norma e non si sono registrate fluttuazioni significative mentre si è osservato un peggioramento dell’ipokaliemia a partire dal 13° giorno dopo l’iniezione.

### Studi in vivo

Nella Tab 1 sono riportate le caratteristiche cliniche dei pazienti sottoposti al test ed è indicato l’incremento percentuale dell’aldosterone plasmatico dopo lo stimolo per ogni paziente studiato.

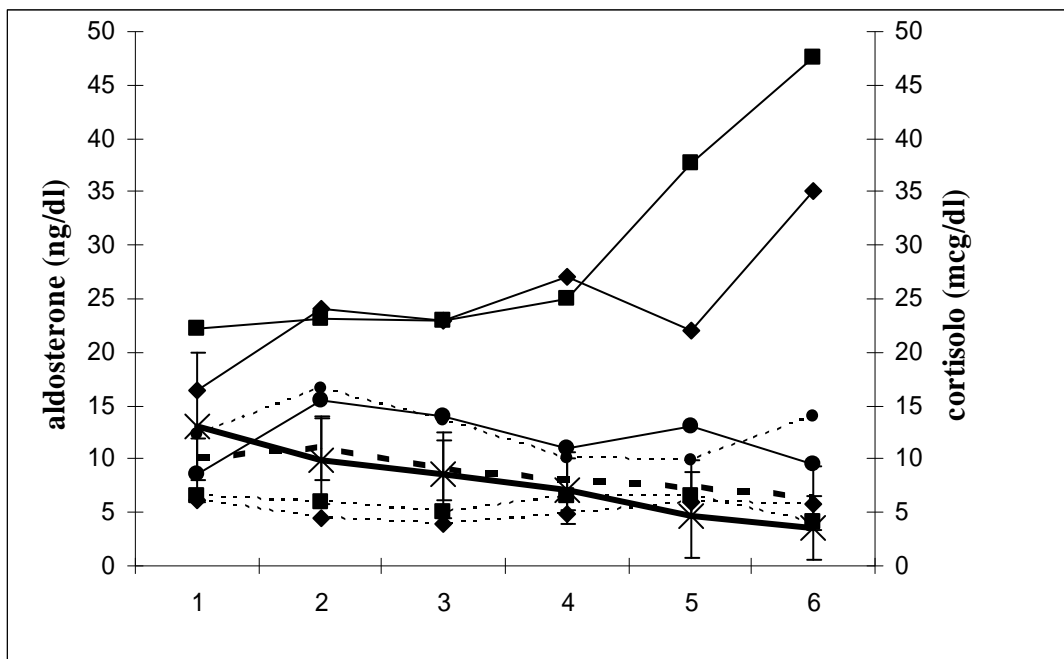
P	Sex	Età diagnosi	Rapporto Aldosterone (ng/dl) PRA (ng/ml/h)	Aldosterone dopo carico salino (ng/dl)	Cateterismo surrenalico	GNRH test: incremento aldosterone (%)	Diagnosi
1	M	60	118	15	sx	41	IHA
2	F	32	308	63	sx	<b>114</b>	APA
3	F	34	80	25	sx	33	APA
4	M	53	41	55	nc	<b>114</b>	APA
5	M	40	46	27	sx	30	APA
6	F	43	100	10	dx	44	APA
7	M	50	80	20	ne	<b>80</b>	IHA
8	F	35	45	17	dx	31	APA
9	F	42	360	56	sx	26	APA
10	F	41	253	16	sx	31	IHA
11	M	69	107	10	sx	0	APA
12	M	72	91	13	nc	0	APA

**Tab.1** Caratteristiche cliniche dei pazienti e incremento massimo dell’aldosterone plasmatico (espresso in %) dopo GnRH test (sx: sinistro; dx: destro; nc: non conclusivo; ne: non eseguito; APA:adenoma surrenalico; IHA: iperplasia surrenalica bilaterale.)

In 10 su 12 pazienti si è osservato un incremento dei valori di aldosterone plasmatico dopo l’iniezione di GnRH. In 7 casi l’aumento percentuale è stato tra il 25 e il 50% mentre in 3 casi (P2, P4, P7) la risposta è stata superiore al 50% e quindi si è considerato il test come positivo. Nella



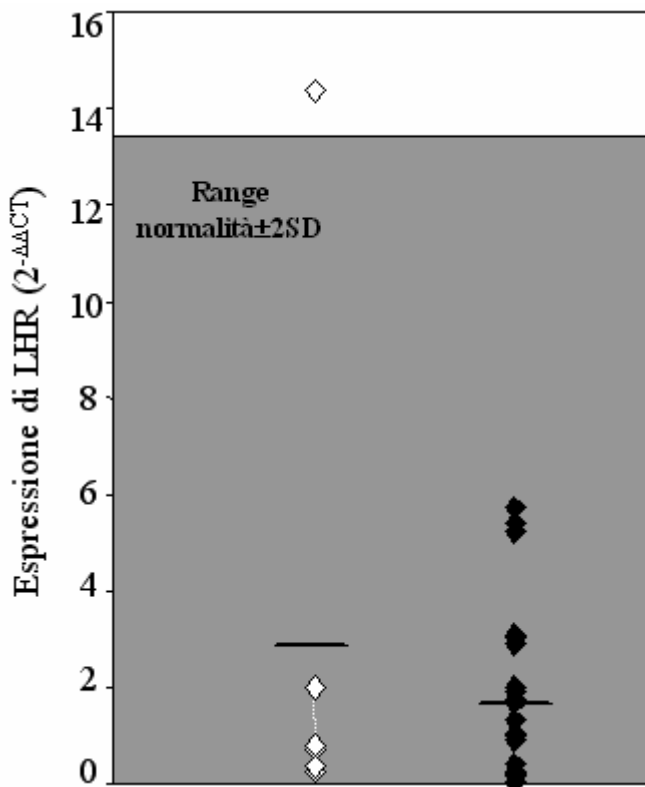
Fig.5 sono riportati i risultati dei test in vivo per questi ultimi pazienti. In due casi l'incremento dell'aldosterone è stato del 114% e il picco si è osservato alla terza ora. I valori di cortisolo per questi due pazienti non hanno mai subito variazioni significative. Nel terzo paziente che ha avuto una risposta positiva con un incremento massimo dell'aldosterone dell'80% il picco si è registrato al 30', in questo caso c'è stato anche un incremento dei livelli di cortisolo plasmatico pertanto non è possibile escludere che la risposta dell'aldosterone possa essere secondaria ad un aumento dell'ACTH. I valori di cortisolo negli altri 7 pazienti con risposta parziale non sono aumentati durante i test. Nella Fig.5 sono anche riportati i valori medi ( $\pm$ DS) di aldosterone e cortisolo dosati nei 5 controlli sani sottoposti al test.



**Fig.5.** Risposta di aldosterone (—) e cortisolo (.....) dopo GnRH nei 3 pazienti con risposta positiva (P2■; P4◆; P7●) e nei 5 soggetti di controllo (×) per i quali sono riportati i valori medi $\pm$  SD dei due ormoni..

### Studi Molecolari

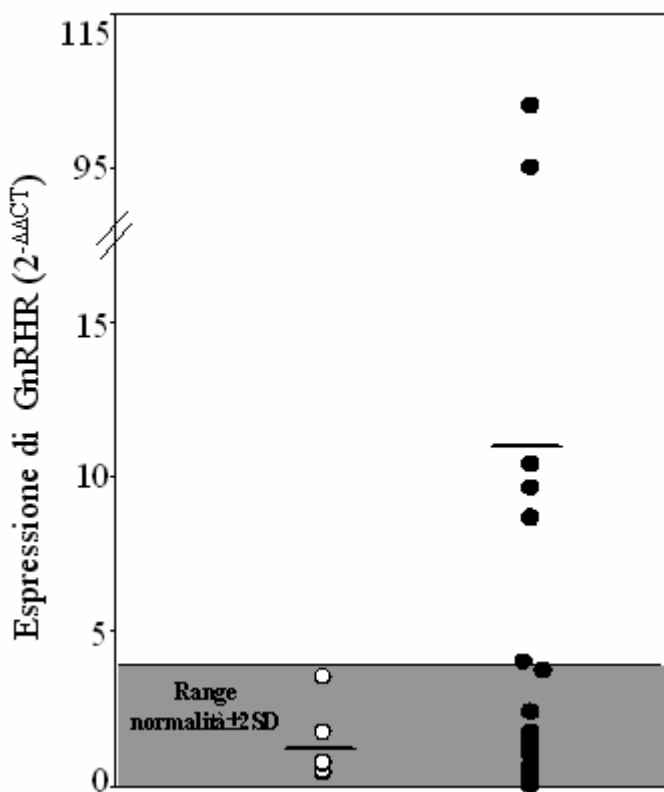
I risultati delle *Real Time-PCR* per il recettore dell'LH e del GnRH condotte sui campioni di pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo (23 casi) e tessuto surrenalico normale (6 casi) sono riportati rispettivamente nelle Fig 6 e 7. Dei 23 tessuti patologici analizzati 21 appartenevano a pazienti con diagnosi biochimica e strumentale di PA da aldosteronoma mentre in 2 casi i pazienti presentavano una iperplasia macronodulare sottoposta ad intervento chirurgico dopo l'esecuzione di cateterismo che evidenziava una chiara lateralizzazione della secrezione di aldosterone.



**Fig.6** Espressione del recettore LH-R in 23 PA(◆) e in 6 surreni normali (◇)  
 (— valori medi di espressione di LHR)

Lo studio dell'espressione del recettore per LH attraverso RT-PCR (Fig.6) ha evidenziato la presenza del recettore per LH in tutti i surreni normali con un valore medio di espressione di  $3.08 \pm 5.56$  (SD). Nei tessuti patologici il recettore è presente in 22 su 23 campioni con un valore medio di espressione del gene di  $1,8 \pm 1,7$ . In nessuno dei casi si è rilevato un livello di espressione significativamente superiore al range di normalità, definito come il valore corrispondente a più due deviazioni standard dal valore medio di espressione del gene dei tessuti normali.

Il recettore per il GnRH è risultato essere presente nei surreni normali anche se con un valore medio di espressione molto basso; nei tessuti patologici il recettore è stato identificato in 22 tessuti sui 23 studiati con un valore medio di espressione di  $11 \pm 29$  rispetto ai normali. In 7 dei tessuti PA studiati i livelli di espressione del recettore del GnRH sono risultati significativamente elevati e in due casi di aldosteronoma l'espressione del gene è risultata aumentata rispettivamente di 95 e 109 volte rispetto al tessuto surrenalico normale (Fig.7).

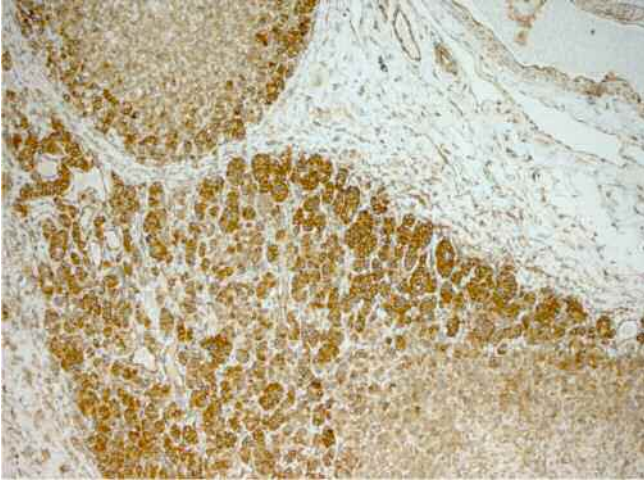


**Fig.7** Espressione del recettore GnRH-R in 23 PA (●) e in 6 surreni normali (○).  
 (—valori medi di espressione di GnRHR)

### **Immunoistochimica**

L'immunoistochimica per il recettore dell'LH è stata condotta su 16 tessuti patologici e su 14 tessuti peritumorali. In 12 casi è stato identificato il recettore nel tessuto tumorale mentre 4 casi sono risultati negativi (Fig.8). Sui 14 tessuti peritumorali 13 mostravano una immunoistochimica positiva per LH-R. Due dei casi hanno evidenziato una franca positività del recettore dell'LH del tessuto studiato rispetto agli altri campioni, il recettore risultava distribuito uniformemente sia nel tessuto tumorale che nel tessuto peritumorale.

L'immunoistochimica per il GnRH ha evidenziato la presenza del recettore in tutti e 7 i tessuti patologici dei pazienti indagati e in 5 tessuti peritumorali. La paziente del caso indice presentava una intensa positività del tessuto adenomatoso (Fig.9).



**Fig.8** Immunoistochimica per LHR del caso indice



**Fig.9** Immunoistochimica per GnRH del caso indice

### **Correlazione dei dati clinici e molecolari**

7 pazienti di cui 5 con aldosteronoma e 2 con iperplasia macronodulare sono stati inclusi sia nello studio in vivo che negli studi di espressione (Tab.2). Dall'analisi dei dati emerge che tutti i pazienti che presentavano una risposta dell'aldosterone al test in vivo presentavano anche una espressione dei due recettori documentata dalla RTPCR. L'immunoistochimica per il recettore dell'LH è risultata negativa in due casi in cui il gene era risultato espresso con l'RTPCR anche se con livelli non significativamente elevati. La paziente del caso indice presentava all'immunoistochimica una intensa positività sia per il recettore dell'LH che per il recettore del GnRH e mentre per quest'ultimo i dati sono stati supportati anche dall'analisi molecolare abbiamo trovato inaspettatamente ridotti livelli di espressione del recettore dell'LH. Nella paziente 3 a fronte di una espressione significativamente elevata del GnRH-R e dell'LH-R documentata anche dai dati di immunoistochimica si è osservata una risposta parziale al *test in vivo*.

			<i>Real Time PCR</i>		<i>Imunoistochimica</i>			
<b>P</b>	<b>Diagnosi</b>	<b>GNRH test: incremento aldosterone (%)</b>	<b>LH-R (2<sup>^</sup> -ΔΔ Ct)</b>	<b>GNRHR (2<sup>^</sup> -ΔΔ Ct)</b>	<b>LH-R adenoma</b>	<b>LH-R Tessuto peritumorale</b>	<b>GnRHR adenoma</b>	<b>GnRHR Tessuto peritumorale</b>
1	IHA	41	1.3	0.48	+ -	+	+	+
2	APA	114	0.9	4	++	++	+++	+
3	APA	33	5.27	3.76	++	++	++	+
5	APA	30	0.19	0.46	+	ND	ND	ND
6	APA	44	0.24	0.64	-	-	+ -	ND
9	APA	26	0.29	0.16	-	+	ND	ND
10	IHA	31	0.42	1.24	-	-	+	+ -

**Tab.2** Correlazione dei dati clinici e molecolari in 7 pazienti.

## DISCUSSIONE

Sebbene l'aldosteronoma e l'iperplasia surrenalica rappresentino le due cause più frequenti di iperaldosteronismo primitivo le conoscenze sui meccanismi fisiopatologici che determinano una ipersecrezione autonoma di aldosterone sono assai limitate. Gli affascinanti studi condotti negli ultimi anni nella Sindrome di Cushing ACTH indipendente hanno potuto dimostrare che in alcuni casi l'ormonogenesi può essere regolata dalla presenza di recettori illeciti di membrana che sono in grado di attivare i meccanismi post-recettoriali intracellulari e quindi indurre la sintesi di steroidi. Le scoperte di questi anni hanno consentito di dare una spiegazione a quadri clinici peculiari descritti in letteratura già a partire dagli anni 50 come ad esempio alcuni casi di Sindrome di Cushing insorti in gravidanza e che poi andavano in remissione dopo il parto. Studi simili sono stati pubblicati negli ultimi anni anche nell'iperaldosteronismo ma si riferiscono soprattutto alla ricerca molecolare di peptidi aberranti nel tessuto patologico mentre sono pochi e molto recenti gli studi che valutano la risposta in vivo dell'aldosterone a sostanze che potenzialmente si legano a questi recettori.

Il nostro gruppo di ricerca aveva già collaborato agli studi molecolari condotti dal gruppo di Rainey che documentavano un'iperpressione del recettore dell'LH e del GnRH nei tessuti di alcuni pazienti affetti da PA. Mentre da una parte sembra chiaro che sia i surreni normali che alcuni adenomi esprimono livelli variabili di recettore per l'LH/hCG non è chiaro se gli effetti surrenalici delle gonadotropine ipofisarie e della gonadotropina corionica possano essere considerati come un raro evento fisiopatologico o un fenomeno fisiologico comune che può essere esacerbato da una esagerata, cronica esposizione ad elevati livelli di gonadotropine. Non bisogna dimenticare che i surreni e le gonadi hanno una comune origine ontogenica derivando entrambi dalle stesse cellule progenitrici della cresta urogenitale (105) e che durante la vita fetale esiste una reciprocità di espressione nel tessuto gonadico e surrenalico di alcuni geni che sembra regredire dopo la nascita ma che potrebbe riemergere in alcune situazioni aberranti quale appunto la tumorigenesi (106). L'interesse ad ampliare e approfondire questi dati anche da un punto di vista clinico oltre che molecolare è emerso dopo i primi test condotti nel caso indice descritto. La storia clinica della nostra paziente faceva ipotizzare che la secrezione autonoma di aldosterone in questo caso potesse dipendere dalla presenza di un'espressione anomala surrenalica dei recettori per LH/hCG e che la gravidanza e quindi le elevate concentrazioni di gonadotropina corionica potessero spiegare il quadro clinico. I risultati ottenuti dai test con GnRH e hCG erano concordi con l'ipotesi iniziale in quanto osservavamo un incremento significativo delle concentrazioni di aldosterone dopo l'iniezione di due stimoli fisiologici, uno diretto e uno indiretto, del recettore dell'LH/hCG. Anche i

dosaggi seriatî degli ormoni durante le varie fasi del ciclo mestruale mostravano un incremento significativo dei livelli di aldosterone plasmatico nella fase ovulatoria corrispondente quindi al picco di LH. In base ai dati ottenuti dai primi test condotti e alle esperienze precedentemente descritte nei Cushing LH/hCG dipendenti alla paziente è stato somministrato un analogo del GnRH long-acting e sono stati eseguiti dosaggi seriatî ogni 2-4 gg dopo la somministrazione. Come atteso a partire dall'ottavo giorno dopo l'iniezione della Triptorelina si è osservata una graduale soppressione delle gonadotropine ipofisarie che ha determinato nella paziente la comparsa di amenorrea; il risultato inaspettato è stato il progressivo incremento dei livelli di aldosterone plasmatico accompagnato dal peggioramento della potassiemia tanto che si è deciso di non continuare la somministrazione dell'analogo a differenza di quanto avevamo inizialmente previsto. Il peggioramento inatteso dell'iperaldosteronismo dopo la soppressione dei livelli di LH ci ha indotto ad eseguire nel tessuto post operatorio gli studi di espressione e di immunoistocimica non solo per il recettore dell'LH ma anche per il recettore del GnRH. Nell'adenoma della paziente abbiamo riscontrato un'espressione del recettore del GnRH significativamente aumentata rispetto ai surreni normali e anche l'immunoistochimica ha supportato tale dato evidenziando una marcata positività delle cellule simil-glomerulari del tessuto adenomatoso. Lo studio dell'espressione del recettore dell'LH/hCG non ha evidenziato un'iperespressione rispetto ai tessuti normali; l'analisi immunoistochimica ha identificato il recettore sia nel tessuto patologico che nel tessuto peritumorale.

Gli studi molecolari condotti sull'espressione aberrante del recettore dell'LH negli aldosteronomi da Rainey e collaboratori hanno evidenziato inizialmente un'iperespressione del recettore in 9 campioni di APA sui 18 analizzati con un campione che presentava dei livelli di espressione 2400 volte maggiore rispetto al tessuto surrenalico normale (96). Dati successivi dello stesso gruppo di ricercatori hanno identificato un'iperespressione del recettore di LH in un caso su 28 tessuti PA analizzati; in questo lavoro rispetto al precedente si sono osservati livelli di espressione di LHR estremamente variabili e più elevati anche nei soggetti normali (97). L'unico lavoro in cui i dati molecolari sono stati affiancati ai test in vivo è stato recentemente pubblicato dal gruppo di Reincke e collaboratori. Nella loro casistica 3 pazienti con PA sui 12 studiati presentano una risposta positiva dell'aldosterone dopo GnRH suggerendo una possibile espressione illecita dei recettori di LH/hCG o di GnRH e in nessuno degli 8 controlli si è osservato un incremento dei livelli di aldosterone plasmatico. L'espressione del recettore dell'LH indagata attraverso PCR quantitativa è risultata paragonabile nei tessuti normali e in 13 su 15 aldosteronomi mentre in un caso i livelli di mRNA apparivano moderatamente elevati rispetto ai controlli (100). I risultati dei test *in vivo* condotti nel nostro lavoro hanno evidenziato che una elevata percentuale di pazienti (10 su 12)

presenta un incremento variabile dei livelli di aldosterone dopo GnRH ma solo in 3 casi la risposta è stata superiore al 50% e quindi positiva e in due di questi con un incremento superiore al 100%; nel paziente in cui abbiamo documentato un incremento dell'aldosterone dell'80% si è osservato un contemporaneo incremento dei valori di cortisolo plasmatico pertanto non è possibile escludere un effetto stimolatorio sull'aldosterone da parte dell'ACTH. Due dei pazienti con risposta positiva presentavano un adenoma surrenalico, uno era il caso indice, mentre il terzo un quadro di iperplasia surrenalica bilaterale. Negli altri 7 casi vi è stata una risposta parziale al test con un incremento variabile dell'aldosterone tra il 25 e il 50% ; in nessuno dei soggetti del gruppo di controllo si è osservato un incremento dei livelli di aldosterone dopo stimolo. Le risposte ottenute dai test *in vivo* ci hanno indotto a pensare che almeno una parte dei pazienti potesse esprimere in modo illecito o il recettore per l'LH o il recettore per il GnRH. Lo studio dell'espressione del recettore LH/hCGR attraverso RTPCR pur evidenziando in 22 su 23 tessuti patologici il recettore non ha identificato in nessuno dei campioni dei livelli di recettore significativamente elevati rispetto al tessuto surrenalico normale; come nei lavori precedentemente pubblicati anche nel nostro pool di normali in tutti i campioni era espresso il recettore con dei livelli estremamente variabili. Dei tre pazienti con risposta positiva al test *in vivo* avevamo il tessuto solo del caso indice in cui non abbiamo trovato elevati livelli di LHR. Accanto ai test *in vivo* e agli studi molecolari abbiamo eseguito anche l'immunoistochimica per LH/hCGR che ha supportato i risultati ottenuti con la PCR. Il recettore LH/hCG-R pertanto parrebbe avere una espressione eutopica non solo a carico della fascicolata e reticolare come già noto ma anche a livello della zona glomerulare. Mentre da una parte si cerca di spiegare se l'espressione aberrante di questo recettore possa rappresentare, in alcuni casi, un evento chiave nella fisiopatologia della ipersecrezione di aldosterone d'altra parte non esistono evidenze sulla possibile funzione fisiologica di questo recettore che appare espresso costitutivamente nel surrene. Inoltre da studi pubblicati in precedenza nella sindrome di Cushing ma anche dal recente lavoro di Reincke sull'iperaldosteronismo appare che uno stesso paziente possano rispondere a diversi peptidi e quindi presentare nel tessuto patologico l'espressione di diversi recettori appartenenti alla superfamiglia delle proteine G. Questi studi sottolineano un'altra dimensione del problema dei recettori aberranti nelle ghiandole surrenaliche, è possibile che l'attivazione del signaling intracellulare e in particolare della cascata del c-AMP passi attraverso l'induzione di diversi recettori illeciti. La risposta all'LH, in alcuni casi specifici, potrebbe essere un fenomeno secondario conseguente alla stimolazione o up-regolazione dei recettori LHR o di altri recettori GPCRs dopo l'esposizione prolungata ad elevati livelli di LH. L'alterata regolazione delle pathways intracellulari in soggetti suscettibili potrebbe facilitare lo sviluppo di neoplasie come è stato recentemente riportato per la via del cAMP/PKA in alcuni casi di neoplasie surrenaliche familiari



e sporadiche (107-108). Una questione aperta è se situazioni caratterizzate da un incremento delle gonadotropine (ad es. menopausa, ipogonadismo primitivo, PCOS) possano modificare la funzionalità surrenalica data l'espressione costitutiva, pur a bassi livelli, del recettore LH/hCGR e se le patologie surrenaliche LH/HCG dipendenti rappresentino l'aspetto finale di un continuum di forme subcliniche di risposte surrenaliche agli elevati livelli di LH/hCG. In questo senso in un lavoro recentemente pubblicato da Huthaniemi e collaboratori si è osservato che nelle donne in postmenopausa vi è una correlazione positiva significativa tra i livelli di cortisolo, DHEAS ed LH (109). Gli esperimenti condotti su modelli animali hanno evidenziato che elevati livelli di LH sono in grado di indurre modificazioni a carico della ghiandola surrenalica che vanno dall'iperplasia allo sviluppo di tumori maligni e hanno anche evidenziato che questa variabilità di risposta dipende da uno specifico background genetico che potrebbe spiegare le alterazioni LH-correlate riconosciute in alcuni individui (106).

Dai dati pubblicati da Rainey nel 2007 sull'espressione dei recettori legati alle proteine G negli aldosteronomi, indagata attraverso microarray e qRT-PCR, emerge che 11 aldosteronomi sui 28 studiati presentano un'espressione del recettore GnRHR significativamente elevata rispetto ai tessuti surrenalici normali nei quali comunque è stata identificata una minima espressione del recettore (97). Nel recente lavoro di Reincke 4 dei 15 campioni di aldosteronoma studiati esprimono il GnRHR che invece non è stato identificato nel pool di surreni normali (100). Nel nostro lavoro in 22 dei 23 PA studiati è stato trovato il recettore GnRHR così come nei tessuti normali; a differenza di quanto osservato per il recettore LH/hCGR 7 casi presentavano un'espressione elevata (+ 2SD al di sopra del valore medio dei tessuti normali) e in due di questi l'espressione era aumentata rispettivamente di 95 e 109 volte rispetto al normale. Purtroppo per questi 2 casi non è stato possibile il confronto con il *test in vivo* non essendo stati indagati nel preoperatorio nel nostro centro. Dati interessanti emergono dall'analisi dell'espressione del recettore GnRHR nel tessuto del caso indice; l'RT-PCR ha evidenziato un'espressione del recettore elevata rispetto ai surreni di controllo e anche l'immunoistochimica ha evidenziato una franca positività del recettore nelle cellule tumorali.

Negli ultimi anni diverse studi si sono interessati ad approfondire oltre che il ruolo noto del GnRH a livelli ipofisario anche un possibile ruolo di questo ormone in tessuti extraipofisari partendo dall'osservazione che gli analoghi del GnRH sono in grado di inibire la crescita di linee cellulari tumorali non ipofisarie (110). Il recettore per il GnRH anche noto come LHRHR (luteinizing hormone-releasing hormone receptor) è un membro della superfamiglia dei recettori legati alla proteina G, la proteina è costituita da 328 amminoacidi ed è espressa sulla superficie delle cellule ipofisarie gonadotrope (111). Una volta attivato dal GnRH secreto a livello ipotalamico il GnRHR

induce la sintesi delle gonadotropine ipofisarie responsabili della regolazione della funzionalità ovarica e testicolare. Oltre all'espressione ipofisaria il recettore per il GnRH è presente in diversi tessuti del sistema riproduttivo (seno, endometrio, ovaio, prostata), nei tumori derivati da questi e nei linfociti. Il GnRH, ligando del GNRHR, è un decapeptide deputato alla regolazione della fisiologica secrezione delle gonadotropine; nell'uomo esistono due isoforme di questa molecola chiamate GnRH1 e 2 e mentre la prima sembra espressa soprattutto a livello ipotalamico la seconda è stata trovata in organi quali rene, osso e prostata (112). Nel tessuto ovarico l'espressione di questo recettore sembra correlare con la crescita follicolare; la proteina e l'mRNA del recettore sono stati dimostrati anche nei tumori dell'endometrio, della mammella, della prostata e dell'ovaio trovando in quest'ultimi una corrispondenza tra i livelli del recettore e lo stadio tumorale (113). Sebbene il recettore espresso nei tessuti extrapituitarici presenti la stessa sequenza nucleotidica di quello ipofisario mostra alcune peculiarità; i livelli di espressione di questo recettore sulla membrana cellulare nei tessuti extraipofisari sono ridotti e si sono riconosciute almeno due classi di GNRHR, uno ad alta e uno a bassa affinità per il ligando con espressione variabile nei diversi tessuti (114). Negli ultimi 20 anni sia gli agonisti che gli antagonisti del GnRH sono stati ampiamente utilizzati nella terapia delle neoplasie correlate agli ormoni steroidei; il razionale della terapia è quello di inibire la secrezione delle gonadotropine e quindi la sintesi degli ormoni steroidei attraverso una downregulation del recettore GNRHR ipofisario. La scoperta dell'espressione di GNRHR in diversi tessuti tumorali è stata il punto di partenza per numerosi studi svolti per indagare un possibile effetto diretto del GnRH sui tessuti tumorali e non. Le evidenze sperimentali hanno dimostrato che questo ormone e il corrispondente recettore possono essere coinvolti nella regolazione di vie post-recettoriali che modulano la proliferazione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi. D'altra parte è emersa la complessità di un sistema in cui il GnRH e i suoi agonisti presentano un'azione bifasica e opposta; mentre concentrazioni  $\mu\text{M}$  di GnRH determinano una inibizione della proliferazione cellulare *in vitro*, in cellule trattate con agonisti a basso dosaggio (10nM) si evidenzia una significativa stimolazione della crescita cellulare (115). Gli effetti, alcune volte opposti, del GnRH sembrano essere cellula dipendenti e quindi risentire del milieu intracellulare, dei livelli di espressione del recettore e dall'affinità per il ligando e delle possibili varianti di splicing del recettore. Queste evidenze sul recettore GNRHR e sul suo ligando rendono ancora più plausibile un suo possibile coinvolgimento nella fisiopatologia di alcuni casi di iperaldosteronismo primitivo. Una recente lavoro di Rainey ha confrontato i livelli di espressione dei recettori delle proteine G nel surrene fetale e nel surrene adulto (116). Dallo studio è emerso che il surrene fetale presenta elevati livelli di espressione anche del recettore GNRHR oltre che di altri recettori e che il tessuto placentare presenta elevati livelli di espressione dell'mRNA di GnRH1

durante tutta la gestazione oltre che di GnRHR e GnRH2; il ruolo di questi recettori e dei suoi ligandi nella regolazione della funzionalità surrenalica fetale rimane da chiarire. In riferimento al nostro caso indice queste evidenze risultano particolarmente interessanti se pensiamo che durante la gravidanza la paziente possa essere stata esposta ad elevati livelli di GnRH1 di origine placentare in grado potenzialmente di attivare i recettori del GnRHR iperespressi, come documentato nel nostro studio, nel tessuto adenomatoso della paziente; è importante sottolineare che il test ripetuto dopo l'intervento di surrenectomia monolaterale non ha evidenziato nessun incremento dei livelli plasmatici di aldosterone dopo stimolo.

La correlazione dei dati ottenuti dagli studi *in vivo* ed *in vitro* ha evidenziato che tutti i pazienti che hanno presentato una risposta parziale o positiva al test avevano una corrispondente espressione o del recettore dell'LH o del recettore del GnRH e che nella paziente con una franca risposta positiva il recettore per il GnRH era iperespresso e questo era evidente sia negli studi con RTPCR che con l'immunoistochimica.

## CONCLUSIONI

Nella nostra casistica, in un'elevata percentuale di pazienti con iperaldosteronismo primitivo l'aldosterone plasmatico sembra rispondere, seppur in modo variabile, allo stimolo con GnRH; in un sottogruppo di pazienti la percentuale di risposta dell'ormone è significativamente elevata.

Gli studi molecolari e di immunoistochimica condotti per il recettore dell'LH hanno evidenziato che si tratta di un recettore che oltre che presentare un'espressione eutopica è presente anche nella maggior parte dei tessuti patologici con dei livelli di espressione simili. Queste evidenze richiedono ulteriori approfondimenti per spiegare se questo recettore possa contribuire allo sviluppo di determinati fenotipi in particolare nelle situazioni cliniche caratterizzate da elevati livelli di gonadotropine.

L'espressione del recettore del GnRH è risultata significativamente elevata in un sottogruppo di pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo rispetto ai surreni normali. Le capacità di questo recettore, documentate in letteratura, di regolare vie post-recettoriali che modulano la proliferazione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi lo rendono un fattore di particolare interesse che potrebbe essere coinvolto, in un sottogruppo di pazienti, nella fisiopatologia degli adenomi e delle iperplasie surrenaliche secernenti aldosterone. In questo senso i dati molecolari e di immunoistochimica e i risultati dei test condotti in vivo nel pre e nel post operatorio del caso indice suggeriscono che durante la gravidanza la paziente possa essere stata esposta ad elevati livelli di GnRH1 di origine placentare in grado potenzialmente di attivare i recettori del GnRHR iperespressi. L'utilizzo del test al GnRH in pazienti con una storia clinica suggestiva (gravidanza, menopausa, ipogonadismo primitivo) potrebbe fornire dati utili per chiarire la patogenesi dell'iperaldosteronismo e per il successivo follow-up clinico.



## BIBLIOGRAFIA

1. Orth DN, Kovacs WJ The adrenal cortex . In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) *Williams' Textbook of Endocrinology* 1998. W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp517-664.
2. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 1988; 50:409-426.
3. Goodfriend TL, Gibbson GH, Dzau VJ et Al. Interaction of signals influencing renin release. *Annu Rev Physiol* 1984; 46:291-308.
4. HimatongKam T, Dluhy RG, Williams GH. Potassium-aldosterone renin interrelationships. *J Clin Endocrinol Metab* 1975 ; 41 :153-159.
5. Hollenberg NK, Chenitz WR, Adams DF, et al. Reciprocal influence of salt intake on adrenal glomerulosa and renal vascular response to angiotensin II in normal man. *J Clin Invest* 1974; 54:34-42.
6. Abayasekara DRE, Vazir H, Whitehouse BJ et al. Studies on the mechanisms of ACTH-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. *J Endocrinol* 1989; 122:625-632.
7. Lacroix A, N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome. *Endo Rev* 2001; 22:75-110.
8. Bird IM, Nicol M, Williams BC, Walker SW Vasopressin stimulates cortisol secretion and phosphoinositide catabolism in cultured bovine adrenal fasciculata/reticularis cells. *J Mol Endocrinol* 1990; 5:109-116.
9. Hinson JP, Vinson GP, Porter ID, Whitehouse BJ Oxytocin and arginine vasopressin stimulate steroid secretion by the isolated perfused rat adrenal gland. *Neuropeptides* 1987; 10:1-7.
10. Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, Boccara G, Derick S, Chouinard L, Gallo-Payet N. Vasopressin: a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res* 24:703-710.
11. Arnaldi G, Gasc JM, de Keyzer Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, Raux-Demay MC, Luton JP, Clauser E, Bertagna X. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2029-2035

12. Mazzocchi G, Gottardo G, Nussdorfer GG. Catecholamines stimulate steroid secretion of dispersed fowl adrenocortical cells, acting through the  $\beta$ -receptor subtype. *Horm Metab Res* 1997; 29:190–192
13. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 1998; 30:398–403
14. Hinson JP, Vinson GP, Pudney J, Whitehouse BJ. Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *J Endocrinol* 1989; 121:253–260
15. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin<sub>4</sub> receptor subtype. *Neuroscience* 1992;47:999–1007
16. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Legrand A, Kuhn JM, Vaudry H, Wolf LM. The serotonin-4 receptor agonist cisapride and angiotensin-II exert additive effects on aldosterone secretion in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:504–507
17. Mantero F, Opocher G, Boscraro M, Armanini D. Effect of serotonin on plasma aldosterone in man. *J Endocrinol Invest* 5:97-99.
18. Nussdorfer GG, Malendowicz LK. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* 1998; 19:1443–1467
19. Bornstein SR, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M. Cellular communication in the neuro-adrenocortical axis: role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Endocr Res* 1996; 22:819–829
20. Missale C, Memo M, Liberini P, Spano P. Dopamine selectively inhibits angiotensin II-induced aldosterone secretion by interacting with D-2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246:1137–1143.
21. Cherradi N, Brandenburger Y, Rossier MF, Vallotton MB, Stocco DM, Capponi AM. Atrial natriuretic peptide inhibits calcium-induced steroidogenic acute regulatory protein gene transcription in adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 1998;12:962–972.
22. Boscaro M, Scaroni C, Edwards CR, Mantero F. Inhibitory effect of somatostatin on the aldosterone response to angiotensin II: in vitro studies. *J Endocrinol Invest* 1982; 5:173-177.
23. Tait JF, Tait SA, Little B, Laumas KR. The disappearance of <sup>7</sup>-H<sub>3</sub>-d-aldosterone in the plasma of normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40:72-80.
24. Arizza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; 237:268-275.

25. Williams G et Al 2003 50th Anniversary of Aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6):2364-2377.
26. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hswih FY, Takeda R. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 1995; 25:170-173.
27. Brilla CG, Maisch B, Rupp H, Funck R, Zhou G, Weber KT. Pharmacological modulation of cardiac fibroblast function. *Herz* 1995; 20:127-134.
28. Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 970:89-100.
29. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri GB, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, , Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F, for the PAPY Study Investigators: A Prospective Study of The Prevalence of Primary Aldosteronism in 1125 Hypertensive Patients. *The Journal of The American College of Cardiology* 2006, 48:2293-2300.
30. Epstein M. Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction. *J R Soc Med* 2001; 94: 476-383.
31. Morioka M, Kobayashi T, Sone A, Furukawa Y, Tanaka H: Primary aldosteronism due to unilateral adrenal hyperplasia: report of two cases and review of the literature. *Endocr J* 2000, 47:443-449
32. Katayama Y, Takata N, Tamura T, Yamamoto A, Hirata F, Yasuda H, Matsukuma S, Daido Y, Sasano H: A case of primary aldosteronism due to unilateral adrenal hyperplasia. *Hypertens Res* 2005, 28:379-384.
33. Hirono Y, Doi M, Yoshimoto T, Kanno K, Himeno Y, Taki K, Sasano H, Hirata Y: A case with primary aldosteronism due to unilateral multiple adrenocortical micronodules. *Endocr J* 2005, 52:435-439.
34. Omura M, Sasano H, Fujiwara T, Yamaguchi K, Nishikawa T: Unique cases of unilateral hyperaldosteronemia due to multiple adrenocortical micronodules, which can only be detected by selective adrenal venous sampling. *Metabolism* 2002, 51:350-355.
35. McMahon GT, Dluhy RG. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Oct;48(5):682-6.
36. So A, Duffy DL, Gordon RD, Jeske YW, Lin-SU K, New MI, Stowasser M. Familial hyperaldosteronism type II is linked to the chromosome 7p22 region but also shows predicted heterogeneity. *J Hyperten* 2005; 23(8)1477-84.
37. Ganguly A. Primary aldosteronism. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1828-1834



38. Rich GM, Ulick S, Cook S et al. Glucocorticoid-remediable aldosteronism in a large kindred: clinical spectrum and diagnosis using a characteristics biochemical phenotype. *Ann Intern Med* 1992; 116(10): 813-820.
39. Gordon RD. Primary aldosteronism. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 495-511.
40. Giacchetti G, Ronconi V, Lucarelli G et al. Analysis of screening and confirmatory tests in the diagnosis of primary aldosteronism: need for a standardized protocol. *J Hypertens* 2006; 24(4): 737-745.
41. Mulatero P, Stowasser M, Loh KC et al. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1045-50.
42. Stowasser M, Gordon RD, Gunasekera TG, Cowley DC, Ward G, Archibald C, Smithers BM. High rate of detection of primary aldosteronism, including surgically treatable forms, following "non selective" screening of hypertensives attending a recently established Hypertension Unit. *J Hypertens* 2003; 21: 2149-57.
43. Gordon MS, Williams GH, Hollenberger NK. Renal and adrenal responsiveness to angiotensin II: influence of beta-adrenergic blockade. *Endocr Res* 1992; 18:115-121.
44. Schirpenbach C, Reincke M. Screening for primary aldosteronism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20(3), 369-384.
45. Mitnick PD et al. Effects of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin and oxaprozin, on the kidney. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28: 680-9
46. Goldhaber SZ, Hennekens CH, Spark RF, Evans DA, Rosner B, Taylor JO, Kass EH. Plasma renin substrate, renin activity, and aldosterone levels in a sample of oral contraceptive users from a community survey. *Am Heart J.* 1984 Jan;107(1):119-22.
47. Rossi GP, Belfiore A, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Montemurro D, Palumbo G, Rizzoni D, Rossi E, Semplicini A, Agabiti-Rosei E, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators. Prospective evaluation of the saline infusion test for excluding primary aldosteronism due to aldosterone-producing adenoma. *J Hypertens.* 2007 Jul;25(7):1433-42.
48. Stowasser M, Gordon RD Primary aldosteronism: careful investigation is essential and rewarding. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 33-39.
49. Mantero F, Fallo F, Opocher G, Armanini D, Boscaro M, Scaroni C Effect of angiotensin II and convertinase enzyme inhibitor (captopril) on blood pressure, plasma renin activity and aldosterone in primary aldosteronism. *Clin Sci (Lond)* 1981; 61 (Suppl 7):289s-293s.

50. Young WF, Jr. Primary aldosteronism: management issues. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 970:61-76.
51. Sohaib SA, Peppercorn PD, Allan C et al. Primary hyperaldosteronism (Conn syndrome): MR imaging findings. *Radiology* 2000; 214:527-531.
52. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:637-644.
53. Magill SB, Raff H, Shaker JL, Brickner RC, Knechtges TE, Kehoe ME, Findling JW. Comparison of Adrenal Vein Sampling and Computed Tomography in the Differentiation of Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:1066-1071.
54. Rossi GP, Sacchetto A, Chiesura-Corona M, De Toni R, Gallina M, Feltrin GP, Pessina AC. Identification of the etiology of primary aldosteronism with adrenal vein sampling in patients with equivocal computed tomography and magnetic resonance findings: results in 104 consecutive cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:1083-1090.
55. Young WF, Stanson AW, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, van Heerden JA. Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery* 2004; 136:1227-1235.
56. Mansoor GA, Malchoff CD, Arici MH, Karimedдини MK, Whalen GF. Unilateral adrenal hyperplasia causing primary aldosteronism: limitations of I-131 norcholesterol scanning. *Am J Hypertens* 2002; 15:459-464.
57. Sawka AM, Young WF, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, Leibson C, Van Heerden JA. Primary aldosteronism: factors associated with normalization of blood pressure after surgery. *Ann Intern Med* 135:258-261.
58. Meyer A, Brabant G, Behrend M. Long-term follow-up after adrenalectomy for primary aldosteronism. *World J Surg* 29:155-159.
59. Blumenfeld JD, Sealey JE, Schlussek Y, Vaughan Jr ED, Sos TA, Atlas SA, Muler FB, Acevedo R, Ulick S, Laragh JH. Diagnosis and treatment of primary aldosteronism. *Ann Intern Med* 1994; 121:877-885.
60. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser Young WF Jr, Montori VM; Endocrine Society. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3266-81.
61. Weinberg MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am J Hypertens* 15:709-716.

62. Schorr I, Ney RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenylyl cyclase. *J Clin Invest* 1971; 50:1295–1300.
63. Schorr I, Rathnam P, Saxena BB, Ney RL. Multiple specific hormone receptors in the adenylyl cyclase of an adrenocortical carcinoma. *J Biol Chem* 1971; 246:5806–5811.
64. Hingshaw HT, Ney RL. Abnormal control in the neoplastic adrenal cortex. In: McKerns KW (ed) *Hormones and Cancer*. Academic Press, New York (1974), pp 309–327.
65. Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, Yoshimi H, Hirata Y, Yokota M, Fujita T. Multiple hormone receptors in the adenylyl cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res* 1980; 40:3768–3771.
66. Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S, Fujita T. Presence of ectopic  $\beta$ -adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:953–957.
67. Katz MS, Kelly TM, Dax EM, Pineyro MA, Partilla JS, Gregerman RI. Ectopic  $\beta$ -adrenergic receptors coupled to adenylyl cyclase in human adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:900–909.
68. Saez JM, Tell GP, Dazard A. Human adrenocortical tumors: alterations in membrane-bound hormone receptors and cAMP protein kinases. In: Sharma RK, Criss WE (eds) *Endocrine Control in Neoplasia*. Raven Press, New York, 1978; pp 53–69.
69. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest* 1987; 10:530-533.
70. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, Mahoudeau J. Food dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* 1992; 327:981-986.
71. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayrad F, Taillefer R, Flanagan RJ, Hamet P. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion- A new cause of Cushing's syndrome. *N Eng J Med* 1992; 327:974-980.
72. Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A. Clinical and Subclinical ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hiperplasia and Aberrant Hormone Receptors. *Horm Res* 2005; 64:119-131.
73. Chabre O, Liakos P. Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M, Bottrai SP, Bachelot I, Chambaz EM, Defaye G, Feige JJ. Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3134-3143.

74. Longo-Mazzucco T, Chabre O, Feige JJ, Thomas M. Demonstration du potentiel transformant du gène du récepteur du GIP dans les cellules du cortex surrénalien : un pas vers l'étiologie du syndrome de Cushing lié à l'alimentation. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004 ; 65 :276.
75. Lampron A, Bourdeau I, Oble S, Godbout A, Schurch W, Arjane P, Hamet P, Lacroix A. Regulating of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for GIP in a patient with an aldosteronoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 1340.
76. Mune T, Murase H, Yamakita N, Fukuda T, Murayama M, Miura A, Suwa T, hanafusa J, Daido H, Morita M, Yasuda K. Eutopic overexpression of vasopressin V1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5706-5713.
77. Daido H, Morita H, Hanfusa J, Mune T, Murase H, Sato M, Shibata T, Suwa T, Ishizuka T, yasuda K. In vivo and in vitro effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:403-409.
78. Louiset E, Contesse V, Cartier d, Bertherat I, Dupare C, Barrande G, Groussin L, Vaudry H, Lefebvre H. Pharmacological profile and coupling mechanisms of illegitimate receptors in ACTH-independent macronodular hyperplasia causing Cushing's syndrome (abstract). 86th Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, 2004, p564.
79. Perraudin V, Delarue C, Lefebvre H, Do Rego J, Vaudry H, Kuhn JM. Evidence for a role of vasopressin in the Control of aldosterone secretion in primary aldosteronism: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1566-1572.
80. Suzuki S, Uccida D, Koide H et al. A possible association between aldosterone response to vasopressin and circadian change of aldosterone in the patients with aldosterone-producing adenoma. *Peptides* 2008; 29:2225-2231.
81. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn Jm. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 1998; 30:398-403.
82. Cartier D, Lihmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, Kuhn JM, Lacroix A, Tabarin a, Young J, vaudry H, Lefebvre H. Overexpression of serotonin4 receptors in cisparide-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:248-254.
83. Mannelli M, Ferruzzi P, Lucani P, Crescioli C, Buci I, Corona G, Serio M, Peri A. Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisparide: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4616-4622.

84. Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, Lihrmann I, Contesse V, Delarue C, Godin M, Fischmeister R, vaudry H, Kuhn J. Characterization of serotonin<sub>4</sub> receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1211-1216.
85. Cartier D, Jegou S, Parmentier F, Lihrmann I, Louiset E, Kuhn MJ, Bastard C, Plouin PF, Godin M, Vaudry H, Lefebvre H. Expression profile of serotonin 4 (5-HT<sub>4</sub>) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 939-947.
86. Millington DS, Golder MP, Cowley T, London D, Roberts H, Butt WR, Griffiths K. In vitro synthesis of steroids by a feminising adrenocortical carcinoma: effect of prolactin and other hormones. *Acta Endocrinol (kbh)* 1975; 82:561-571.
87. Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, Yoshimi H, Hirata Y, Yokota M, Fujita T. Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res* 1980;40:3768-3771.
88. Pabon JE, Li X, Lei ZM, Sanfilippo JS, Yussman MA, Rao CV. Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2397-2400.
89. Dall'Asta C, Ballare E, Mantovani G, Ambrosi B, Spada a, Barbetta L, Colombo P, Travaglino P, Ioli P, Beck-Peccoz P. Assessing the presence of abnormal regulation of cortisol secretion by membrane hormone receptors: *in vivo* and *in vitro* studies in patients with functioning and non-functioning adrenal adenoma. *Horm Metab Res* 2004; 36:578-583.
90. AbdallahMA, Lei ZM, Greenwold N, Nakajima ST, Jauniaux E, Rao CV. Human fetal nongonadla tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:952-956.
91. Feelders RA, Lamberts SWJ, Hofland LJ, Van Koestveld PM, Verhoef-Post M, Themmen APN, De Jong FH, Bonjer HJ, Clark AJ, Van Derlely AJ, Deherder WW. Luteinizing hormone (LH)-responsive Cushing's syndrome: the demontsraton of LH receptor messenger ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells. Which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:230-237.
92. Rainey WE, Rehamn KS, Carr BR. Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2004; 31:817-835.
93. Carlson HE Human adrenal cortex hyperfunction due to LH/hCG *Mol and Cell Endocrinol* 2007; 269:46-50.

94. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome. *N Eng J Med* 1999; 341:1577-1581.
95. Mazzucco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M. Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:196-203.
96. Saner-Amigh K, Mayhew BA, Mantero F, Schiavi F, White PC, Rao CV, Rainey WE. Elevated expression of luteinizing hormone receptor in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):1136-42.
97. Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, Rainey WE. G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol*. 2007 Oct;195(1):39-48.
98. Cheung L.W.T, Wong A.S.T Gonadotropin-releasing hormone : GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS Journal* 275 (2008) 5479-5495.
99. Kraus S, Naor Z, Seger R. Gonadotropin releasing hormone in apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Lett* 234, 109-12.
100. O.Zwermann, Y Suttman, M.Bidlingmaier, F Beusclein, M Reincke. Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *EJE* 2009.
101. Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3531-3536.
102. N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L, Lacroix A. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2616-2622.
103. Bourdeau I, Antonimi S, Lacroix A, Kirschner LS, Lorang D, Ributti SK, Stratakis CA. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several genes as molecular mediators. *Oncogene* 2004; 26:1575-1585.
104. Kero J, Potanen M, Zhang FP, Rahman N, McNicol AM, Nilson JH, Keri RA, Huhtaniemi IT. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J Clin Invest* 105:633-641.
105. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:200-208.
106. Bernichtein S, Alevizaki M, Huhtaniemi I. Is the adrenal cortex a target for gonadotropins? *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:231-238.

107. A.Horvath. Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 2006;66:11571-11575.
108. LS Kirschner et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney Complex. *Nat Genet* 2000; 26:89-92.
109. M.Alevizaki et al. The adrenal gland may be a target of LH action in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:875-881.
110. Schally AV, Comaru-Schally AM, Redding TW. Antitumor effects of analogs of hypothalamic hormones in endocrine-dependent cancers. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175:259-281.
111. La Rosa S, Celato N, Uccella S, Capella C. Detection of gonadotropin-releasing hormone receptor in normal human pituitary cells and pituitary adenomas using immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2000; 437:264-269.
112. Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 2005; 26:743-750.
113. Chien CH, Chen CH, Lee CY, Chang TC, Chen RJ, Chow SN. Detection of gonadotropin-releasing hormone receptor and its mRNA in primary human epithelial ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14:451-458.
114. Cheung LWT, Wong AST. Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS Journal* 2008; 275:5479-5495.
115. Arencibia JM, Schally AV. Luteinizing hormone-releasing hormone as an autocrine growth factor in ES-2 ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* 2000; 16:1009-1013.
116. Xing Y, Nakamura Y, Rainey EW. G Protein-coupled receptor expression in the adult fetal adrenal glands. *Mol and Cell Endocrinol* 2008 Nov 5.

