La metabolomica nella diagnosi delle patologie da ipersecrezione e dei tumori corticali surrenalici

Guido Di Dalmazi^{1,2}

Accettato: 26 gennaio 2021 / Pubblicato online: 14 settembre 2021
© The Author(s) 2021

Sommario La metabolomica ha permesso un notevole avanzamento nella comprensione della fisiopatologia delle ghiandole surrenaliche. L'applicazione della spettrometria di massa alla misurazione dei metaboliti ha portato all'identificazione di pannelli con enormi potenzialità in ambito diagnostico, come ad esempio nell'identificazione della patologia surrenalica espansiva maligna, nella predizione delle recidive e nella diagnosi di sottotipo dell'ipersecrezione glucocorticoide e mineralcorticoide.

Parole chiave Metabolomica · Steroidi · Spettrometria di massa · Tumori surrenalici · Ipercortisolismo · Iperaldosteronismo

Introduzione

La metabolomica, ossia lo studio dei processi metabolici mediante misurazione di metaboliti di piccole dimensioni (<1500 Da), è un campo in rapida espansione [1]. Si colloca al termine della cosiddetta cascata *-omica*, che include lo studio di processi biologici, quali meccanismi regolatori dei geni (genomica) e dei loro prodotti (trascrittomica e proteomica). Grazie alla capacità intrinseca di fornire un quadro di insieme di tutti i processi metabolici che avvengono

in un determinato campione biologico in un preciso istante, l'applicazione della metabolomica allo studio delle patologie surrenaliche ha permesso dei notevoli avanzamenti nella comprensione della fisiopatologia dei tumori e dell'ipersecrezione ormonale. In base all'approccio analitico, la metabolomica può essere classificata in *untargeted* (analisi di pannelli molto ampi, non mirati all'identificazione di metaboliti noti a priori) o *targeted*, ossia mirata allo studio di metaboliti specifici, noti e definiti a priori. Nell'ambito di quest'ultimo approccio, l'analisi dei profili steroidei (steroido-metabolomica) riveste un ruolo di primaria importanza per lo studio delle patologie surrenaliche.

In questa rassegna verranno presentate le principali applicazioni della metabolomica alla diagnosi dei tumori surrenalici, con particolare attenzione ai dati più recenti nella letteratura.

Brevi cenni sulle metodiche di analisi metabolomica

Le tecniche di metabolomica si avvalgono di misurazioni che richiedono una specificità elevata. In questo campo, la spettrometria di massa (MS) svolge un ruolo di rilievo assoluto. I parametri su cui si basa la MS sono il peso e la struttura delle molecole. I processi analitici basilari sono ionizzazione, separazione e rilevazione. Fra le principali metodiche di separazione cromatografica, particolarmente rilevanti per l'analisi degli steroidi per via della loro similarità strutturale, vi sono la gas-cromatografia (GC) e la cromatografia liquida (LC).

La GC-MS presenta un elevato potere di risoluzione e ha applicazioni in diversi ambiti (industria alimentare, tossicologia, medicina legale e farmacologia). Nella ricerca medica e, in particolare, nello studio delle patologie surrenaliche,

Proposto da Carla Scaroni.

Informazioni Supplementari La versione online contiene materiale supplementare disponibile su
<https://doi.org/10.1007/s40619-021-00957-7>.

✉ G. Di Dalmazi
guido.didalmazi@unibo.it

¹ UOC di Endocrinologia e Prevenzione e Cura del Diabete, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Bologna, Italia

² Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna, Bologna, Italia

la GC-MS è stata applicata alla metabolomica *untargeted* e alla steroido-metabolomica su urine delle 24 ore. Tuttavia, l'alta risoluzione della GC-MS si accompagna a una laboriosa preparazione del campione, che rende questa metodica poco applicabile alla pratica routinaria.

La LC-MS è invece di più rapida esecuzione e ad alto volume di produzione, sebbene con una capacità di risoluzione inferiore alla GC-MS. Questa tecnica è maggiormente utile per piccoli pannelli, fino a 20 metaboliti, ed è trasferibile in pratica clinica. Nello studio delle patologie surrenaliche, la LC-MS è stata largamente utilizzata per l'analisi dei profili steroidei. A tale scopo vengono tipicamente utilizzati uno spettrometro di massa tandem (MS/MS) costituito da due quadrupoli a trasmissione ionica posizionati su una cella di collisione. Il primo quadrupolo seleziona uno specifico ione rappresentativo del metabolita, che viene frazionato nella cella di collisione in ioni specifici, ulteriormente selezionati dal secondo quadrupolo, che incrementa la sensibilità della metodica, e trasmessi al rivelatore.

In entrambe le metodiche viene, infine, generato un cromatogramma, dove l'area del picco è proporzionale alla concentrazione del metabolita, la cui quantificazione avviene mediante confronto con materiale di riferimento.

Metabolomica *untargeted*

Vi sono pochi studi sulla metabolomica *untargeted* nelle patologie surrenaliche, a causa di elevati costi, tempo e complessità delle analisi. Questi studi sono principalmente focalizzati sulla distinzione della patologia surrenalica maligna da quella benigna. In un elegante studio del 2013 su 66 tessuti surrenalici, i profili di metabolomica *untargeted* mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare hanno differenziato i tessuti tumorali da quelli normali di medesima derivazione embriologica. Inoltre, i carcinomi surrenalici mostravano un profilo specifico caratterizzato da biomarcatori di processi anaerobici, attività glicolitica e metabolismo degli aminoacidi, nettamente distinto dai tumori benigni e dai tessuti normali. Nonostante la precisione diagnostica di questo approccio, l'accuratezza nel distinguere la malattia metastatica da quella non metastatica non è risultata soddisfacente [2]. Recentemente, l'utilizzo di profili metabolomici su un singolo campione di urine delle 24 ore ha mostrato un'accuratezza dell'84% nel classificare correttamente i carcinomi surrenalici, con un'area sotto la curva (AUC) di 0,93. Tra i 46 metaboliti più significativi, la creatina riboside (elevato anche in tumori del polmone) e 4 metaboliti non identificati hanno mostrato una buona accuratezza diagnostica anche in un set indipendente di validazione. La combinazione di livelli di creatina riboside e dimensione della massa surrenalica ha mostrato sensibilità dell'80%, specificità del 96%, valore predittivo negativo

(VPN) del 98%, ma con un valore predittivo positivo (VPP) insoddisfacente (57%) [3].

Metabolomica *targeted*

Metabolismo intermedio

Recentemente, i profili metabolomici di pazienti con ipercortisolismo sono stati analizzati con LC-MS/MS. La misurazione di un pannello di 180 metaboliti plasmatici (aminoacidi, amine biogeniche, acilcarnitine e lipidi) ha permesso una corretta classificazione dei 149 soggetti nei 4 gruppi in studio (controlli, incidentalomi surrenalici non secernenti, ipercortisolismo subclinico e sindrome di Cushing) con sensibilità, specificità, VPP e VPN maggiori di 80%. Inoltre, sono stati evidenziati 4 distinti profili metabolomici in base alla presenza o meno di ipercortisolismo e diabete. L'analisi dei singoli metaboliti ha identificato alterazioni del metabolismo proteico (riduzione di aminoacidi a catena ramificata, istidina, triptofano e kinurenina, e incremento delle poliamine) e glucidico (riduzione di carnitina e acetil-carnitina e incremento di acilcarnitine a lunga catena), compatibili con inflessibilità metabolica [4].

Profili steroidei

I dati principali degli studi di steroido-metabolomica sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2.

Carcinoma surrenalico

Uno dei primi studi che ha mostrato la rilevanza clinica dei profili steroidei nella diagnosi di carcinoma surrenalico è stato pubblicato nel 2011 e riportava i risultati di un lavoro collaborativo dello *European Network for the Study of Adrenal Tumors* (ENSAT). L'analisi di un largo pannello di steroidi, eseguita mediante GC-MS su urine delle 24 ore di 147 pazienti, ha permesso di identificare un profilo secretorio specifico del carcinoma surrenalico e un pannello di 9 steroidi selezionati, che avevano un'accuratezza diagnostica soddisfacente nell'identificare i carcinomi surrenalici [5]. I precursori glucocorticoidi, come il tetraidro-11-desossicortisolo (THS), metabolita urinario dell'11-desossicortisolo, e degli ormoni sessuali, come il pregnanediolo (5-PD) e il pregnanetriolo (5-PT), principali metaboliti urinari del progesterone e del 17-idrossiprogesterone, rispettivamente, erano fra i principali metaboliti discriminanti [5]. Tali dati sono stati confermati in tre studi indipendenti, che hanno utilizzato la GC-MS e la LC-MS/MS per l'analisi del profilo steroideo su urine delle 24 ore. Il primo, su 152 pazienti, ha evidenziato il potenziale ruolo diagnostico di THS, 5-PD e 5-PT fra i 7 metaboliti

Tabella 1 Studi che hanno analizzato le potenzialità della steroido-metabolomica nella diagnosi di carcinoma surrenalico. *GC-MS*, gas cromatografia associata alla spettrometria di massa; *AUC*, area sotto la curva; *HRAM LC-MS*, cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione e precisione della massa; *LC-MS/MS*, cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem

Riferimento	Tipo di studio	Metodica utilizzata	Matrice biologica	Popolazione	Obiettivo	Principali risultati
Arlt W et al [5]	Cross-sectional	GC-MS	Urine delle 24 ore	147 (45 carcinomi surrenalici, 102 adenomi surrenalici)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs adenoma surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - Identificato il profilo secretorio caratteristico del carcinoma surrenalico - I 9 steroidi più significativi hanno mostrato sensibilità e specificità di 88% (AUC 0,96) nell'identificare il carcinoma surrenalico - I precursori glucocorticoidi (tetraidro-11-desossicortisolo, THS) e degli ormoni sessuali (pregnanediolo, 5-PD, e pregnanetriolo, 5-PT) erano fra i principali metaboliti discriminanti - THS, 5-PD e 5-PT erano fra i 7 metaboliti più significativi nel discriminare i carcinomi surrenalici dagli altri tipi di tumore surrenalico - Cut-off di THS a 2,35 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ha mostrato sensibilità del 100% e specificità del 99% - Incremento di deidroepiandrosterone (DHEA) e THS nei carcinomi surrenalici - Il pannello di steroidi selezionati, includenti DHEA, THS e alcuni rapporti substrato/prodotto hanno mostrato 100% di sensibilità e specificità nell'identificare il carcinoma surrenalico - Identificati quattro profili secretori di carcinoma surrenalico (+/- secrezione glucocorticoide/mineralcorticoide) - Descritto pannello specifico del carcinoma surrenalico, che includeva THS, DHEA e 5-PD oltre ad altri steroidi
Kerkhofs TM et al [6]	Cross-sectional	GC-MS	Urine delle 24 ore	152 (27 carcinomi surrenalici, 107 adenomi surrenalici, 18 altri tumori surrenalici)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs altri tipi di tumore surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - THS, 5-PD e 5-PT erano fra i 7 metaboliti più significativi nel discriminare i carcinomi surrenalici dagli altri tipi di tumore surrenalico - Cut-off di THS a 2,35 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ha mostrato sensibilità del 100% e specificità del 99% - Incremento di deidroepiandrosterone (DHEA) e THS nei carcinomi surrenalici - Il pannello di steroidi selezionati, includenti DHEA, THS e alcuni rapporti substrato/prodotto hanno mostrato 100% di sensibilità e specificità nell'identificare il carcinoma surrenalico - Identificati quattro profili secretori di carcinoma surrenalico (+/- secrezione glucocorticoide/mineralcorticoide) - Descritto pannello specifico del carcinoma surrenalico, che includeva THS, DHEA e 5-PD oltre ad altri steroidi
Velikanova LI et al [7]	Cross-sectional	GC-MS	Urine delle 24 ore	139 (carcinomi associati (n = 13) o non associati (n = 18) a Cushing, adenomi associati (n = 44) o non associati (n = 52) a Cushing)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs adenoma surrenalico + profili differenziali per secrezione	<ul style="list-style-type: none"> - THS, 5-PD e 5-PT erano fra i 7 metaboliti più significativi nel discriminare i carcinomi surrenalici dagli altri tipi di tumore surrenalico - Cut-off di THS a 2,35 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ha mostrato sensibilità del 100% e specificità del 99% - Incremento di deidroepiandrosterone (DHEA) e THS nei carcinomi surrenalici - Il pannello di steroidi selezionati, includenti DHEA, THS e alcuni rapporti substrato/prodotto hanno mostrato 100% di sensibilità e specificità nell'identificare il carcinoma surrenalico - Identificati quattro profili secretori di carcinoma surrenalico (+/- secrezione glucocorticoide/mineralcorticoide) - Descritto pannello specifico del carcinoma surrenalico, che includeva THS, DHEA e 5-PD oltre ad altri steroidi
Hines JM et al [8]	Cross-sectional	HRAM LC-MS	Urine delle 24 ore	185 (114 volontari, 71 pazienti, di cui 4 con Cushing ACTH-dipendente, 1 con iperplasia surrenalica congenita, 5 carcinomi surrenalici, 4 Cushing da adenoma surrenalico e 57 con adenomi non secernenti)	Valutazione profilo steroideo in carcinoma surrenalico vs adenoma surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - THS, 5-PD e 5-PT erano fra i 7 metaboliti più significativi nel discriminare i carcinomi surrenalici dagli altri tipi di tumore surrenalico - Cut-off di THS a 2,35 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ha mostrato sensibilità del 100% e specificità del 99% - Incremento di deidroepiandrosterone (DHEA) e THS nei carcinomi surrenalici - Il pannello di steroidi selezionati, includenti DHEA, THS e alcuni rapporti substrato/prodotto hanno mostrato 100% di sensibilità e specificità nell'identificare il carcinoma surrenalico - Identificati quattro profili secretori di carcinoma surrenalico (+/- secrezione glucocorticoide/mineralcorticoide) - Descritto pannello specifico del carcinoma surrenalico, che includeva THS, DHEA e 5-PD oltre ad altri steroidi

Tabella 1 (Continued)

Riferimento	Tipo di studio	Metodica utilizzata	Matrice biologica	Popolazione	Obiettivo	Principali risultati
Bancos I et al [9]	Prospettico	LC-MS/MS	Urine delle 24 ore	2017 (98 carcinomi surrenalici, 1919 adenomi surrenalici)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs adenoma surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - Identificato un algoritmo predittivo che combina alterazioni di 15 steroidi urinari, dimensione del tumore > 4 cm e densità pre-contrastografica della lesione surrenalica alla TAC addome > 20 HU che mostrava valore predittivo positivo di carcinoma surrenalico del 76% - Descritte simili alterazioni del profilo steroideo alla diagnosi e alla recidiva
Chortis V et al [10]	Prospettico	GC-MS	Urine delle 24 ore	32 carcinomi surrenalici con resezione R0	Identificazione della recidiva/metastasi di carcinoma surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - Descritto incremento significativo degli steroidi (mediana di 6) nei carcinomi surrenalici - 11-desossicortisolo (11-DF) e il 17-idrossi-pregnenolone (17ΔP) hanno mostrato la maggiore accuratezza diagnostica nell'identificare il carcinoma surrenalico
Taylor DR et al [11]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Siero	48 (10 carcinomi surrenalici, 23 adenomi surrenalici, 15 feocromocitomi/paragangliomi)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs altri tipi di tumore surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - Identificati profili steroidi sesso-specifici con valore predittivo positivo del 92% negli uomini e del 96% nelle donne nell'identificare il carcinoma surrenalico
Schweitzer S et al [12]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma	108 (42 carcinomi surrenalici, 66 adenomi surrenalici)	Diagnosi differenziale carcinoma surrenalico vs adenoma surrenalico	<ul style="list-style-type: none"> - Identificati profili steroidi sesso-specifici con valore predittivo positivo del 92% negli uomini e del 96% nelle donne nell'identificare il carcinoma surrenalico

Tabella 2 Studi che hanno analizzato le potenzialità della steroido-metabolomica nella diagnosi di sottotipo nelle patologie da ipersecrezione surrenalica corticale. *HRAM LC-MS*, cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione e precisione della massa; *LC-MS/MS*, cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem; *AVS*, cateeterismo delle vene surrenaliche; *GC-MS*, gas cromatografia associata alla spettrometria di massa

Riferimento	Tipo di studio	Metodica utilizzata	Matrice biologica	Popolazione	Obiettivo	Principali risultati
<i>Ipercortisolismo</i>						
Hines JM et al [8]	Cross-sectional	HRAM LC-MS	Urine delle 24 ore	8 (4 ACTH-dipendente + 4 ACTH-indipendente)	Valutazione profilo steroideo nei sottotipi di Cushing	- Identificato profilo steroideo dei sottotipi di Cushing, con incremento dei precursori degli androgeni nella forma ACTH-dipendente
Eisenhofer G et al [13]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma	222 (138 Cushing escluso, 51 Cushing ACTH-dipendente, 12 Cushing ectopico, 21 Cushing ACTH-indipendente)	Diagnosi differenziale Cushing ACTH-dipendente (ipofisario + ectopico) vs ACTH-indipendente	- La selezione dei 10 steroidi più significativi ha permesso di classificare correttamente il 91% dei pazienti nei vari sottogruppi - Il potere diagnostico aumentava al 95% con l'aggiunta del cortisolo dopo test al desametasone
Di Dalmazi G et al [14]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Siero	282 (188 controlli, 66 adenomi non secernenti, 28 adenomi surrenalici associati a secrezione autonoma di cortisolo)	Valutazione del profilo steroideo negli adenomi surrenalici in accordo al profilo secretorio	- Riduzione di deidroepiandrosterone (DHEA) e androstenedione in adenomi con secrezione autonoma di cortisolo - Sensibilità e specificità nell'identificare la secrezione autonoma di cortisolo di DHEA 71 e 76%, rispettivamente, e di androstenedione 69 e 61%, rispettivamente
Di Dalmazi G et al [15]	Retrospettivo	LC-MS/MS	Siero	302 (secrezione autonoma di cortisolo associata ad adenoma (n = 46) e iperplasia (n = 52) surrenalici, adenomi (n = 120) e iperplasia (n = 84) surrenalici non secernenti)	Valutazione del profilo steroideo prima e dopo test al desametasone 1 mg negli adenomi e iperplasia surrenalici in accordo al profilo secretorio; correlazione con aspetti cardiovascolari	- Descritto diverso profilo steroideo in base alla presenza/assenza di ipercortisolismo subclinico e alla massa surrenalica mono/bilaterale - Il profilo steroideo dopo test di soppressione con desametasone 1 mg ha mostrato ridotta soppressione di cortisolo, 11-DF e corticosterone nella secrezione autonoma di cortisolo - Cortisolo e corticosterone risultavano fattori predittivi indipendenti di peggioramento dell'ipertensione e di eventi cardiovascolari
Masjukur J et al [16]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma	429 (277 controlli, 152 escluso Cushing, 21 Cushing da adenoma surrenalico, 35 adenomi surrenalici associati a secrezione autonoma di cortisolo)	Diagnosi di secrezione autonoma di cortisolo mediante profilo steroideo	- Rialzo di 11-DF e corticosterone, riduzione di DHEA e DHEA-solfato in ipercortisolismo - Accuratezza diagnostica del pannello steroideo nell'identificare i sottotipi di ipercortisolismo simile a quella del test di soppressione con desametasone (tasso di classificazione corretta dei pazienti >95%)

Tabella 2 (Continued)

Riferimento	Tipo di studio	Metodica utilizzata	Matrice biologica	Popolazione	Obiettivo	Principali risultati
<i>Iperaldosteronismo primitivo</i>						
Eisenhofer G et al [17]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma periferico, plasma derivato da AVS	216 (126 monolaterali, 90 bilaterali)	Diagnosi di sottotipo di iperaldosteronismo primitivo	<ul style="list-style-type: none"> - Profilo plasmatico periferico differente fra iperaldosteronismo monolaterale e bilaterale - Il pannello steroideo periferico ha mostrato una corretta classificazione dei pazienti in base all'outcome clinico (cura, fallimento o miglioramento dopo surrenectomia) in 80% dei pazienti - L'analisi discriminante lineare combinata con l'analisi dell'albero decisionale su steroidi selezionati dal pannello iniziale ha correttamente predetto l'istotipo (adenoma singolo, iperplasia, gruppi di cellule secernenti aldosterone) in >90% dei casi
Meyer LS et al [18]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma	95 unilaterali (successo biochimico dopo surrenectomia assente o parziale (n = 43) e completo (n = 52)), 27 bilaterali	Valutazione dei profili steroidei in base ad outcome e caratteristiche istopatologiche	<ul style="list-style-type: none"> - Profilo steroideo unitamente a TC addome e AVS (solo nei casi di discordanza fra le prime due metodiche) dà accuratezza diagnostica del 92%
Yang Y et al [19]	Cross-sectional	LC-MS/MS	Plasma	197 (33 microadenomi, 95 macroadenomi, 69 forme bilaterali)	Differenziazione fra microadenomi, macroadenomi e forme bilaterali	<ul style="list-style-type: none"> - Il pannello steroideo ha mostrato co-secrezione di metaboliti glucocorticoidi nel 29% dei pazienti con iperaldosteronismo primitivo
Arlt W et al [20]	Cross-sectional	GC-MS	Urine delle 24 ore	174 con iperaldosteronismo primitivo (103 monolaterali, 71 bilaterali), 56 adenomi surrenalici non secernenti, 104 adenomi surrenalici con secrezione autonoma di cortisolo, 74 Cushing da adenoma surrenalico, 162 controlli	Descrizione del profilo steroideo nei diversi tumori surrenalici	<ul style="list-style-type: none"> - La co-secrezione glucocorticoide nell'iperaldosteronismo primitivo si associava all'ipertrofia concentrica cardiaca, indipendentemente dai livelli di metaboliti mineralcorticoidi nell'iperaldosteronismo
Adolf C et al [21]	Retrospectivo	GC-MS	Urine delle 24 ore	73 (45 monolaterali, 28 bilaterali)	Valutazione dell'impatto della co-secrezione dei glucocorticoidi nell'iperaldosteronismo	<ul style="list-style-type: none"> - La co-secrezione glucocorticoide nell'iperaldosteronismo primitivo si associava all'ipertrofia concentrica cardiaca, indipendentemente dai livelli di metaboliti mineralcorticoidi nell'iperaldosteronismo

più significativi nel distinguere i carcinomi surrenalici dagli altri tipi di tumore surrenalico, con una sensibilità del 100% [6]. Il secondo, oltre a confermare la potenzialità diagnostica del profilo steroideo urinario nel differenziare il carcinoma dall'adenoma surrenalico, ha mostrato l'esistenza di 4 diversi profili secretori di carcinoma surrenalico, in base alla presenza o meno di secrezione glucocorticoide e mineralcorticoide [7]. Il terzo studio ha sia confermato le potenzialità diagnostiche del profilo steroideo, sia rimarcato il ruolo primario del rialzo di THS e dei metaboliti dei precursori androgenici nell'identificazione del carcinoma surrenalico [8]. Recentemente, i dati sul profilo steroideo urinario sono stati validati prospetticamente mediante LC-MS/MS in uno studio ENSAT, che ha incluso 2017 pazienti con tumori surrenalici, di cui 98 con carcinoma surrenalico. L'analisi del profilo steroideo urinario, ristretta ai 15 metaboliti più significativi secondo il primo studio del 2011, è stata eseguita mediante LC-MS/MS. I risultati dello studio hanno messo in evidenza che la combinazione di alterazioni del pannello di 15 steroidi urinari indicativi di alto rischio di malignità e di dati radiologici (dimensione del tumore >4 cm e densità pre-contrastografica della lesione surrenalica alla TAC addome >20 HU) avevano un valore predittivo positivo di carcinoma surrenalico del 76% [9].

I dati sul potenziale diagnostico del profilo steroideo urinario sono stati estesi in un recente studio pilota, che ha analizzato l'utilità della steroidomica nell'identificare le recidive di carcinoma surrenalico, per superare le attuali limitazioni delle tecniche di imaging. Il profilo steroideo è stato eseguito su urine delle 24 ore raccolte a cadenza trimestrale in pazienti con carcinoma surrenalico con resezione R0, con follow-up mediano di 32 mesi. Nei 13/32 pazienti con recidiva, le stesse alterazioni dei metaboliti steroidei rilevate nel preoperatorio sono state identificate alla comparsa della recidiva. Tuttavia, la sensibilità nell'identificare la recidiva è risultata insoddisfacente (56%) [10].

L'utilizzo dei profili steroidei nella diagnosi di carcinoma surrenalico è stato anche esteso ai derivati ematici (plasma e siero), mediante LC-MS/MS. Il primo studio ha analizzato un pannello di 13 steroidi sierici di 10 pazienti con carcinoma surrenalico e 38 pazienti con lesioni surrenaliche non carcinomatose, evidenziando un rialzo significativo degli steroidi (mediana di 6) nel primo gruppo. L'11-desossicortisolo e il 17-idrossi-pregnenolone risultavano fra gli steroidi con maggiore accuratezza diagnostica, in linea con i risultati degli studi eseguiti sulle urine delle 24 ore [11]. Uno studio indipendente più recente, che ha analizzato un pannello di 15 steroidi plasmatici in 42 pazienti con carcinoma surrenalico e 66 con adenoma surrenalico, ha mostrato l'esistenza di profili steroidei sesso-specifici, composti da 6 steroidi ognuno, che distinguevano il carcinoma dall'adenoma surrenalico con un valore predittivo positivo del 92% negli uomini e del 96% nelle donne [12].

Tumori surrenalici associati a ipercortisolismo

Negli ultimi anni sono emersi studi che hanno valutato la potenzialità del profilo steroideo nell'eseguire la diagnosi di sottotipo nella sindrome di Cushing. Lo studio di Hines e collaboratori menzionato in precedenza ha mostrato dati pilota su 8 pazienti con sindrome di Cushing, sottolineando che il profilo secretorio steroideo su urine delle 24 ore si caratterizzava per la differente secrezione di metaboliti dei precursori androgenici, che risultavano elevati nel sottotipo ACTH-dipendente e ridotti in quello ACTH-indipendente [8]. In un successivo studio indipendente, mirato specificamente a questa analisi e su una casistica più ampia ($n = 21$ sindrome di Cushing di origine surrenalica, $n = 51$ di origine ipofisaria e 12 ectopici), è stato invece analizzato un pannello di 15 steroidi plasmatici per eseguire la diagnosi di sottotipo. Lo studio ha confermato la presenza di diversi profili secretori dei precursori androgenici, ma ha anche rilevato un ruolo nei livelli di aldosterone e 18-oxo-cortisolo (uno steroide ibrido di derivazione dal 11-desossicortisolo) nel distinguere i 3 sottotipi di sindrome di Cushing. Inoltre, selezionando i 10 steroidi più significativi, il solo profilo steroideo plasmatico è stato in grado di classificare correttamente il 91% della popolazione in studio; l'aggiunta dei valori di cortisolo dopo test al desametasone ha aumentato il potere diagnostico al 95% [13].

Lo studio del profilo steroideo circolante è stato esteso anche alle forme di ipercortisolismo subclinico. L'analisi di un pannello di 10 steroidi sierici eseguita su 94 pazienti con incidentaloma surrenalico e 188 controlli ha mostrato una riduzione, indipendente dall'età, di androgeni e precursori, principalmente deidroepiandrosterone (DHEA) e androstenedione, in adenomi con ipercortisolismo subclinico vs adenomi non secernenti. DHEA e androstenedione, singolarmente, hanno mostrato una sensibilità di 71 e 69%, rispettivamente, e una specificità di 76 e 61%, rispettivamente, nell'identificare l'ipercortisolismo subclinico [14]. Tali risultati sono stati ampliati in un successivo studio, in cui il pannello di steroidi sierici è stato analizzato su 302 pazienti con incidentaloma surrenalico, mettendo in evidenza un diverso profilo steroideo in base alla presenza/assenza di ipercortisolismo subclinico e alla massa surrenalica mono/bilaterale. Inoltre, i profili steroidei misurati dopo test di soppressione con desametasone 1 mg hanno mostrato, nei pazienti con ipercortisolismo subclinico, una ridotta soppressione non solo di cortisolo, ma anche di 11-desossicortisolo e corticosterone. Infine, i livelli di cortisolo e corticosterone si sono dimostrati fattori predittivi indipendenti di peggioramento dell'ipertensione e di eventi cardiovascolari [15]. Un ulteriore studio indipendente su 208 pazienti ha mostrato risultati in linea con i precedenti, confermando il rialzo di 11-desossicortisolo e corticosterone, e bassi livelli di DHEA e DHEAs nel plasma di pazienti con

ipercortisolismo sia subclinico sia conclamato, se confrontati con soggetti di controllo. Il pannello di soli 14 steroidi ha mostrato un'accuratezza diagnostica simile a quella del test di soppressione con desametasone, con AUC di 0,96 e 0,94, rispettivamente e un tasso di classificazione corretta dei pazienti >95% (97% nel caso di ipercortisolismo subclinico) [16].

Tumori surrenalici associati a iperaldosteronismo

Dopo i primi studi pionieristici degli anni '80 che hanno mostrato un rialzo di steroidi ibridi in alcune forme di iperaldosteronismo, il ruolo di 18-oxo-cortisolo (18-oxo-F) e 18-idrossi-cortisolo (18-OH-F), prodotti dall'aldosterone sintasi a partire dall'11-desossicortisolo e sotto prevalente controllo dell'ACTH, è diventato di crescente interesse. In uno studio del 2016 è stato valutato un pannello di 15 steroidi plasmatici che includeva anche gli steroidi ibridi, misurati da sangue periferico e da cateterismo delle vene surrenali (AVS) mediante LC-MS/MS, in 216 pazienti con iperaldosteronismo primitivo. Il profilo plasmatico periferico è risultato differente fra iperaldosteronismo monolaterale e bilaterale, con un rialzo del 18-oxo-F nel primo. Sebbene questo steroide, singolarmente, non abbia mostrato soddisfacente specificità e sensibilità nel distinguere le forme mono da quelle bilaterali, il potere diagnostico cresceva in maniera significativa considerando il pannello di steroidi nel suo insieme (AUC = 0,89). L'utilizzo dei 15 steroidi plasmatici periferici ha anche permesso una corretta classificazione dei pazienti in base all'esito della surrenectomia (cura, miglioramento o fallimento) in 172/216 pazienti (80%) [17]. Questi risultati sono stati estesi in uno studio che ha analizzato i profili steroidei plasmatici periferici in differenti istotipi di iperaldosteronismo primitivo (adenoma singolo, iperplasia e gruppi di cellule secernenti aldosterone – *aldosterone producing cell clusters*, APCC). Sebbene non fossero state rilevate differenze significative nelle concentrazioni di steroidi circolanti fra le tre condizioni istopatologiche, l'analisi discriminante lineare combinata con l'analisi dell'albero decisionale su steroidi selezionati ha permesso di eseguire una corretta predizione dell'istotipo in più del 90% dei casi [18].

Un ulteriore studio ha analizzato il profilo steroideo periferico in 197 pazienti con iperaldosteronismo primitivo, mostrando, nella maggior parte dei casi, risultati concordanti con la TAC nel classificare correttamente i pazienti affetti da malattia monolaterale da micro- e macro-adenoma (< e >10 mm di diametro, rispettivamente), e da malattia bilaterale. La classificazione ottenuta mediante la combinazione del profilo steroideo e della TAC addome ha mostrato risultati concordanti, anche in termini di *outcome* clinico e biochimico, con quelli ottenuti mediante AVS in 163/197 casi (83%). Pertanto, in accordo a questo studio, l'algoritmo decisionale dei pazienti con iperaldosteronismo primitivo potrebbe essere implementato dalla combinazione del pannello

di steroidi e della TAC addome, che permetterebbe di ridurre il numero di AVS a una piccola percentuale di pazienti [19]. L'applicazione della misurazione del pannello steroideo in GC-MS su urine delle 24 ore in pazienti con iperaldosteronismo primitivo ha permesso di identificare la presenza di co-secrezione di metaboliti glucocorticoidi in una percentuale non trascurabile di pazienti (29%) [20]. In uno studio indipendente, la co-secrezione glucocorticoide nell'iperaldosteronismo primitivo, identificata mediante medesima metodica utilizzata nel precedente studio, si associava alla presenza di ipertrofia cardiaca concentrica, indipendentemente dai livelli di mineralcorticoidi [21].

Direzioni future

Le tecniche di metabolomica hanno permesso di approfondire la fisiopatologia dei tumori surrenalici e di pianificare strategie diagnostiche che saranno di comune uso nella pratica clinica nel corso dei prossimi anni. La visione futura offerta dalla metabolomica prevede una semplificazione diagnostica delle patologie da ipersecrezione ormonale e una più accurata identificazione delle lesioni maligne surrenali, all'esordio e alla recidiva. Inoltre, in un'ottica di valutazione multi-analitica, la combinazione di metabolomica e di altre tecniche di *-omica* potrà fornire nozioni di fisiopatologia dei tumori surrenalici finora inesplorate, in cui elementi di anatomia patologica, biochimica molecolare e fisiologia vengono combinati insieme sotto l'egida, ineludibile, del supporto informatico.

Questo avanzamento, tuttavia, avviene a un costo economico non indifferente, in termini di macchinari, personale e intelligenza artificiale, che limita la diffusione di queste metodiche a pochi centri specializzati. Infine, il miglioramento tecnologico richiede una crescente familiarità con algoritmi predittivi e modelli matematici, che dovranno essere integrati necessariamente alla raffinatezza della valutazione clinica, che rimane, comunque, una prerogativa centrale dell'endocrinologo.

Funding Note Open access funding provided by Alma Mater Studiorum - Università di Bologna within the CRUI-CARE Agreement.

Conflitto di interesse L'autore Guido Di Dalmazi dichiara di non avere conflitti di interesse.

Consenso informato Lo studio presentato in questo articolo non ha richiesto sperimentazione umana.

Studi sugli animali L'autore di questo studio non ha eseguito studi sugli animali.

Nota della casa editrice Springer Nature rimane neutrale in riguardo alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Bibliografia

- Adamski J, Suhre K (2013) Metabolomics platforms for genome wide association studies—linking the genome to the metabolome. *Curr Opin Biotechnol* 24:39–47
- Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM et al (2013) Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions. *Endocr-Relat Cancer* 20:705–716
- Patel D, Thompson MD, Manna SK et al (2017) Unique and novel urinary metabolomic features in malignant versus benign adrenal neoplasms. *Clin Cancer Res* 23:5302–5310
- Di Dalmazi G, Quinkler M, Deutschbein T et al (2017) Cortisol-related metabolic alterations assessed by mass spectrometry assay in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 177:227–237
- Arlt W, Biehl M, Taylor AE et al (2011) Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3775–3784
- Kerkhofs TM, Kerstens MN, Kema IP et al (2015) Diagnostic value of urinary steroid profiling in the evaluation of adrenal tumors. *Horm Cancer* 6:168–175
- Velikanova LI, Shafigullina ZR, Lisitsin AA et al (2016) Different types of urinary steroid profiling obtained by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer* 7:327–335
- Hines JM, Bancos I, Bancos C et al (2017) High-Resolution, Accurate-Mass (HRAM) mass spectrometry urine steroid profiling in the diagnosis of adrenal disorders. *Clin Chem* 63:1824–1835
- Bancos I, Taylor AE, Chortis V et al (2020) Urine steroid metabolomics for the differential diagnosis of adrenal incidentalomas in the EURINE-ACT study: a prospective test validation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8:773–781
- Chortis V, Bancos I, Nijman T et al (2020) Urine steroid metabolomics as a novel tool for detection of recurrent adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 105:e307–e318
- Taylor DR, Ghataore L, Couchman L et al (2017) A 13-steroid serum panel based on LC-MS/MS: use in detection of adrenocortical carcinoma. *Clin Chem* 63:1836–1846
- Schweitzer S, Kunz M, Kurlbaum M et al (2019) Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 180:117–125
- Eisenhofer G, Masjkur J, Peitzsch M et al (2018) Plasma steroid metabolome profiling for diagnosis and subtyping patients with Cushing syndrome. *Clin Chem* 64:586–596
- Di Dalmazi G, Fanelli F, Mezzullo M et al (2015) Steroid profiling by LC-MS/MS in nonsecreting and subclinical cortisol-secreting adrenocortical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 100:3529–3538
- Di Dalmazi G, Fanelli F, Zavatta G et al (2020) The steroid profile of adrenal incidentalomas: subtyping subjects with high cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 104:5519–5528
- Masjkur J, Gruber M, Peitzsch M et al (2019) Plasma steroid profiles in subclinical compared with overt adrenal Cushing syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 104:4331–4340
- Eisenhofer G, Dekkers T, Peitzsch M et al (2016) Mass spectrometry-based adrenal and peripheral venous steroid profiling for subtyping primary aldosteronism. *Clin Chem* 62:514–524
- Meyer LS, Wang X, Sušnik E et al (2018) Immunohistopathology and steroid profiles associated with biochemical outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism. *Hypertension* 72:650–657
- Yang Y, Burrello J, Burrello A et al (2019) Classification of microadenomas in patients with primary aldosteronism by steroid profiling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 189:274–282
- Arlt W, Lang K, Sitch AJ et al (2017) Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism. *JCI Insight* 2:e93136
- Adolf C, Köhler A, Franke A et al (2018) Cortisol excess in patients with primary aldosteronism impacts left ventricular hypertrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 103:4543–4552