

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Endocrinologia

Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche:
Basi molecolari dell'azione ormonale, XXV° Ciclo
Coordinatore: Prof.ssa Lucia Frittitta

Dott.ssa MARIA LUISA NICOLOSI

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI TARGET MOLECOLARI PER LA TERAPIA DEL CARCINOMA POCO DIFFERENZIATO DELLA TIROIDE: STUDI IN VITRO

TESI DI DOTTORATO

Relatore:
Chiar.mo Prof. Francesco Frasca

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

SOMMARIO

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
CAPITOLO 1 – Tumori maligni della tiroide	
1.1 Epidemiologia del cancro della tiroide	7
1.2 Fattori di rischio	8
1.3 Istotipi di carcinoma tiroideo	11
1.3.1 Carcinomi ben differenziati	12
1.3.2 Carcinomi scarsamente differenziati	13
1.3.3 Carcinomi indifferenziati	13
1.3.4 Neoplasie tiroidee di origine non epiteliale	14
1.4 Alterazioni molecolari dei tumori tiroidei	15
1.4.1 Fattori che promuovono la proliferazione tumorale	15
1.4.2 Fattori che inibiscono la proliferazione tumorale	17
1.5 Anomalie molecolari di frequente riscontro nei tumori tiroidei	19
1.5.1 Alterazioni molecolari del carcinoma papillare (PTC)	19
1.5.2 Alterazioni molecolari del carcinoma follicolare	23
1.5.3 Alterazioni molecolari del carcinoma anaplastico	25
1.6 Terapie molecolari e nuovi farmaci	26
1.7 Fattori di crescita e cancro	29
1.7.1 Il sistema IGF	30
1.7.2 Il sistema EGF	34
CAPITOLO 2 – Scopo del lavoro	39
CAPITOLO 3 – Materiali e metodi	40
CAPITOLO 4 – Risultati: 1° progetto	44
CAPITOLO 5 – Risultati: 2° progetto	55
CAPITOLO 6 – Conclusioni e prospettive	61
BIBLIOGRAFIA	65

RIASSUNTO

Premessa. I carcinomi poco differenziati della tiroide sono refrattari ai trattamenti convenzionali per cui negli ultimi anni si sono condotti diversi studi finalizzati ad identificare le alterazioni molecolari di più frequente riscontro in tali tumori e che potrebbero essere responsabili della scarsa efficacia delle terapie classiche. Bersagli molecolari particolarmente interessanti sono: il recettore per l'epidermal growth factor (EGFR) e quello per l'IGF-I (IGF-IR) poiché entrambi risultano iperespressi nel carcinoma tiroideo. Di recente, le case farmaceutiche hanno sintetizzato vari inibitori molecolari rivolti verso entrambi i recettori quali per esempio il Gefitinib inibitore di EGFR e l'NVP-AEW541 in grado di bloccare IGF-IR. Tuttavia, gli studi preclinici condotti finora hanno dato risultati poco soddisfacenti, in termini di efficacia antitumorale, per la possibile insorgenza di meccanismi di resistenza a tali farmaci.

Oggetto dello studio. In questo studio, su una serie di linee cellulari di carcinoma umano tiroideo, abbiamo valutato i possibili meccanismi molecolari di resistenza al blocco farmacologico di EGFR ed IGF-IR, usando come inibitori il Gefitinib e l'NVP-AEW541, rispettivamente.

Risultati 1 (Inibizione di EGFR): Valutando l'espressione di EGFR, mediante analisi western blot, è stato visto che tutte le linee di carcinoma tiroideo analizzate iper-esprimevano tale recettore e che il Gefitinib era in grado di inibire la sua fosforilazione. Contrariamente a quanto atteso, questo farmaco si è mostrato scarsamente efficace nella riduzione della proliferazione delle cellule neoplastiche e della fosforilazione di ERK, mediatore a valle di EGFR. Questo dato è stato ottenuto nella maggior parte delle linee cellulari testate, ad eccezione delle linee cellulari WRO e Hth-74 che sono risultate sensibili al farmaco. Il Gefitinib non è risultato efficace in tutte quelle linee cellulari recanti mutazioni dei geni che portano all'attivazione costitutiva della via di ERK, tra cui BRAF (V600E), HRAS (G12A/Q61R) o riarrangiamento RET/PTC1. Alla luce di ciò, in questo studio abbiamo valutato gli effetti dell'inibizione dell'oncogene BRAF(V600E) e di RET sulla sensibilità delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib. Abbiamo trovato che l'inibizione di BRAF, mediante l'inibitore selettivo PLX4230, di fatto ripristina gli effetti del Gefitinib in

tutte le cellule in possesso della mutazione del BRAF. Risultati simili sono stati ottenuti con inibitori di RET.

Risultati 2 (Inibizione di IGF-IR): Dopo aver valutato gli effetti antiproliferativi dell'NVP-AEW541 in un gruppo di linee cellulari tumorali tiroidee abbiamo selezionato linee cellulari sensibili e resistenti al farmaco. In tutte le cellule testate, sia sensibili che resistenti, l'NVP-AEW541 ha inibito la fosforilazione di IGF-IR. Nelle cellule sensibili, l'NVP-AEW541 ha esercitato effetti antiproliferativi ed è stato in grado di inibire la via di segnale dipendente da AKT (pAKT) in maniera più efficace rispetto alla via di ERK1/2. Viceversa, nelle linee resistenti si è osservato un aumento di attivazione di ERK1/2 dopo NVP-AEW541 e nessuna inibizione della fosforilazione di AKT. Nelle cellule FF1 aventi, a livello di espressione proteica, un alto rapporto IR:IGF-IR, abbiamo trovato che EGFR viene attivato in seguito al trattamento con NVP-AEW541. Questo dato non è stato riscontrato nelle cellule C643, le quali esprimono alti livelli proteici di IGF-IR e bassi livelli di IR. Pertanto, abbiamo valutato l'efficacia di un trattamento combinato volto ad inibire sia IGFIR che EGFR o le vie a valle di esso quali MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Abbiamo trovato che l'inibizione di IGFIR associata a quella di EGFR o di ERK, è in grado di superare i meccanismi di resistenza all'inibizione singola di IGF-IR.

Conclusioni. Complessivamente questi risultati indicano che in alcune linee di carcinoma umano tiroideo la resistenza al Gefitinib è dovuta principalmente alla mutazione del BRAF (V600E) e che tale resistenza può essere superata utilizzando il Gefitinib in combinazione con inibitori del BRAF.

Inoltre, l'iper-espressione di IR e di EGFR possono entrambi contribuire alla resistenza dell'inibizione di IGF-IR. Una terapia combinata con altri farmaci molecolari mirati, come gli inibitori di EGFR o MAPK potrebbero superare questi meccanismi di resistenza.

ABSTRACT

Background. Poorly differentiated thyroid carcinomas are refractory to conventional treatments. In the last few years, several studies have been conducted in order to identify the molecular alterations that often are present in these tumors and that may be responsible for the lack of effectiveness of classical anti-cancer therapies. The EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase and IGF-IR represent newly attractive targets because these receptors are overexpressed in the majority of poorly differentiated thyroid carcinoma.

In the last years, pharmaceutical companies have synthesized various inhibitors including Gefitinib and NVP-AEW541, which specifically inhibit the tyrosine kinase activity of EGFR and IGF-IR, respectively. However, the preclinical studies conducted until now have been disappointing because cancer cells may develop resistance to these drugs.

Objective. Using a panel of different thyroid cancer cells, we aimed to evaluate the possible molecular mechanisms involved in the resistance to the pharmacological blockade of EGFR and IGF-IR by Gefitinib and NVP-AEW541, respectively.

Results 1 (EGFR blockade): Using western blot analysis, we found that EGFR was overexpressed in all human thyroid cancer cell lines analyzed. EGFR inhibition, using Gefitinib, effectively inhibited EGFR phosphorylation. Unexpectedly, the drug was poorly effective in reducing cell viability as well as in inhibiting the ERK phosphorylation in all cell lines analyzed, with the exception of the WRO and HTH-74 cells. The poor response to Gefitinib was associated with genetic alterations, leading to constitutive activation of the ERK pathway, including BRAF(V600E) or HRAS(G12A/Q61R) mutations or RET/PTC1 rearrangement. Indeed, when BRAF(V600E)-positive thyroid cancer cells were incubated with the specific BRAF inhibitor, PLX4032, the sensitivity to Gefitinib was restored. Similar results were obtained with specific RET inhibitors.

Results 2 (IGF-IR inhibition): We evaluated the anti-proliferative effects of NVP-AEW541 in a panel of cells derived from poorly differentiated thyroid carcinoma (ATC) and selected both sensitive and resistant cell lines. In all cells analyzed, NVP-AEW541 inhibited IGF-IR phosphorylation. In sensitive cells, NVP-AEW541 exerted

anti-proliferative effects and inhibited AKT phosphorylation (pAKT), while ERK phosphorylation was marginally affected. In resistant ATC cells, NVP-AEW541 was less effective in inhibiting pAKT while ERK phosphorylation remarkably increased. In FF1 cells showing, at protein level, high IR:IGF-IR ratio, we found that EGF receptor (EGFR) was also activated by NVP-AEW541 and, together with IR, was responsible of ERK activation. This result was absent in C643 cells, which express high IGF-IR and low IR protein levels. Therefore, we evaluated the effectiveness of a combination treatment with EGFR or MAPK inhibitors. We found that the co-treatment of NVP-AEW541 with Gefitinib or specific ERK inhibitors was able to partially revert the resistance to IGF-IR blockade alone.

Conclusions. Overall, these results indicate that BRAF^(V600E) by activating the ERK pathway may play a major role in determining Gefitinib resistance in all thyroid cancer cells harboring this mutation.

Furthermore, high IR and EGFR expression may both contribute to resistance to IGF-IR inhibition in human ATC cells.

In summary, a combination therapy with other molecular targeted drugs, such as MAPK or EGFR inhibitors, may overcome these mechanisms of drug resistance.

CAPITOLO 1 – TUMORI MALIGNI DELLA TIROIDE

1.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCRO DELLA TIROIDE

Il carcinoma della tiroide rappresenta l'1-2 % di tutte le neoplasie maligne [1] ; esso ha mostrato un significativo incremento negli ultimi 30 anni e negli Stati Uniti è la settima causa di cancro nel sesso femminile [2]. Il tumore della tiroide è uno dei pochi che colpisce più frequentemente le donne, con un rapporto 2-4:1 rispetto agli uomini. Il picco di incidenza è intorno ai 40-45 anni nelle donne e 55-60 negli uomini ed è raro nei soggetti sotto i 16 anni [3-4].

I dati epidemiologici più rappresentativi sono quelli che provengono dal SEER, (Surveillance Epidemiology and End Result) Registro Tumori basato sui dati di nove registri regionali degli Stati Uniti (Atlanta, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, San Francisco, Seattle e Utah) che rappresentano il 12% della popolazione USA. Questi dati indicano un'incidenza annuale media del carcinoma tiroideo relativa al periodo 2004-2005 di 16.5 casi/100.000 abitanti/anno (22.9 e 9.9 /100.000 rispettivamente nelle donne e negli uomini). Sempre secondo i dati del SEER l'incidenza del carcinoma tiroideo è passata dal 6.7 del 1988 al 16.5 del 2003 [9]. In Italia, il tasso di incidenza tra gli uomini e le donne è rispettivamente di 15.5 e 5.2 diagnosi per 100.000 residenti per anno, rispettivamente.

L'incremento di incidenza del carcinoma della tiroide è a carico principalmente dei carcinomi papilliferi, mentre non sono stati documentati cambiamenti significativi nell'incidenza degli altri istotipi. Il tasso di incidenza del carcinoma follicolare si è mantenuto stabile e quello del carcinoma anaplastico si è ridotto; poiché è opinione comune che il carcinoma anaplastico derivi dalla dedifferenziazione di un preesistente carcinoma papillifero, si suppone che il suo decremento possa essere attribuito ad una diagnosi precoce ed ad un più efficace trattamento di tumori diagnosticati precocemente. Inoltre dagli anni '90 in poi circa il 50 % dell'incremento di incidenza riguarda tumori ≤ 1 cm (microcarcinomi) e nell'87% tumori ≤ 2 cm.

Due fattori sembrano contribuire all'incremento dell'incidenza del carcinoma papillifero: il primo, e probabilmente il più importante, è il più frequente uso nella pratica clinica dell'ecografia e dell'esame citologico tramite agoaspirazione (FNAB) per valutare piccoli noduli tiroidei asintomatici (si riscontra infatti una correlazione positiva tra il numero di queste procedure diagnostiche e l'incidenza di carcinoma papillifero specie di diametro inferiore 2 cm). Un secondo fattore sarebbe rappresentato dal cambiamento che l'OMS ha effettuato nel definire la variante follicolare del carcinoma papillifero (che in passato veniva descritto come carcinoma follicolare).

Il fattore ambientale è considerato un fattore determinante nell'eziopatogenesi del tumore tiroideo. A tale proposito numerosi studi hanno evidenziato come un tasso di incidenza elevato di tumore tiroideo sia presente in aree vulcaniche basaltiche del Giappone, delle Filippine, dell'Islanda e delle isole Hawaii; inoltre un recente studio ha evidenziato come nell'area adiacente al vulcano Etna nella provincia di Catania si riscontri un tasso di incidenza annuo di carcinoma tiroideo del 31.7 nelle donne e del 6.4 negli uomini contro rispettivamente il 14.1 e il 3.0 nelle restanti aree della Sicilia. Il meccanismo attraverso cui l'ambiente vulcanico incrementi l'incidenza del carcinoma tiroideo rimane sconosciuto. I vulcani attivi producono microparticelle e gas che si disperdono nell'ambiente e che possono contaminarlo, inserendosi nella catena alimentare. Inoltre le acque che sgorgano dalla falda acquifera del vulcano Etna contengono concentrazioni elevate di composti chimici e metalli come boro, ferro, manganese, vanadio; il vulcano rilascia anche elevate quantità di radon²²², una sostanza radioattiva correlata con le neoplasie del polmone, ma il cui effetto sulla tiroide rimane sconosciuto [8].

1.2 FATTORI DI RISCHIO

Come per la maggior parte delle neoplasie solide, anche per i tumori della tiroide l'eziologia sembra essere multifattoriale e il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali e fattori di rischio.

Alcuni di questi sono legati all'ambiente (pregressa irradiazione, area geografica di residenza, apporto iodico), altri sono legati al paziente (familiarità positiva per neoplasia tiroidea, preesistente patologia tiroidea benigna, ormoni sessuali femminili e parità, peso corporeo).

- La **precedente esposizione a radiazioni ionizzanti** rappresenta uno dei fattori più noti nella carcinogenesi tiroidea. La relazione è stata riconosciuta per la prima volta negli anni '50, nella popolazione giapponese esposta alle radiazioni atomiche di Hiroshima e Nagasaki in cui si è registrato un aumento dell'incidenza di neoplasie nei soggetti che al momento dell'esplosione nucleare avevano un'età compresa tra 5 mesi e 10 anni (con nessuna sostanziale differenza nell'incidenza tra uomini e donne). Nell'infanzia e nell'adolescenza infatti la tiroide mostra una maggiore vulnerabilità nei confronti delle radiazioni ionizzanti. Il rischio relativo aumentava progressivamente con un picco 15-20 anni dopo l'irradiazione e permaneva fino oltre 40 anni dall'esposizione alle radiazioni [10]. Anche dopo l'incidente al reattore nucleare di Chernobyl, a seguito della contaminazione ambientale da parte di radionuclidi a breve emivita dello iodio si è verificato un rapido incremento dell'incidenza del carcinoma tiroideo, che è passato da meno di un caso per milione di abitanti a oltre 100 casi nei soggetti che al momento dell'esplosione avevano un'età inferiore a 15 anni [11-12]. Riguardo alle caratteristiche del tumore gli istotipi più frequentemente rilevati erano le varianti solida e follicolare del carcinoma papillifero tiroideo. Al momento della diagnosi la malattia si trovava in uno stadio già avanzato presentandosi con metastasi linfonodali e polmonari con una frequenza maggiore rispetto a quello osservato nei tumori sporadici mostrando un comportamento biologico più aggressivo; inoltre era più frequente il riscontro di associazione della neoplasia con tiroiditi autoimmuni [13-14]. Anche la terapia radiante, usata a scopo terapeutico in età pediatrica per la cura di patologie ematologiche ed oncologiche come il linfoma o la leucemia, favorisce la successiva insorgenza di patologie della tiroide (noduli, adenomi, carcinomi) [15-16]. Il rischio di sviluppare un tumore tiroideo è 3-10 volte più elevato nei soggetti sottoposti a radioterapia esterna durante l'infanzia [17]. Nella popolazione adulta inoltre l'aumento dei casi di carcinoma tiroideo potrebbe essere in parte dovuto all'utilizzo tra il 1910 e il 1960 di radiazioni ionizzanti per il trattamento di patologie benigne (ipertrofia tonsillare, tinea capitis, emangioma). È stata avanzata inoltre l'ipotesi che il maggior uso di tomografia assiale computerizzata (TC) potrebbe di per sé aumentare il rischio di carcinoma tiroideo.
- **L'apporto iodico**. Nelle aree a carenza iodica vi è una più alta prevalenza di noduli tiroidei (ma la percentuale di malignità è minore) [19-20]. Nelle aree a sufficiente apporto iodico prevale il carcinoma tiroideo ben differenziato, in particolare l'istotipo papillare, mentre nelle regioni a carente apporto iodico diventano prevalenti

gli istotipi follicolare ed anaplastico. A seguito dei programmi di iodoprofilassi si è documentato un aumento del rapporto tra l'istotipo papillifero e quello follicolare [9,19,20].

- **Area geografica di residenza.** Studi epidemiologici hanno dimostrato una più bassa incidenza del cancro della tiroide in alcuni paesi europei come Danimarca, Olanda e Slovacchia, e un'incidenza più alta in Giappone, Francia ed in alcune aree vulcaniche quali Islanda, le Hawaii e le Filippine [21].

- Una **preesistente patologia tiroidea benigna** rappresenta un fattore predisponente lo sviluppo di una neoplasia tiroidea [9-22]. Nei soggetti con gozzo nodulare o multi nodulare e in quelli con Morbo di Basedow vi è una maggiore incidenza di noduli tiroidei maligni. Nel M. di Basedow si riscontra un'incidenza di noduli maligni che varia dallo 0.4 al 9.8 % [23-24] con un rischio maggiore per quei soggetti che presentano noduli palpabili o rilevabili mediante esami strumentali, rispetto ai soggetti con gozzo diffuso non nodulare. Inoltre i tumori insorti nei pazienti con M. di Basedow sembrano avere un decorso clinico più aggressivo.

- **Sesso e fattori ormonali.** L'incidenza del carcinoma della tiroide è di 2-4 volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini; ad eccezione che nel periodo pre-pubere e in fase post-menopausale l'incidenza risulta pressochè identica nei due sessi per poi aumentare nell'età fertile con un rapporto 2-4:1. Da qui l'ipotesi del ruolo degli estrogeni come possibile fattore di rischio [27] anche se a tutt'oggi non sono presenti evidenze a tal riguardo, né correlazioni certe. Rimane controversa anche la correlazione tra il carcinoma tiroideo e quello mammario. Il recettore per gli estrogeni è presente nel tessuto tiroideo normale e nei carcinomi papilliferi, mentre il recettore per il testosterone è espresso solo nel tessuto tiroideo normale ma non in quello neoplastico [25-26].

- **Massa corporea.** Studi caso-controllo hanno dimostrato un aumento del rischio di carcinoma tiroideo in pazienti con un elevato BMI. Il rischio sembrerebbe aumentato di 5 volte negli uomini e di 2 volte nelle donne con obesità sopra il 97° percentile rispetto ai soggetti con peso inferiore al 3° percentile. Nelle donne anche un lieve sovrappeso (specie in epoca post-menopausale) sembra correlarsi positivamente col carcinoma tiroideo [28].

- **Familiarità.** Il 3-5% dei pazienti con carcinoma tiroideo ha un'anamnesi familiare positiva per neoplasia tiroidea [29]. Il carcinoma tiroideo familiare (FNMTTC:

carcinoma tiroideo familiare non midollare), ha un'incidenza variabile dal 3 al 7 % e riguarda casi di carcinoma tiroideo ad istotipo prevalentemente papillifero, che si manifestano in componenti del medesimo nucleo familiare. La trasmissione sembra essere di tipo dominante a trasmissione incompleta. Questi tumori hanno spesso una maggiore aggressività, come indicato dalla maggiore multifocalità e da un maggior tasso di recidive rispetto alla popolazione affetta da carcinoma tiroideo sporadico [30-31].

- **Etnia:** negli Stati Uniti, ispanici e popolazione di origine africana presentano un'incidenza inferiore di carcinoma della tiroide rispetto alle altre etnie [32].
- Anche **le abitudini alimentari** e **lo stile di vita** sembrano avere un ruolo nella carcinogenesi tiroidea. L'uso di burro, formaggi, amidi, olio di fegato di pesce e l'abuso di pesce affumicato sembrano aumentare il rischio di cancro. Una dieta ricca di frutta e verdura sembrerebbe al contrario svolgere un ruolo protettivo [33]. L'effetto dei fattori gozzigeni non è ancora ben chiaro: l'ingestione dei cianati, che subiscono poi una trasformazione a tiocianati, non sembrerebbe avere alcun ruolo. Il fumo di sigaretta non influenzerebbe la patogenesi del carcinoma tiroideo [34]. I solventi (benzene e formaldeide) utilizzati dai lavoratori in campo tessile sembrano aumentare di 6-8 volte il rischio di ammalarsi di carcinoma tiroideo [44].

1.3 ISTOTIPI DI CARCINOMA TIROIDEO

Secondo la classificazione WHO del 2004 [36] le neoplasie della tiroide comprendono i tumori derivati dall'epitelio follicolare, tumori derivati dalle cellule c parafollicolari e tumori ad istogenesi mista.

Le neoplasie derivate dall'epitelio follicolare rappresentano oltre il 95 % delle neoplasie tiroidee e comprendono:

- i tumori benigni ovvero gli **adenomi**;
- i tumori maligni che comprendono i **carcinomi primitivi** distinti in forme differenziate, scarsamente differenziate o indifferenziate.

<i>Carcinoma differenziato (DTC)</i>	Papillare (PTC)	Puro Variante follicolare Variante sclerosante diffuso Variante a cellule colonnari
	Follicolare (FTC)	Minimamente invasivo Altamente invasivo Oncocitico (o a cellule di

	Hurthle)
<i>Carcinoma poco differenziato (PDTC)</i>	Insulare
<i>Carcinoma indifferenziato UTC)</i>	Anaplastico

Il carcinoma papillare è la neoplasia tiroidea più frequente (80-85%), il carcinoma follicolare ha un'incidenza del 10-15%, i carcinomi poco differenziati del 5-10%, il carcinoma anaplastico dell'1-2% (Fig. 1).

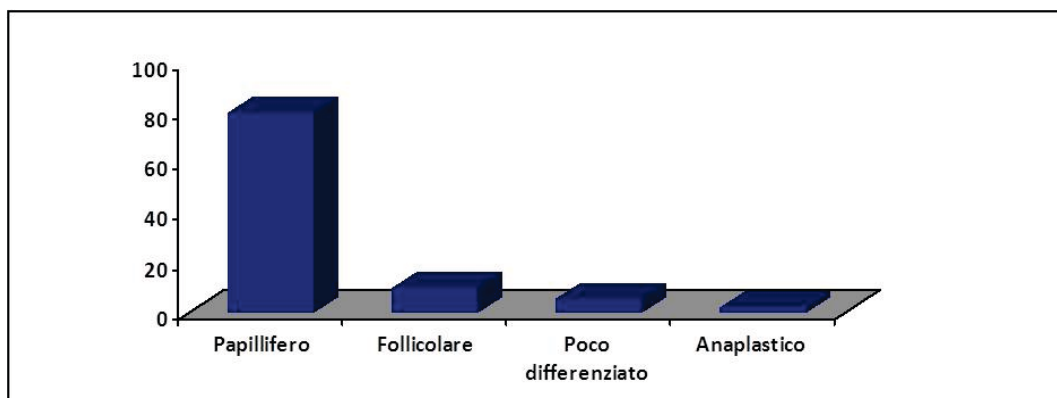


Figura 1 – Distribuzione percentuale per istotipo

1.3.1 Carcinoma ben differenziati

- **Carcinoma papillifero:** Il carcinoma papillifero rappresenta la tipologia più frequente di carcinoma tiroideo con una frequenza che è superiore nelle donne rispetto agli uomini, e spesso si manifesta in età inferiore a 45 anni (National Cancer Institute, 2007). Questo tipo di carcinoma cresce molto lentamente, per cui se la diagnosi viene effettuata precocemente permette una completa guarigione. Molto spesso il carcinoma papillifero appare come un nodulo con tendenza infiltrativa anche se difficilmente supera i confini tiroidei ma tende ad invadere facilmente i vasi linfatici originando focolai metastatici intratiroidei e simulando una neoplasia multifocale; inoltre questo tipo di tumore dà metastasi per via linfatica e raramente per via ematica. Esistono diverse varianti istologiche di PTC tra cui la variante follicolare e a cellule alte. Inoltre diverse evidenze epidemiologiche indicano che il fattore di rischio più importante per il PTC è rappresentato dalle radiazioni ionizzanti; infatti un'alta incidenza di questo cancro si riscontra tra i soggetti che sono sopravvissuti alle bombe atomiche di

Nagasaki ed Hiroshima e al disastro di Chernobyl. Inoltre i soggetti che sono stati trattati con radiazioni nelle regioni del collo e della testa per motivi terapeutici (iperplasia timica, infezioni micotiche, linfomi) hanno presentato una maggiore suscettibilità allo sviluppo di PTC. Il carcinoma papillifero è caratterizzato frequentemente da alterazioni genetiche che determinano l'attivazione della via di trasduzione del segnale intracellulare delle protein chinasi MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Tali alterazioni genetiche includono riarrangiamenti del protooncogene *Ret* (*Ret/PTC*) e mutazioni puntiformi dei geni *Braf* e *Ras*.

- **Carcinoma follicolare:** Il carcinoma follicolare è il secondo tumore maligno per frequenza della ghiandola tiroidea (10-20%); insorge generalmente in età più avanzata e con maggiore frequenza nelle aree con gozzo endemico. E' definito come una neoplasia maligna che origina dall'epitelio follicolare ma che non ha le caratteristiche morfologiche diagnostiche del carcinoma papillare. Si presenta spesso come un tumore ben differenziato ed incapsulato. Il tumore è costituito da follicoli strettamente addossati o disposti in trabecole o in nidi solidi. Le cellule tumorali sono cuboidali, hanno nuclei tondi, pallidi o scuri con nucleoli poco rappresentati. Al contrario del carcinoma papillare, il carcinoma follicolare si presenta abitualmente come un nodulo tiroideo unico, spesso circoscritto da una capsula fibrosa, che può mancare completamente nelle forme estesamente invasive. In funzione del grado di invasione dei vasi e della capsula, l'OMS distingue due forme di carcinoma follicolare: la forma minimamente invasiva e la forma altamente invasiva. Questa distinzione ha un notevole valore prognostico, poiché la prognosi si aggrava con l'aumentare del grado di angioinvasività.

1.3.2 Carcinoma scarsamente differenziati

Si definisce carcinoma tiroideo scarsamente differenziato quella neoplasia tiroidea che non mostra segni architetturali di differenziazione follicolare ed ha aspetto istologico e comportamento biologico intermedio tra i carcinomi tiroidei differenziati e quelli indifferenziati. Tra i criteri morfologici per diagnosticare tale neoplasia vi sono la presenza nel tumore di necrosi e di attività mitotica [5]. Le metastasi sono frequenti, sia linfonodali che a distanza. La prognosi è sfavorevole.

1.3.3 Carcinoma indifferenziati

- **Carcinoma anaplastico:** anche se poco frequente (meno del 5% di tutti i carcinomi tiroidei) è quello a prognosi peggiore causando la morte entro pochi mesi dalla diagnosi. È una neoplasia tipica dell'età avanzata con un picco di incidenza intorno alla 6^a-7^a decade di vita con lieve prevalenza nel sesso femminile (F:M=2:1) [40]. Clinicamente la neoplasia si presenta come una massa voluminosa a rapida crescita e frequenti sono i sintomi legati alla compressione e/o infiltrazione del tratto aereo-digestivo adiacente: disfonia, dispnea, disfagia [41]. Il carcinoma anaplastico di regola rappresenta l'evoluzione di un carcinoma ben differenziato, papillare, follicolare ma anche di forme poco differenziate. I marcatori immunostochimici tiroidei sono raramente dimostrabili; tra i marcatori epiteliali il più importante è la citocheratina che, quando presente, se usata in associazione con i rispettivi marcatori specifici, consente di distinguere questa neoplasia da altri tumori non epiteliali (sarcomi, linfomi). Il carcinoma anaplastico metastatizza per via ematica, per via linfatica e per contiguità [38]. Il comportamento biologico, la presenza di metastasi a distanza alla diagnosi, l'assenza di differenziazione cellulare, che impedisce la captazione dello Iodio¹³¹ da parte delle cellule neoplastiche e quindi rende vana la terapia radiometabolica, e l'impossibilità di un intervento chirurgico radicale, dovuto alla massiva invasione delle strutture limitrofe, spiegano la prognosi infausta. La radioterapia e la chemioterapia rappresentano un'alternativa terapeutica poco soddisfacente con mediane di sopravvivenza comprese tra 2 e 6 mesi e pochi pazienti superano i 12 mesi.

1.3.4 Neoplasie tiroidee di origine non epiteliale

Le neoplasie tiroidee di origine non epiteliale comprendono il carcinoma midollare, il linfoma e il sarcoma. Raramente la tiroide può essere sede di localizzazioni secondarie da parte di tumori della mammella, del rene e del polmone.

- Il **carcinoma midollare** della tiroide deriva dalle cellule C parafollicolari e rappresenta circa il 10% delle neoplasie tiroidee; ha un picco di incidenza intorno la 4a e la 6a decade di vita e una prevalenza lievemente superiore nel sesso femminile [42]. Nell'80% dei casi si presenta in forma sporadica e nel 20% in forma familiare nel contesto di due sindromi, note come MEN (neoplasie endocrine multiple), MEN 2A e MEN 2B, e nel contesto del FMTC (carcinoma tiroideo midollare familiare) [43]. Il carcinoma midollare metastatizza sia per via linfatica che per via ematica ad ossa, fegato e polmone [38].

- Il **linfoma tiroideo** è un tumore raro, in genere rappresentato dal linfoma non Hodgkin ed è analogo agli altri linfomi extranodali. Interessa prevalentemente i soggetti di età avanzata con picco d'incidenza oltre i 70 anni e rapporto F:M pari a 3:1. Si osserva in genere in pazienti con tiroidite cronica autoimmune con positività degli anticorpi anti-tireoglobulina (AAT) e antimicrosomi (AAM). Chemioterapia e radioterapia garantiscono una percentuale di guarigione superiore al 90%.

1.4 ALTERAZIONI MOLECOLARI DEI TUMORI TIROIDEI

Ancora oggi risultano poco chiari i meccanismi patogenetici che portano alla formazione dei tumori. I tumori maligni hanno un'origine monoclonale, in accordo con l'ipotesi che essi abbiano origine da mutazioni che conferiscono un vantaggio di crescita a una singola cellula, secondo un processo patogenetico che viene definito "multistep" o multifattoriale, in cui l'interazione tra fattori ambientali e genetici coinvolti nella proliferazione, differenziazione e morte cellulare sarebbero responsabili dell'iniziazione e della progressione tumorale. Anche per il carcinoma tiroideo si è quindi posta grande attenzione alle alterazioni genetiche che interessano alcuni proto-oncogeni e geni oncosoppressori coinvolti nel processo di crescita cellulare tiroidea (RAS, RET, MET, B-RAF, TRK, PAX8/PPAR γ , p53, p63, p73...) e sebbene i meccanismi non siano ancora del tutto completamente chiariti, si è però evidenziato un coinvolgimento delle due principali vie di trasmissione del segnale: la via di segnalazione delle MAP chinasi (MAPK) e la via di segnalazione di PI3K/AKT. Queste vie di segnalazione regolano diversi processi cellulari tra cui la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza. Da qui si deduce l'importanza di studiare sia i meccanismi molecolari sia le vie di trasduzione del segnale, responsabili dell'insorgenza dei carcinomi tiroidei.

I fattori, che regolano il processo di carcinogenesi tiroidea, possono essere distinti, a scopo esemplificativo, in due categorie:

- 1) fattori che promuovono la proliferazione tumorale;
- 2) fattori che inibiscono la proliferazione tumorale.

1.4.1 Fattori che promuovono la proliferazione tumorale.

A tale gruppo appartengono: fattori di crescita (e loro recettori) e protooncogeni.

Fattori di crescita:

Riguardo ai fattori stimolanti la crescita cellulare come TSH, EGF, TGF- β , IGF-I, VEGF, è stato notato che una loro alterata sintesi o l'attivazione costitutiva dei recettori e delle vie di trasduzione del segnale, a loro correlate, sono di fondamentale importanza nella formazione dei tumori tiroidei [58].

La ghiandola tiroidea rappresenta un modello esemplificativo, in cui il TSH costituisce il principale fattore di crescita, tessuto specifico, ed il maggiore determinante del destino della cellula follicolare tiroidea [57]. Il suo ruolo sulla crescita e differenziazione dei tireociti si manifesta attraverso il legame con il suo recettore, il TSH-R, e la conseguente attivazione delle vie di trasduzione del messaggio intracellulare dipendenti da AMPc (Adenosina Mono Fosfato ciclica) e PLC (Fosfolipasi C). Sebbene il principale fattore della degenerazione maligna dei tireociti sembri dovuta alla via di attivazione del TSH-R, indipendentemente dal legame con il suo ligando, rare mutazioni di tale recettore sono state descritte nei carcinomi tiroidei rispetto ai tumori tiroidei benigni. E' stato, invece, notato che i livelli del mRNA di TSH-R si riducono in modo direttamente proporzionale alla perdita delle caratteristiche di differenziazione cellulare. Si può, pertanto, ipotizzare che l'alterazione dell'espressione del recettore per il TSH sia un evento tardivo nella progressione tumorale tiroidea [56].

Da notare, inoltre, che alcuni segnali di crescita, come quelli inviati dall'EGF, non solo svolgono un potente effetto mitogeno, ma causano anche la perdita di alcune funzioni di differenziazione, mediate dal TSH, tra cui la capacità di captare iodio e di produrre tireoglobulina ed ormoni [65-68].

Protooncogeni:

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che i primi stadi della carcinogenesi tiroidea potrebbero dipendere dall'attivazione di protooncogeni, generalmente dovuta a mutazioni a carattere dominante. Tali alterazioni genetiche sono definite "mutazioni con guadagno di funzione", in quanto determinano l'acquisizione, da parte dei protooncogeni,

di una insensibilità ai meccanismi di inibizione. Pertanto, essi diventano costitutivamente attivi (oncogeni) e capaci di trasformare in neoplastica la cellula tiroidea normale.

I principali protooncogeni, coinvolti nella tumorigenesi tiroidea, sono: RAS, BRAF e RET/PTC [63-64]. Le mutazioni che coinvolgono tali geni sono sempre mutuamente esclusive, in quanto non sono mai contemporaneamente presenti nello stesso tumore e coinvolgono tappe diverse nella stessa via di trasduzione del messaggio intracellulare. L'effetto finale comune è l'attivazione della MAPchinasi (MAPK o ERK), enzima chiave, che agisce, attraverso la fosforilazione di fattori di trascrizione quali c-fos, c-jun, c-myc e S6K, nella regolazione della proliferazione cellulare [59]. Queste evidenze suggeriscono l'importante funzione svolta da questa via nella trasformazione neoplastica e nella perdita di differenziazione della cellula tiroidea.

1.4.2 Fattori che inibiscono la proliferazione tumorale.

Tale categoria include: regolatori del ciclo cellulare e geni oncosoppressori.

Proteine che regolano il ciclo cellulare:

La perdita del normale controllo del ciclo cellulare per alterazione dei fattori preposti alla sua regolazione, tra cui le cicline, le chinasi ciclino dipendenti (CDKs) e gli inibitori di queste ultime (CDKI), porta ad anomalie nella proliferazione ed a modifiche molecolari, responsabili della trasformazione maligna e della progressione tumorale [56].

In numerose neoplasie umane e in circa il 35% dei tumori tiroidei [69-72], infatti, diversi studi hanno evidenziato un incremento dell'espressione dei regolatori positivi (soprattutto la ciclina D1 e la sua rispettiva chinasi) e/o una riduzione dell'espressione dei regolatori negativi (p21, p27, p15, p16).

In quest'ultimo tipo di tumore, le anomalie nell'espressione di tali fattori risultano correlate con l'attività proliferativa e l'aggressività tumorale, confermando un loro importante ruolo nel processo di progressione neoplastica tiroidea nonché un loro possibile significato prognostico [60].

Oncosoppressori:

Gli oncosoppressori sono geni in grado di sopprimere la proliferazione, quando la cellula subisce un danno genomico. La loro attivazione consente, infatti, un arresto della

crescita e dunque la possibilità di riparare il danno subito, o, se esso è grave ed irreversibile, l'innescò dell'apoptosi.

Un difettoso funzionamento di tali geni è, in genere, causato da alterazioni genetiche che portano alla perdita dell'attività oncosoppressoria. Tali alterazioni genetiche sono definite "mutazioni con perdita di funzione".

In genere, queste alterazioni sono a carattere recessivo, poichè coinvolgono un solo allele. L'eliminazione dell'altro allele può avvenire successivamente tramite eventi secondari, come la perdita di eterozigosità (Loss of Heterozygosity, LOH) e disattivazione del suo promotore (silenziamento genico) [56].

Le principali alterazioni geniche, con "perdita di funzione", che si verificano nei tumori tiroidei comprendono:

- alterazioni del gene Rb, presenti nel 55% dei carcinomi tiroidei con una maggiore prevalenza nei tumori clinicamente più aggressivi [71];
- mutazioni delle β -catenine, notate nel 60% dei tumori anaplastici [61];
- perdita di eterozigosità di PTEN, riscontrata nel 60% dei carcinomi poco differenziati e nel 25% di quelli differenziati;
- riarrangiamenti PAX/PPAR γ evidenziabili nel 20% dei carcinomi follicolari [63-64];
- mutazioni a carico del gene p53, presenti in più dell'85% dei tumori anaplastici [73].

Similmente a quanto accade nel gruppo degli oncogeni, anche nella categoria degli oncosoppressori esistono proteine, che, indipendentemente da eventi mutazionali, presentano alterata espressione e funzione nel contesto delle neoplasie tiroidee.

Tra queste proteine, sono degne di nota i membri della famiglia di p53 ovvero p63 e p73.

Sebbene alcuni di questi meccanismi molecolari menzionati siano stati ben caratterizzati, essi spiegano solo in parte gli aspetti della tumorigenesi tiroidea.

Ad oggi, infatti, molti interrogativi rimangono aperti. Ci si chiede, p.e:

- quali siano le interazioni geni-ambiente coinvolte nella determinazione delle mutazioni riscontrate nei carcinomi tiroidei;
- cosa determini il sottotipo istologico;
- cosa influenzi il comportamento biologico dei vari tipi di carcinoma tiroideo.
- quale sia il ruolo biologico delle cellule staminali tiroidee

1.5 ANOMALIE MOLECOLARI DI FREQUENTE RISCONTRO NEI TUMORI TIROIDEI

Nonostante sia ancora carente la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici del tumore tiroideo, certamente le anomalie genetiche di componenti di vie di trasduzione del segnale, rappresentano il fattore determinante nella formazione di tale tumore.

La deregolazione costitutiva o indotta delle cascate di segnale di MAPK e PI3-K rappresenta un evento comune nel cancro tiroideo e svolge un ruolo importante nello sviluppo di tale patologia [74-75].

1.5.1 Alterazioni molecolari del carcinoma papillare (PTC)

Varie considerazioni indicano che il fattore di rischio più importante per il PTC è rappresentato dalle radiazioni ionizzanti. Infatti, un'alta incidenza di PTC si è verificata tra i sopravvissuti alle bombe atomiche di Nagasaki ed Hiroshima. I soggetti che sono stati trattati negli anni '50 con radiazioni nelle regioni del collo e della testa per la terapia di iperplasia timica o infezioni micotiche hanno presentato una maggiore suscettibilità allo sviluppo di PTC. Le regioni geografiche che presentano la più alta incidenza di PTC sono le Isole Hawaii e l'Islanda, due regioni vulcaniche con alti livelli di radiattività ambientale. Infine, conseguentemente all'incidente nucleare di Chernobyl nell'aprile del 1986 si è verificato un incremento notevole di PTC nei bambini della Bielorussia e dell'Ucraina.

I PTC sono principalmente caratterizzati da mutazioni attivanti il proto-oncogene BRAF o da riarrangiamenti somatici del proto-oncogene RET. Più raramente si riscontrano riarrangiamenti del gene NTRK1 (Neurotrophic Tyrosine Kinase Type 1) e mutazioni attivanti il gene RAS, quest'ultimi limitati soprattutto alla variante follicolare dell'istotipo papillare.

Tali mutazioni sono mutuamente esclusive in quanto non sono mai contemporaneamente presenti nello stesso tumore e coinvolgono tappe diverse della stessa cascata di trasduzione del segnale intracellulare, ossia la via delle MAPK. Queste evidenze suggeriscono l'importante funzione svolta da questa via nella tumorigenesi del PTC.

<i>Frequenza delle alterazioni genetiche nel PTC[6]</i>	
BRAF	45%
RET/PTC	20%
RAS	10%
TRK	< 5%

➤ ***BRAF***

Il gene *BRAF*, localizzato sul cromosoma 7q34, codifica per una serino/treonino chinasi citosolica. Tale proteina insieme a CRAF ed ARAF costituisce la famiglia delle proteine RAF, effettori intracellulari della cascata di segnalazione MAPK. Le chinasi RAF attivate dal legame alle proteine G monomeriche della famiglia RAS, fosforilano ed attivano MEK1 e MEK2 che, a sua volta, fosforilano ed attivano ERK1 ed ERK2.

ERK è un enzima chiave nella regolazione della proliferazione cellulare, che agisce attraverso la fosforilazione di fattori trascrizionali quali c-fos, c-jun, c-myc e S6K [7].

Tra i 3 tipi di RAF citati, BRAF è il più espresso a livello tiroideo ed è dotato dell'attività chinastica basale più elevata ed è anche il più potente attivatore di MEK.

Come illustrato nella Figura 2, la proteina BRAF è costituita da tre domini proteici principali:

- a) CR-1, che corrisponde al sito di legame per RAS;
- b) CR-2, che presenta una serie di siti di fosforilazione;
- c) CR-3, che presenta il domino chinastico.

Le mutazioni si localizzano nel segmento di attivazione, un'ansa della chinasi che normalmente stabilisce un'interazione con il segmento-P. Questa interazione è impedita dalle mutazioni che così attivano la chinasi.

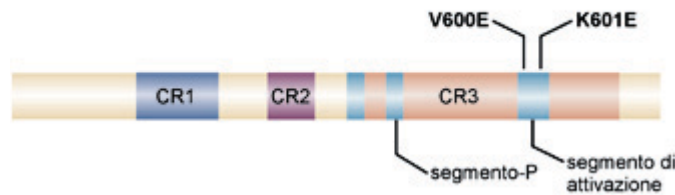


Figura 2 – Disegno schematico della proteina BRAF e dei suoi domini principali (CR1, CR2 e CR3). Sono evidenziate la mutazione V600E e la rara mutazione K601E.

Mutazioni a carico di BRAF sono presenti mediamente nel 44% dei casi con una variabilità dal 28 all'83% nei diversi studi. Nella maggior parte dei PTC l'attivazione oncogenica del gene BRAF è causata dalla mutazione Val600Glu (genotipo T1799A) [18], la stessa rinvenuta anche nei melanomi maligni ed in un sottogruppo di tumori dell'ovaio e del colon.

Sono state inoltre descritte alcune rare mutazioni attivanti, più frequentemente associate a carcinomi secondari a radiazioni, come la mutazione puntiforme K601E, inserzioni o delezioni a livello del codone 600 e il riarrangiamento AKAP9-BRAF9 [35].

Le mutazioni di BRAF sembrano essere degli eventi di iniziazione tumorale nei PTC. A supporto di questa affermazione vi è il loro riscontro nei microcarcinomi papillari della tiroide, considerati uno step iniziale dello sviluppo dei carcinomi clinicamente significativi, e l'evidenza che topi transgenici portatori della mutazione BRAF V600E nella tiroide sviluppano carcinoma di istotipo papillare [37].

La mutazione di BRAFV600E spesso si riscontra nei tumori tiroidei anaplastici, suggerendo che tale oncogene potrebbe essere coinvolto nella progressione del cancro tiroideo verso le forme più aggressive [18]. Diversi studi indicano che BRAF mutato rappresenta un fattore predittivo di cattiva prognosi. Tale gene, pertanto, rappresenterebbe un utile marcatore molecolare per la stratificazione del rischio di pazienti affetti da tale patologia [18]. Questi risultati, tuttavia non sono stati confermati da altri studi [39].

➤ **Riarrangiamenti *RET/PTC***

Il proto-oncogene *RET* codifica per un recettore di membrana con un dominio extracellulare con cui lega specifici ligandi della famiglia del GDNF (glial - derived neurotrophic factor), un dominio idrofobico di ancoraggio alla membrana cellulare ed un dominio intracellulare dotato di attività tirosino-chinasi (TK).

Normalmente *RET* non viene espresso nelle cellule follicolari tiroidee. Infatti, esso è espresso in tessuti di derivazione neuroectodermica, ad esempio in alcune regioni del sistema nervoso centrale e periferico, nella midollare del surrene e nelle cellule parafollicolari della tiroide.

Nei PTC, specifiche inversioni o traslocazioni cromosomiche che interessano il braccio lungo del cromosoma 10 (10q11.2), regione in cui mappa il gene *RET*, causano la rottura di *RET* tra il dominio TK ed il dominio transmembrana e la fusione del dominio TK alla parte 5'-terminale di altri geni. In seguito a questa fusione, la trascrizione del gene *RET* passa sotto il controllo dei promotori dei geni che si fondono ad esso, i quali sono ubiquitari e quindi capaci di attivarne la trascrizione.

I risultanti geni di fusione (geni chimerici) sono stati chiamati *RET/PTC*. Questa denominazione riflette la loro derivazione da *RET* e la loro presenza selettiva nel PTC e non in neoplasie di altri tessuti nè in altri tumori tiroidei.

I geni *RET/PTC* sono dei potenti oncogeni, in quanto questi riarrangiamenti lasciano intatto il dominio tirosino-chinasico del recettore *RET* e portano l'oncoproteina a legare *SHC* e ad attivare la cascata *RAS-RAF-MAPK* in modo costitutivo.

Sono state isolate molte varianti *RET/PTC*, tutte invariabilmente contenenti lo stesso dominio TK e differenti geni “partners” fusi ad esso. La maggior parte di questi riarrangiamenti è stata riscontrata esclusivamente in tumori di pazienti provenienti dalle aree interessate dall’incidente nucleare di Chernobyl. Tuttavia le varianti più frequenti sono *RET/PTC1* e *RET/PTC3*. Nel primo caso la fusione del TK di *RET* avviene con il gene *H4*, mentre nel secondo caso la fusione avviene con il gene *RFG*.

La prevalenza dei *RET/PTC* è elevata nei tumori insorti dopo l’incidente nucleare di Chernobyl e nei PTC pediatrici sporadici (40%), mentre nei carcinomi papillari non

radiazione indotti dei pazienti adulti, i RET/PTC si trovano con una frequenza inferiore, del 15-20% circa, ma con una grande variabilità nelle diverse casistiche (dal 5 al 40%).

I riarrangiamenti *RET/PTC* sono considerati eventi precoci nella cancerogenesi tiroidea e sono stati infatti ritrovati con elevata frequenza nel microcarcinoma papillare [45].

➤ ***TRK***

Il gene tirosino-chinasico *NTRK1* mappa sul cromosoma 1q22 e codifica il recettore del *nerve growth factor*. Come il gene *RET*, *NTRK1* va incontro ad attivazione oncogenica mediante riarrangiamento cromosomico. I riarrangiamenti di *NTRK1* sono meno frequenti di quelli di *RET* [46] [47].

1.5.2 Alterazioni molecolari del carcinoma follicolare

La specificità delle lesioni genetiche finora riscontrate suggerisce origini indipendenti del carcinoma papillare e del carcinoma follicolare.

Esistono chiare evidenze genetiche e numerose evidenze cliniche a supporto del concetto che il carcinoma follicolare rappresenti la progressione dell'adenoma follicolare.

Le più frequenti alterazioni genetiche dei carcinomi follicolari includono le mutazioni puntiformi di *RAS* e il riarrangiamento *PAX8-PPAR γ* . Poco frequenti sono invece le mutazioni di geni codificanti le proteine della via di segnale *PI3K/AKT*.

<i>Frequenza delle alterazioni genetiche nel FTC</i> [6]	
<i>RAS</i>	45%
<i>PAX8-PPARγ</i>	35%
<i>PIK3CA</i>	<10%
<i>PTEN</i>	< 5%

➤ ***RAS***

I geni *RAS* (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) codificano per fattori associati a proteine G importanti nella traduzione intracellulare di segnali provenienti da recettori di membrana, soprattutto tirosino-chinasici. Nel suo stato inattivo, la proteina RAS è legata al guanosin-difosfato (GDP), dopo l'attivazione rilascia il GDP e lega il guanosin-trifosfato (GTP), attivando le MAPK e altre cascate intracellulari, come PI3K/AKT.

Fisiologicamente la proteina attivata RAS-GTP viene rapidamente inattivata grazie alla sua intrinseca attività GTP-asi e all'azione di proteine citoplasmatiche attivanti la GTP-asi.

Mutazioni puntiformi del gene *RAS* sembrerebbero aumentare l'affinità per GTP (mutazioni nei codoni 12 e 13) o inattivare la sua funzione GTP-asi auto catalitica (mutazione nel codone 61). In questo modo la proteina mutata si trova costitutivamente nella posizione attiva.

A differenza di BRAF e RET/PTC, specifiche del carcinoma papillare, le mutazioni di RAS sono riscontrate in una piccola parte di carcinomi papillari, negli adenomi follicolari, nei carcinomi follicolari e nei carcinoma anaplastico.

Anche nel caso di RAS, le mutazioni sembrano rappresentare un evento precoce nella cancerogenesi tiroidea [48].

➤ ***PAX8-PPAR γ***

Il riarrangiamento PAX8-PPAR γ deriva dalla traslocazione t(2;3)(q13;p25), con fusione del gene *PAX8* con il gene *PPAR γ* e con la formazione di una proteina PFP.

PAX8 codifica per un fattore di trascrizione espresso nei tireociti e necessario per l'espressione di molti geni tiroidespecifici.

PPAR γ appartiene alla famiglia dei recettori nucleari PPAR, è un gene ubiquitario e codifica per un fattore di trascrizione che regola la differenziazione cellulare e il metabolismo lipidico.

Il riarrangiamento PAX8-PPAR γ si trova nel 35-45% dei carcinomi follicolari, nel 4-33% degli adenomi follicolari e, raramente nei carcinomi oncocitari.

1.5.3 Alterazioni molecolari del carcinoma anaplastico

La principale alterazione molecolare a carico del carcinoma indifferenziato è l'inattivazione del gene oncosoppressore *p53*. È dunque altamente probabile che sia proprio il deficit di *p53*, combinato a mutazioni di oncogeni quali RAS e BRAF, a determinare l'alto indice proliferativo e l'alta aggressività di questo tumore.

Inoltre, si riscontrano modificazioni a carico della regolazione della β -catenina e attivazione della via PI3K-AKT.

<i>Frequenza delle alterazioni genetiche nel UTC [6]</i>	
TP53	70%
β -catenina (<i>CTNNB1</i>)	65%
RAS	55%
BRAF	20%

➤ *Alterazioni della via PI3K/Akt*

La cascata PI3K/Akt ha un ruolo importante nella regolazione della crescita, della proliferazione, della sopravvivenza cellulare, motilità cellulare e *up-take* del glucosio.

L'attivazione aberrante della via fosfatidil-inositolo-3 chinasi/Akt gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi tiroidea, in particolare nel carcinoma follicolare della tiroide (FTC) e nelle neoplasie tiroidee più aggressive, come ad esempio il carcinoma anaplastico (ATC) [49].

Le principali alterazioni genetiche nella via PI3K/Akt includono mutazioni e amplificazioni geniche di PIK3CA (gene codificante la subunità α catalitica della PI3K), mutazioni di RAS, mutazioni di PTEN, riarrangiamenti di RET/PTC e PAX8/PPAR γ , così come amplificazioni di PDK1 (proteina attivata in seguito

all'attività di PI3K che a sua volta fosforila Akt), Akt e vari geni di recettori tirosin-chinasici.

La maggior parte di queste alterazioni genetiche si riscontrano nei carcinomi follicolari e, principalmente, nel carcinoma anaplastico; sono tuttavia meno frequenti nel carcinoma papillare, nel quale è l'attivazione della via MAPK a giocare un ruolo cruciale nella trasformazione cellulare e quindi nell'insorgenza del tumore.

Il gene *tumor-suppressor* PTEN, che codifica per una fosfatasi che converte il PIP3 (fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato) in PIP2 (fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato), è il principale regolatore negativo della via PI3K/Akt.

Delezioni in emizigosi sono state ritrovate nel 20-30% degli adenomi follicolari, PTC e FTC e in quasi il 60% dei carcinomi indifferenziati [50].

PTEN è stato anche trovato inattivato per ipermetilazione del promotore in adenomi follicolari, e con elevata frequenza in PTC e FTC, indicando ulteriormente un possibile ruolo nella tumorigenesi tiroidea [51].

Mutazioni puntiformi o modifiche nel numero di copie del gene di PI3KCA si riscontrano, invece, in circa il 23% dei tumori tiroidei anaplastici [52]. In quest'ultimo istotipo tumorale, inoltre, è stata riscontrata la contemporanea presenza di mutazioni a carico di effettori delle vie di trasduzione del segnale di PI3K e MAPK [52] [53].

L'accumulo di multiple alterazioni genetiche che attivano entrambe le vie promuove l'aggressività del carcinoma tiroideo e la progressione verso neoplasie più aggressive, come il carcinoma anaplastico.

1.6 TERAPIE MOLECOLARI E NUOVI FARMACI

Sebbene la prognosi dei carcinomi tiroidei è ottima nella maggior parte dei pazienti, in alcuni casi gli strumenti terapeutici tradizionali, quali la chirurgia, la terapia radiometabolica, la chemioterapia e la radioterapia, risultano essere scarsamente efficaci, e la prognosi diventa sfavorevole.

Negli ultimi anni la ricerca in campo oncologico ha concentrato i suoi sforzi nell'identificazione dei meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi e progressione tumorale al fine di sviluppare terapie molecolari mirate.

Su queste basi si fonda la cosiddetta terapia a bersaglio molecolare, “*target therapy*”.

Il termine terapia a bersaglio molecolare indica l'utilizzo di farmaci in grado di agire selettivamente su precisi bersagli molecolari coinvolti nei processi di crescita, sopravvivenza, invasione e metastasi tumorale e nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni che nutrono il tumore (neoangiogenesi).

Le caratteristiche che contraddistinguono queste nuove strategie terapeutiche sono:

1. Selettività di azione su particolari bersagli delle cellule tumorali;
2. Selettività di azione su una precisa tipologia tumorale;
3. Azione assente o limitata sulle cellule sane con conseguente minore profilo di tossicità (effetti collaterali minori), anche nel caso di impiego prolungato nel tempo;
4. Possibilità di somministrazione per via orale, mantenendo il paziente in regime ambulatoriale.

Si evince come i tumori tiroidei possano essere un terreno fertile nel quale sviluppare approcci terapeutici di questo tipo. Nonostante lo scenario sia ancora largamente incompleto, oggi si conoscono lesioni geniche frequenti nei PTC (RET/PTC e BRAF), negli FTC (RAS e PAX8-PPAR γ) e negli ATC (BRAF, RAS e p53).

Diversi classi di farmaci hanno superato la fase preclinica e sono in fase di sperimentazione in soggetti affetti da carcinoma differenziato della tiroide localmente avanzato o metastatico, non responsivo al trattamento con iodio radioattivo (^{131}I) [54] [55]. (Tab.1).

<u>Classe</u>	<u>Bersagli</u>	<u>Farmaci</u>
Farmaci anti-angiogenici (inibitori di chinasi)	VEGF-R PDGF-R	Sorafenib, Axitinib, Motesanib, Pazopanib, Sunitinib, Vandetanib
Inibitori di vie di trasmissione del segnale	Via RAS-RAF-MEK Via EGF-R	Sorafenib, AZD Gefitinib

Inibitore dell'istone deacetilasi	Acetilazione degli istoni	Vorinostat (SAHA) Romidepsin (Depsipeptide)
Agenti demetilanti	Metilazione del DNA	Decitabina
Inibitori ciclo-ossigenasi (COX)	COX-2	Celecoxib
Immunomodulazione	Infiammazione, angiogenesi	Talidomide, Lenalidomide
Antibiotici (Ansamycine)	Heat shock protein 90	17-AAG
Inibitori del proteosoma	Proteosoma	Bortezomib
Chemioterapia citotossica	Alchilazione del DNA o antimetaboliti	Irofulven, Capecitabina

Tabella 1 – Classi di farmaci e bersagli molecolari per il trattamento del carcinoma differenziato della tiroide non responsivo alle terapie tradizionali

Grazie alla loro azione selettiva, questi trattamenti mirati sono capaci di indurre minori effetti indesiderati sui tessuti normali rispetto alle terapie convenzionali. La loro efficacia selettiva sulle cellule tumorali deriva anche dal fatto che nelle cellule tumorali un determinato oncogene può svolgere un ruolo di importanza fondamentale e qualitativamente differente rispetto al suo ruolo svolto nelle cellule normali. In altre parole, le cellule tumorali possono risultare maggiormente dipendenti dall'attività di uno specifico oncogene rispetto alle cellule normali, e quindi più sensibili a trattamenti mirati contro quell'oncogene specifico [76][77]. Tuttavia, si è visto che alcuni tumori possono “sfuggire” al fenomeno dell'oncogene addiction (ovvero dipendenza delle cellule tumorali da uno o più geni per il mantenimento del loro fenotipo maligno e della loro sopravvivenza). E ciò, presumibilmente, potrebbe essere dovuto all'instabilità genomica dei tumori, alla loro eterogeneità o alle alterazioni epigenetiche (p.e. metilazione del DNA, cambiamenti della struttura cromatinica....) che portano ad un differente profilo di espressione genica [77].

Non è ancora chiaro se il fenomeno di “fuga” dalla dipendenza da un primo oncogene porti all’acquisizione di dipendenza da un secondo oncogene o allo sviluppo di una popolazione di cellule tumorali non più dipendenti. Per tale ragione, e dato che i tumori spesso presentano contemporaneamente mutazioni a carico di più geni, è improbabile che l’utilizzo di un solo farmaco a bersaglio molecolare risulti clinicamente efficace. Pertanto, si è reso necessario lo sviluppo di terapie mirate multiple (multi-targeted therapies), in grado di agire contemporaneamente su più bersagli molecolari, al fine di ottenere un’inibizione ottimale della crescita tumorale [62].

Alla luce di tali osservazioni, data l’importanza di MAPK, PI3-K ed mTOR nella patogenesi di numerosi tumori umani, compreso quello della tiroide, oggi sono stati disegnati farmaci mirati verso le oncoproteine di tali cascate di segnale o dei loro effettori in grado di indurre la morte delle cellule neoplastiche, in modo specifico e selettivo.

Ad oggi tuttavia la scelta del migliore agente farmacologico a bersaglio molecolare mirato o della più appropriata terapia farmacologica mirata multipla per uno specifico paziente oncologico risulta ancora prettamente empirica. Da qui la necessità di effettuare ulteriori studi molecolari, sia *in vitro* che *in vivo*, al fine di meglio identificare le vie di trasduzione del segnale ed i fattori coinvolti nel fenomeno dell’oncogene addiction nei vari tumori umani.

L’applicazione di tali tecnologie mirate, applicate su alterazioni genetiche specifiche, potrebbe rivelarsi vincente nella lotta contro le malattie tumorali, in quanto potrebbe consentire una terapia specifica, selettiva e sempre più personalizzata.

1.7 FATTORI DI CRESCITA E CANCRO

Abbiamo già detto che, lo sviluppo di tumori maligni è il risultato di una serie di eventi genetici ed epigenetici (*loss of function* di geni oncosoppressori, attivazione di oncogeni, traslocazioni, ipermetilazione, etc) che colpiscono una singola cellula conferendole un vantaggio fenotipico. La selezione delle cellule tumorali nei confronti dei tessuti sani avviene, ad esempio, grazie ad una incrementata proliferazione, ad una ridotta apoptosi o ad inibizione del processo differenziativo. Le cellule dotate di queste caratteristiche e di una maggiore aggressività sono quindi in grado di colonizzare diversi

siti anatomici portando alla formazione di una massa tumorale ed eventualmente di metastasi.

In condizioni fisiologiche, i processi di crescita, differenziamento, migrazione e apoptosi sono finemente regolati da diversi fattori di crescita che agiscono da modulatori positivi o negativi di tali fenomeni. Tali molecole si legano a specifici recettori di membrana innescando una cascata di trasduzione del segnale che in ultima analisi comporta l'attivazione o la repressione dell'espressione di una serie di geni bersaglio.

Molti fattori di crescita noti (EGF, FGFs, PDGFs e IGFs ad esempio) si legano a recettori di membrana dotati di un'intrinseca attività tirosin-chinasica. In seguito al legame del ligando, si ha un cambiamento conformazionale che permette l'attivazione del recettore e della sua via di segnalazione.

I recettori per i fattori di crescita nonché i fattori stessi e le relative vie di trasduzione del segnale possono essere frequentemente coinvolti nel meccanismo di trasformazione neoplastica. Molti oncogeni sono essi stessi recettori per fattori di crescita oppure sono molecole in grado di modularne l'attività in maniera diretta, legandosi ad essi modificandone lo stato fosforilativo, o in maniera indiretta, influenzandone la sintesi. Alternativamente possono intervenire mutazioni, attivatorie o inibitorie, a carico dei mediatori e dei regolatori del segnale (ad esempio Ras o PTEN).

L'analisi e la definizione di tali meccanismi è quindi fondamentale per meglio caratterizzare il processo di trasformazione neoplastica al fine di identificare molecole su cui sviluppare terapie bersaglio specifiche da utilizzare in combinazione ai convenzionali trattamenti chemioterapici e radioterapici.

Nel presente lavoro, abbiamo focalizzato la nostra attenzione in due sistemi che si è visto essere coinvolti nella patogenesi del tumore tiroideo:

- Il sistema IGF;
- Il sistema EGF

1.7.1 Il sistema IGF

La famiglia dell'Insulin-like Growth Factor (IGF) comprende tre ligandi (IGF-I, IGF-II e insulina), tre recettori di membrana (IGF-1R, IGF-2R e *Insulin Receptor* (InsR)) e sei

diverse *IGF binding proteins* (IGF-BPs), che contribuiscono alla veicolazione e al mantenimento dell'equilibrio di IGFs nei vari tessuti bersagli (Figura 3). Recentemente è stata poi evidenziata la presenza di un nuovo recettore ibrido formato da una subunità α - β di InsR e una subunità α - β di IGF-1R (HybridR), il cui ruolo biologico è tuttora poco conosciuto.

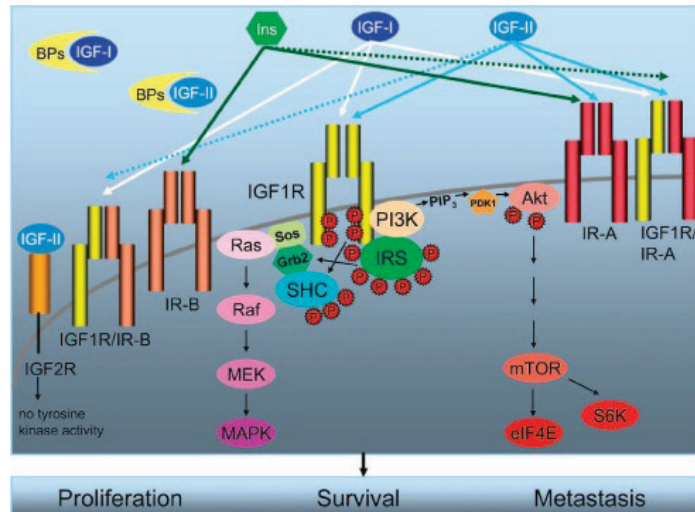


Figura 3. I componenti del sistema IGF. Insulina, IGF-I e IGF-II interagiscono con diversa affinità con i recettori InsR, IGF-1R e HybridRs attivandone la cascata di trasduzione del segnale. IGF-2R e le IGF-BPs regolano la disponibilità di IGF-I e IGF-II. [78]

La maggior parte degli studi sinora condotti attribuiscono ad IGF-1R un ruolo fondamentale nella crescita tissutale e nello sviluppo [79], mentre conferiscono all'attivazione di InsR da parte dell'insulina un ruolo nel controllo dell'omeostasi del glucosio. Dati ottenuti con tecniche di delezione gene specifica evidenziano come in realtà ci sia una parziale sovrapposizione tra le funzioni dei due recettori, con InsR capace di stimolare la proliferazione [80] e IGF-1R in grado di regolare la risposta metabolica [81]. Tali studi mostrano inoltre come sia necessaria la corretta espressione di entrambi i recettori per poter avere un corretto sviluppo embrionale. I due recettori non sono quindi in grado di sostituirsi reciprocamente e la loro contemporanea espressione è quindi necessaria per avere una corretta regolazione dei numerosi processi biologici controllati quali proliferazione, migrazione, apoptosi nonché metabolismo. Il recettore per IGF-I è un recettore ad attività tirosin-chinasica espresso in maniera ubiquitaria nei diversi tessuti e coinvolto nella regolazione di diversi processi biologici quali sviluppo, proliferazione, apoptosi, migrazione e farmaco resistenza.

Il gene codificante IGF-1R si trova sul cromosoma 15q25-26 [82] su una regione di DNA genomico di dimensioni superiori a 100 kb e contenente 21 esoni. La regione che comprende gli esoni 1-3 codifica per il peptide segnale, per la regione N-terminale e per il dominio ricco in cisteina della subunità α ; la restante parte della subunità α è codificata dagli esoni 4-10; il sito di taglio che genera le subunità α e β a partire dal peptide precursore si trova nell'esone 11; la regione tra gli esoni 16 e 20 codifica per il dominio tirosin-chinasico presente nella regione β . Il cDNA di *IGFIR* è costituito da 4104 nucleotidi e origina un precursore proteico di 1367 aminoacidi. Dopo la rimozione del peptide segnale acido di 30aa, i restanti 1337aa sono ulteriormente processati da un'endopeptidasi sul sito Arg-Lys-Arg-Arg tra i residui 707 e 710. Il propeptide viene quindi glicosilato, dimerizzato e trasportato al Golgi dove viene ulteriormente tagliato dall'enzima furina in subunità α e β . Attraverso la formazione di ponti disolfuro, tali subunità vanno quindi ad assemblarsi in un eterotetramero β - α - α - β che può quindi essere trasportato sulla membrana plasmatica.

Tale processo è fortemente dipendente da N-glicosilazione [83].

Il recettore di membrana maturo consiste di 2 catene α extracellulari di 130/135 kDa e 2 catene β transmembrana di 90-95 kDa, unite da diversi ponti disolfuro α - α e α - β . La subunità α , costituita da 706aa, contiene una regione ricca in cisteine (aa 148-302) e rappresenta il sito di legame per i diversi ligandi. IGF-1R è infatti in grado di legare sia IGF-I che IGF-II, con un'affinità che è circa 3-4 volte superiore nel caso di IGF-I ($EC_{50} = 0.2 \pm 0.3$ nM e 0.6 ± 1 nM rispettivamente) [84]. La subunità β , 627aa, permette la trasduzione del segnale in seguito a legame del fattore e conseguente attivazione del recettore. E' costituita da una regione extracellulare di 196aa in cui sono contenuti i 5 potenziali siti di glicosilazione, una porzione idrofobica transmembrana (aa 906-929) e una porzione intracellulare in cui si trovano i domini coinvolti nella trasmissione del segnale tra cui il dominio juxtamembrana, il dominio tirosin-chinasico (TK), contenente il sito di legame per l'ATP, e la porzione C-terminale.

I diversi domini svolgono un ruolo specifico nei processi di segnalazione intracellulare con regolazione di mitogenesi e migrazione affidata al dominio TK e capacità trasformante, nonché regolazione dell'attività metastatica, affidata al dominio C-terminale [83].

Alterazione a carico del sistema IGF sono responsabili di diverse condizioni patologiche quali ad esempio diabete e acromegalia. Modificazioni importanti sono poi state osservate anche nei tumori compreso quello tiroideo. Nostre precedenti evidenze

sperimentali, hanno infatti mostrato che le cellule tumorali tiroidee, comprese quelle derivanti dalla forma più aggressiva di carcinoma tiroideo (cioè il tumore anaplastico), sono responsive all'insulina e ai fattori insulino-simili (IGF-I e IGF-II), spesso iperesprimono IR ed IGF-IR e producono in modo autocrino IGF-II. Questi risultati supportano il ruolo chiave di IGFs nella tumorigenesi tiroidea.

A causa del suo ruolo permissivo nella trasformazione cellulare e della sua alterata espressione in numerosi tumori, IGF-IR è considerato un eccellente bersaglio molecolare per le terapie anti-neoplastiche incluse quelle rivolte contro il carcinoma tiroideo.

Diverse tecniche sono state utilizzate nel corso degli anni al fine di inibire IGF-1R e/o la sua via di segnalazione. In passato è stata quindi valutata la possibilità di inibire IGF-I/IGF-II attraverso IGF-BPs o anticorpi neutralizzanti. Questi approcci presentano però una valenza clinica limitata dalla continua produzione fisiologica di tali fattori ma soprattutto dallo sviluppo di meccanismi autocrini da parte delle cellule tumorali che riescono quindi a sfuggire o compensare a tale inibizione.

Gli approcci più promettenti risultano quindi essere quelli diretti a inibire IGF-1R e la sua cascata di trasduzione del segnale.

Uno dei primi approcci biologici utilizzati per bloccare il circuito mediato da IGF-1R utilizzava anticorpi monoclonali diretti contro la porzione extracellulare del recettore. In seguito si è invece pensato di inibire la trasduzione del segnale mediante piccoli inibitori.

I piccoli inibitori sono molecole che agiscono inibendo l'attività tirosinchinasica di un recettore, legandosi al sito di legame per l'ATP o al sito di legame per i substrati, o impedendo il legame del substrato al recettore attivato.

Tra i piccoli inibitori in grado di inibire IGF-1R si distinguono principalmente due categorie: antagonisti dell'ATP (ad esempio tirfostine e derivati delle pirrolo pirimidine) e non antagonisti (ciclolignani).

Tra i primi si hanno le tirfostine, molecole sintetiche dotate di una scarsa specificità per IGF-1R [85]. Vista la scarsa stabilità delle tirfostine sono stati creati dei catecoli bioisosteri di tali molecole. I catecoli agiscono come competitori del substrato e si sono dimostrati in grado di inibire la cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R e la proliferazione *in vitro* di cellule di tumore al seno e alla prostata [86]. Tali molecole presentano però cross-reattività con InsR [86].

Un'altra classe di antagonisti dell'ATP è rappresentata dai derivati delle pirrolo pirimidine. Tra questi, due inibitori promettenti sono stati sviluppati recentemente dalla Novartis Pharma: NVP-ADW742 [87] e NVP-AEW541 [88], oggetto di questo studio.

Tali molecole presentano un elevato grado di specificità per IGF-1R: in saggi cellulari di autofosforilazione mostrano una selettività 10-50 volte superiore per IGF-1R rispetto a InsR in contrapposizione ai risultati ottenuti mediante l'uso di saggi biochimici che hanno evidenziato un effetto comparabile su IGF-1R e su InsR ($IC_{50} > 200$ nM) [87] [78]. Considerando l'effetto inibitorio mostrato da queste molecole su fibrosarcoma e mieloma, l'eventuale aspecificità di azione non sembra interferire con l'azione anti tumorale del farmaco ma potrebbe al contrario potenziarla.

Tra gli inibitori di IGF-1R che non competono con ATP si hanno i ciclolignani, in particolare la picropodofilina (PPP). PPP inibisce selettivamente la fosforilazione della Tyr1136 di IGF-1R in cellule di melanoma, inibendone inoltre la capacità proliferativa *in vivo* [89]. Questo farmaco induce inoltre la regressione tumorale e inibisce la formazione di metastasi in diversi modelli tumorali, senza però indurre un'elevata farmaco resistenza dopo trattamento prolungato [89].

1.7.2 Il sistema EGF/EGFR

L' "epidermal growth factor receptor" (EGFR o ErbB1 o HER1) è codificato da un gene localizzato sul cr 7p11-13. Questo recettore lega i membri della "EGF family", una famiglia di proteine-ligando extracellulari.

L'EGFR appartiene alla famiglia degli ErbB, quattro recettori tirosinchinasici strutturalmente simili: ErbB-1(o EGFR o HER1), ErbB-2 (o HER2 negli umani e nei roditori), ErbB-3 (o HER3), ErbB-4 (o HER4). Il gene simbolo, "ErbB, deriva dal nome di un oncogene virale a cui questi recettori sono omologhi: "Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene". Strutturalmente i recettori ErbB sono costituiti da un dominio extracellulare (consistente approssimativamente di 620 residui amminoacidici), un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico ad attività tirosinchinasica. Il dominio extracellulare di ogni recettore membro della famiglia presenta 4 subdomini, L1, CR1, L2 e CR2, dove "L" sta per "regione ricca in leucina" e "CR" "regione ricca in cisteina" (vedi figura 4).

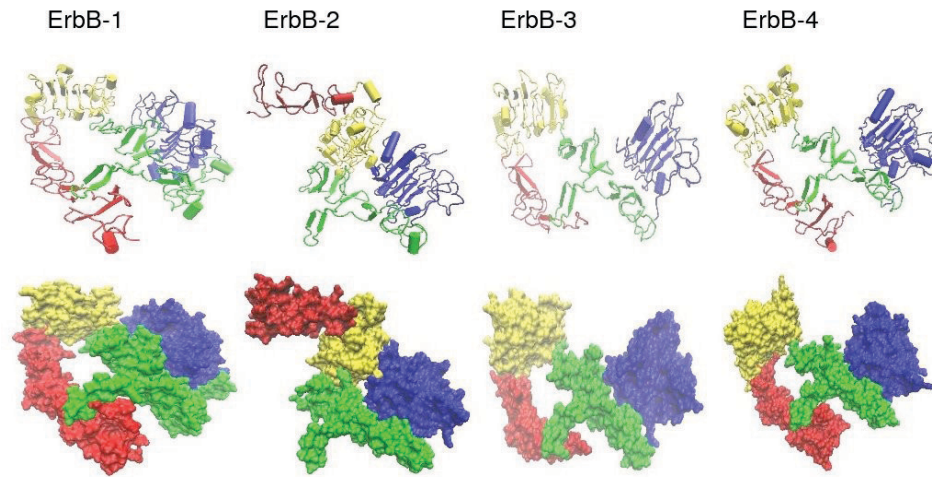


Figura 4: *Struttura dei domini extracellulari dei recettori ErbB.*

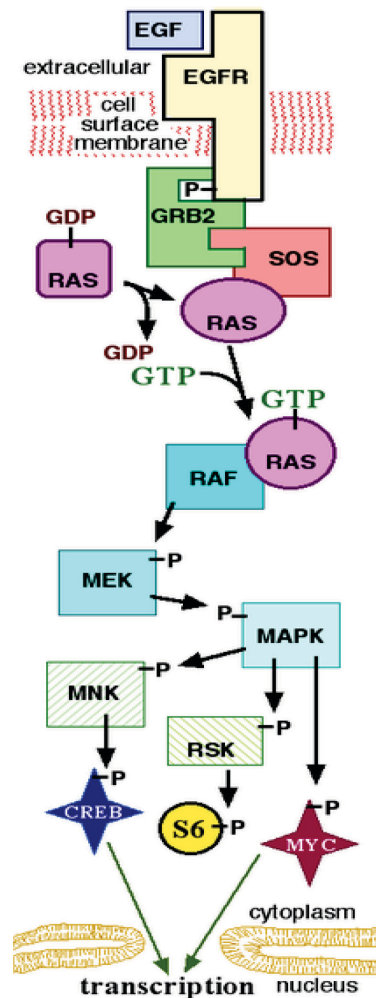
(Il subdominio L1 di ogni recettore è colorato in blu, il CR1 in verde, l'L2 in giallo ed il CR2 in rosso.)

In generale esistono almeno undici diversi fattori di crescita in grado di attivare gli ErbB receptors; in particolare EGF, TGF- α , HB-EGF, amphiregulin, betacellulin, epigen ed epiregulin sono specifici per ErbB1 (vedi tabella).

<i>Ligando</i>	<i>Recettore</i>			
	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
EGF	+	-	-	-
TGF- α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
amphiregulin	+	-	-	-
betacellulin	+	-	-	+
epigen	+	-	-	-
epiregulin	+	-	-	+
neuregulin 1	-	-	+	+
neuregulin 2	-	-	+	+
neuregulin 3	-	-	-	+
neuregulin 4	-	-	-	+

EGFR, attivato dai suoi specifici ligandi, subisce una transizione da una forma monometrica “inattiva” ad una forma omodimerica “attiva”. Comunque, oltre a formare omodimeri, una volta attivato da specifici fattori di crescita, EGFR può fare coppia con gli altri membri della “EGFR family”, per esempio ErbB2/Her2/neu, con la formazione di un eterodimero attivo. La dimerizzazione del recettore stimola la sua attività tirosinchinasica intrinseca che porta alla autofosforilazione di vari residui tirosinici situati nel dominio C-terminale: tra questi si annoverano Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173. Questa autofosforilazione determina l’attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale (principalmente “MAPK, Akt e JNK pathways”) attraverso l’attivazione di specifiche proteine segnalanti che si associano con le tirosine fosforilate del recettore mediante il loro dominio SH2 e dunque trasducono il segnale. Tale processo a cascata porta alla sintesi di nuovo DNA e alla proliferazione cellulare (vedi figura 5).

Figura 5: *Meccanismo di attivazione della MAPK pathway.*



E' ampiamente noto che mutazioni dell'EGFR portano ad una attivazione costitutiva del recettore che esita in una divisione cellulare incontrollata predisponente alle neoplasie. Infatti, diverse mutazioni attivanti dell'EGFR sono state identificate in una serie di neoplasie (tumori di mammella, polmone, colon, ovaie e SNC). Pertanto l'EGF-R rappresenta oggi uno dei target della terapia anticancro. In particolare Cetuximab e Panitumumab sono esempi di anticorpi monoclonali che agiscono bloccando il dominio di legame extracellulare dell'EGFR (altri anticorpi monoclonali in sviluppo clinico sono Zalutumumab, Nimotuzumab e Matuzumab); un altro approccio terapeutico è quello di usare piccole molecole che inibiscono la tirosin-chinasi del recettore localizzata nel dominio citoplasmatico dello stesso: Gefitinib (IRESSA) che sarà oggetto del nostro studio, Erlotinib (TARCEVA) e Lapatinib sono esempi di inibitori tirosinchinasici [90-91].

EGF-R nel carcinoma tiroideo: Studi precedenti hanno valutato l'espressione dell'EGFR nei carcinomi tiroidei poco differenziati e anaplasici (ATC). Questi studi effettuati sia "in vitro" in linee cellulari che "in vivo" su campioni di tessuto tiroideo di topo e umani, hanno dimostrato che negli ATC l'EGFR è iperespresso. Gli autori di questo studio hanno poi testato la efficacia del Gefitinib (IRESSA) in cellule di carcinoma della tiroide e hanno trovato che il Gefitinib inibisce la proliferazione cellulare e induce l'apoptosi. E' importante dire che, alcuni lavori dicono che nelle linee cellulari di ATC testate l'EGFR (sebbene iperespresso) è fosforilato solo dopo stimolazione con EGF. Altri dati invece indicano che l'EGFR è costitutivamente attivo nella gran parte di linee cellulari di ATC [61]. Un ulteriore studio ha messo in evidenza il ruolo dell'EGFR nella regolazione della "invasività" dei carcinomi tiroidei. Infatti gli autori dello studio hanno osservato che l'attivazione dell'EGFR stimola l'invasività cellulare attraverso un aumento di espressione e di clivaggio delle MMPs (matrix metalloproteinasi). Lo studio ha altresì dimostrato che, nei carcinomi papillari, l'attivazione di MMP-2 e la espressione di MT1-MMP correlano significativamente con la presenza di metastasi linfonodali [92]. Oltre all'espressione dell'EGF-R nei carcinomi della tiroide è stata studiata anche la sequenza. In uno studio, il sequenziamento di ben 62 campioni di carcinoma tiroideo, ha permesso di individuare specifiche mutazioni dell'EGFR in 2 dei campioni: una mutazione, consistente nella sostituzione di una guanina con una adenina (G2500A) nel codone 864 dell'esone 21 del gene e risultante nella sostituzione di una metionina con una valina, è stata trovata in

un campione di carcinoma papillare in stadio I e proveniente da una paziente di 24 anni; l'altra mutazione, consistente nella sostituzione di una adenina con una guanina (A2038G) nel codone 695 dell'esone 18 del gene e risultante nella sostituzione di una glicina con una serina, è stata trovata in un campione di carcinoma papillare in stadio III e proveniente da una paziente di 56 anni [93-95]. Nonostante questi dati di letteratura, i meccanismi con cui l'inibizione dell'EGF-R agisce sul fenotipo trasformato del carcinoma tiroideo poco differenziato non sono ancora noti. Non sono inoltre noti i meccanismi responsabili della sensibilità/resistenza delle cellule di Ca tiroideo al Gefitinib.

CAPITOLO 2 – SCOPO DEL LAVORO

Questa tesi si è articolata in due progetti che hanno visto come oggetto di studio: il sistema EGF ed il sistema IGF.

PROGETTO 1: Valutare gli effetti dell'inibizione del recettore dell'EGF da parte del Gefitinib sul fenotipo trasformato del carcinoma tiroideo poco differenziato. Valutare inoltre i meccanismi responsabili della resistenza al Gefitinib in queste cellule.

PROGETTO 2: Ci proponiamo, infine, di valutare l'azione antitumorale dell'NVP-AEW541 in linee cellulari tumorali tiroidee ed i fattori che possono influenzarne l'efficacia terapeutica. Considerato che l'isoforma A del recettore insulinico (IR-A) ed il recettore per EGF (EGF-R) sono entrambi iperespressi nei tumori tiroidei e possono indurre resistenza a terapie oncologiche, comprese quelle a bersaglio molecolare, focalizzeremo la nostra ricerca su questi recettori e sulle vie di segnale a valle di essi. Il nostro studio avrà come obiettivo quello di individuare eventuali modulatori dell'efficacia antitumorale dell'NVP-AEW541 in modo da utilizzarli come possibili bersagli molecolari per migliorare l'effetto terapeutico dell'inibitore farmacologico di IGF-IR.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 LINEE CELLULARI

Sono state utilizzate otto diverse linee cellulari:

- linee cellulari di carcinoma papillare tiroideo TPC-1 e BC-PAP fornite dai Dott. A. Fusco e M. Santoro (Università di Napoli);
- le linee cellulari di carcinoma anaplastico tiroideo SW1736, Hth-74 e C-643 fornite dal Dott. N.E. Heldin (Uppsala, Svezia);
- linea cellulare di carcinoma anaplastico tiroideo FF-1, creata nel nostro laboratorio; e la linea cellulare di carcinoma anaplastico tiroideo 8305-C acquistata presso l'EACC (Salisbury, UK);
- carcinoma follicolare tiroideo FTC-133 acquistata, anch'essa presso l'EACC (Salisbury, UK).

Eccetto la linea cellulare di carcinoma follicolare FTC-133, tutte le suddette linee sono state coltivate in mezzo RPMI 1640 con l'aggiunta di 2mM glutamina, 10% di FBS (Fetal Bovine Serum) e 100 µ/ml di penicillina e streptomina (per prevenire una eventuale contaminazione). La linea cellulare di carcinoma follicolare tiroideo FTC-133 invece è stata coltivata in DMEM F-12 integrato con FBS ed antibiotici come descritto sopra.

3.2 MATERIALI

Sono stati utilizzati vari inibitori, tra cui: l'inibitore del recettore tirosinchinasico EGFR Gefitinib (IRESSA, ZD1839), l'inibitore del BRAF PLX4032, il Regorafenib inibitore dell'N-RAS tutti acquistati alla Sellek (Houston, TX, Stati Uniti). Per il secondo progetto sono stati utilizzati l'NVP-AEW541 e il PD98059 acquistati anch'essi presso la Sellek (Houston, TX, Stati Uniti).

Gli anticorpi utilizzati per il Western blotting e per le analisi di immunoprecipitazione sono rappresentati da: anticorpi policlonali anti-pEGFR ed anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, CA); anticorpi policlonali anti p-ERK, anti-ERK, anti-pAKT ed anti-

AKT (Cell Signaling Technology Inc., Denver, MA); anticorpi policlonali anti p-IGFIR ed anti-IGFIR (rispettivamente Cell Signaling Technology Inc., Denver, MA e Santa Cruz Biotechnology, CA); anticorpo monoclonale anti-ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology, CA); anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina 4G10 (Lake Placid, NY).

3.3 METODI

3.3.1 Proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante il saggio MTT, un saggio colorimetrico utilizzato per testare l'azione di farmaci, agenti citotossici ed altri prodotti che alterano la vitalità cellulare. Il principio del test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di convertire il sale di tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) o MTT, di colore giallo, in cristalli di formazano di color viola. Il formazano viene quindi solubilizzato e la concentrazione viene calcolata in termini di densità ottica a 405 nm. Il livello di assorbanza è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

Per l'esecuzione del test le cellule ($1,5 \times 10^3$) sono state impiantate in una piastra a 96 pozzetti. Dopo 24 ore (tempo di adesione delle cellule alla superficie dei pozzetti), le cellule sono state trattate per 48 ore con concentrazioni crescenti di Gefitinib o di PLX4032 o in combinazione; le cellule sono state trattate anche con concentrazioni crescenti di NVP-AEW541 da solo o in combinazione con Gefitinib; le cellule infine, sono state trattate anche con Gefitinib da solo o in combinazione con farmaci chemioterapici quali doxorubicina ($2\mu\text{M}$), cisplatino ($5\mu\text{M}$) e taxolo ($5\mu\text{M}$) anche in questo caso per 48 ore. Successivamente nei pozzetti è stato aggiunto l'MTT disciolto in soluzione con PBS e lasciato in incubazione. Dopo circa 3 ore tale soluzione è stata rimossa dai pozzetti ed è stata aggiunta una soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) e mezzo di coltura per dissolvere il formazano colorato prodottosi per riduzione mitocondriale dell'MTT. La densità colorimetrica è stata quindi misurata mediante la lettura del campione allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

3.3.2 Invasività tumorale

La invasività tumorale è stata valutata mediante la metodica della camera di Boyden. Questa tecnica è basata sull'uso di una camera costituita da due compartimenti contenenti un mezzo di coltura e separati da una membrana con micropori; le cellule

sono poste nel compartimento più alto e sono spinte a migrare attraverso i pori della membrana nel compartimento più basso nel quale sono presenti agenti chemiotattici. Dopo un appropriato tempo di incubazione può essere determinato il numero di cellule che è migrato verso la parte più bassa. Nel nostro studio le cellule sono state preincubate con 1 μ M di Gefitinib per 12 ore. Circa 100.000 cellule sono poi state risospese in 200 μ l di mezzo di coltura e poste su filtri (con pori di 8 μ m di diametro) di polibicarbonato dal diametro di 6,5mm e ricoperti sia sul versante superiore sia sul versante inferiore da 1,2 mg/ml di Matrigel che rappresenta un modello in vitro di membrane basali ricostruite. Successivamente nel compartimento più basso è stato aggiunto 1 μ g/ml di EGF in 1 ml di mezzo di coltura. Il tutto è stato incubato a 37°C con 5% di anidride carbonica per 48 ore. A fine incubazione sia le cellule sia il Matrigel posti sul versante superiore del filtro sono stati rimossi con un tampone di cotone. Le cellule migrate nel compartimento più basso sono state fissate con glutaraldeide all'11% per 15 minuti a temperatura ambiente e poi colorate con una soluzione di metanolo al 20% contenente cristal violetto allo 0,1%. Dopo tre lavaggi con acqua e dopo aver ben asciugato il tutto, il cristal violetto è stato solubilizzato mediante l'immersione dei filtri in una soluzione di acido acetico al 10%. La densità colorimetrica del cristal violetto solubilizzato è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 509 nm.

3.3.3 Western Blotting

Le cellule sono state lisate in tampone di lisi RIPA contenente 20mmol/L di Tris-HCL pH 7,5, NaCl 150mmol/L, triton X-100 all'1%, NaF 10mmol/L, EDTA 1mmol/L, EGTA 1mmol/L, miscela di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Sigma, St.Louis, MO). Il contenuto proteico e' stato valutato mediante metodo Bradford (BioRad, Hercules, CA). I campioni, così ottenuti, sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Le proteine di interesse sono state rivelate con anticorpi specifici, mediante il sistema della chemoluminescenza (ECL, Amersham GE Healthcare, British Technology).

3.3.4 Immunoprecipitazione

Per l'immunoprecipitazione le cellule sono state lisate in RIPA. I lisati cellulari così ottenuti sono stati poi incubati a 4 °C sotto rotazione con 4 μ g di anticorpo anti-EGFR preadsorbito su proteina G. Dopo centrifugazione a 1400 rpm per 10 minuti gli immunoprecipitati così ottenuti sono stati incubati con loading buffer e sottoposti a

corsa elettroforetica (SDS-PAGE); le proteine sono poi state trasferite su membrane di nitrocellulosa e quindi “blottate” con l’anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina 4G10 (anticorpo primario) e successivamente individuate tramite la ECL. Successivamente le membrane di nitrocellulosa sono state “strippate” utilizzando un apposito tampone denaturante (Restore) (“striappare” significa rompere il legame tra anticorpo primario e proteina cosicché la membrana sia pronta per poter legare un altro anticorpo) e quindi sottoposte nuovamente a blotting con anticorpo policlonale anti-EGFR onde verificare la quantità di EGF-R totale.

3.3.4 Analisi cellulare mediante citofluorimetria

Gli effetti del Gefitinib sul ciclo cellulare e sulla apoptosi delle cellule di carcinoma tiroideo sono stati valutati mediante analisi FACS (Fluorescence-activated cell sorting analysis). Le linee cellulari in studio sono state prima incubate con 1 µg di Gefitinib per 48 ore. Successivamente per la valutazione del ciclo cellulare, le cellule sono state fissate e permeabilizzate con etanolo puro ed incubate con propidio ioduro (PI) e Rnasi per un’ora a 4°C. Le cellule sono state, successivamente, sottoposte a lettura citofluorimetrica (FACS usando il citofluorimetro Coulter ®EPICS, Beckman) e ad analisi del ciclo cellulare in base al contenuto di DNA (evidenziato mediante colorazione con PI).

La misurazione dell’apoptosi è stata effettuata colorando le cellule intatte con annessina FITC e propidio ioduro; successivamente le cellule sono state sottoposte a citofluorimetria. Le cellule positive per l’annessina sono state considerate in apoptosi precoce, mentre le cellule colorate con sia annessina che PI sono state considerate in apoptosi tardiva.

3.3.5 Analisi statistica

I dati ottenuti sono presentati come media ± SE. La significatività è stata valutata mediante t di Student a due code per dati non appaiati (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). L’analisi statistica è stata svolta grazie all’uso del software Microsoft Excel.

CAPITOLO 4 – RISULTATI: 1° PROGETTO

Il Gefitinib è scarsamente efficace sulle cellule di cancro tiroideo.

La sensibilità delle linee cellulari di carcinoma tiroideo al Gefitinib è stata valutata mediante il saggio MTT (vedi figura 6).

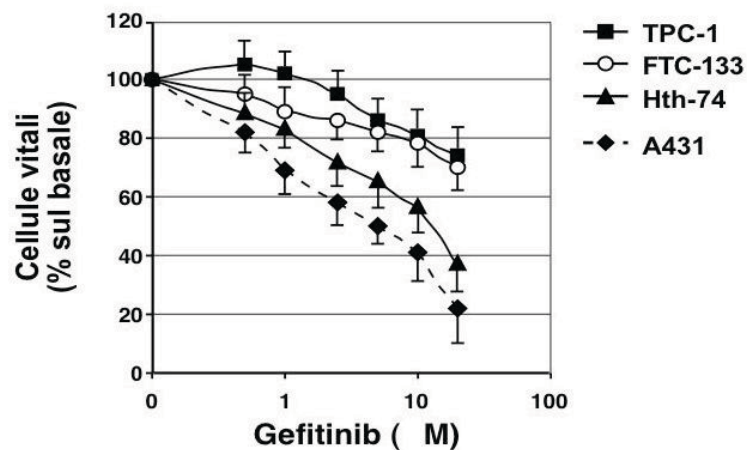
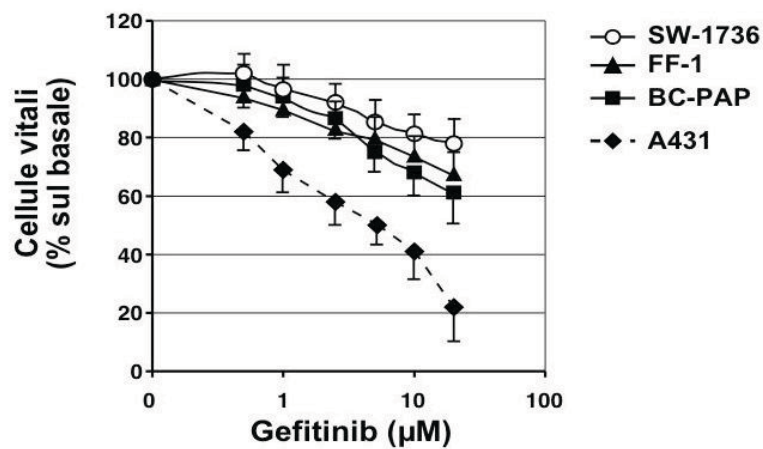
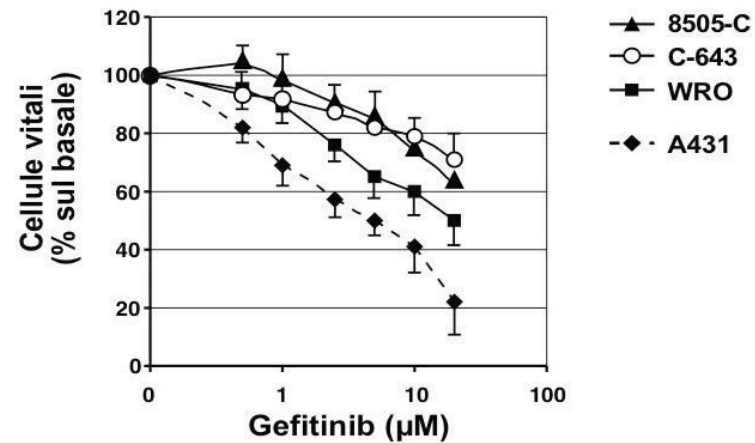


Figura 6. *Effetti del Gefitinib sulla proliferazione delle cellule di carcinoma tiroideo.*

Le linee cellulari indicate sono state impiantate in piastre a 96 pozzetti con dosi crescenti di Gefitinib (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 μ M) per 48 ore. La proliferazione è stata valutata con il saggio MTT. Ogni figura indica la media \pm DS di tre esperimenti diversi eseguiti in quadruplicato.

In questi esperimenti, oltre alle linee cellulari di Ca tiroideo è stata utilizzata una linea di controllo, le A431, le quali esprimono alti livelli di EGFR e sono sensibili al Gefitinib. La figura 10 mostra che il Gefitinib a dosaggi crescenti riduce in maniera consistente (di circa il 40% ad un dosaggio di 10 μ M) il numero di cellule proliferanti nelle linee cellulari WRO e Hth-74 similmente a quanto accade nelle cellule A431. Al contrario, sulle altre linee cellulari il Gefitinib ha un effetto marginale. Questi risultati indicano che, eccetto le linee cellulari WRO e Hth-74, la maggior parte delle cellule di carcinoma tiroideo sono refrattarie al Gefitinib.

Per meglio caratterizzare gli effetti del Gefitinib sulla proliferazione delle cellule di carcinoma tiroideo abbiamo poi anche valutato l'effetto del Gefitinib sulla distribuzione del ciclo cellulare e l'apoptosi mediante analisi citofluorimetriche. Anche in questo caso la linea cellulare A431 è stata utilizzata come controllo positivo: le cellule sono state prima trattate in presenza o assenza di 1 μ M di Gefitinib per 48 ore e successivamente sono state sottoposte ad analisi FACS: la colorazione con il propidio ioduro e le analisi FACS hanno mostrato che il Gefitinib induce un arresto in fase G1 del ciclo cellulare nelle cellule A431, WRO e Hth-74, mentre non ha nessun effetto sulla linea cellulare FTC-133 (vedi figura 7A). La colorazione con l'annessina e le analisi FACS hanno inoltre dimostrato che il Gefitinib è stato in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule A431, WRO e Hth-74 ma, anche in questo caso, il Gefitinib non ha avuto alcun effetto nelle cellule FTC-133 (vedi figura 7B).

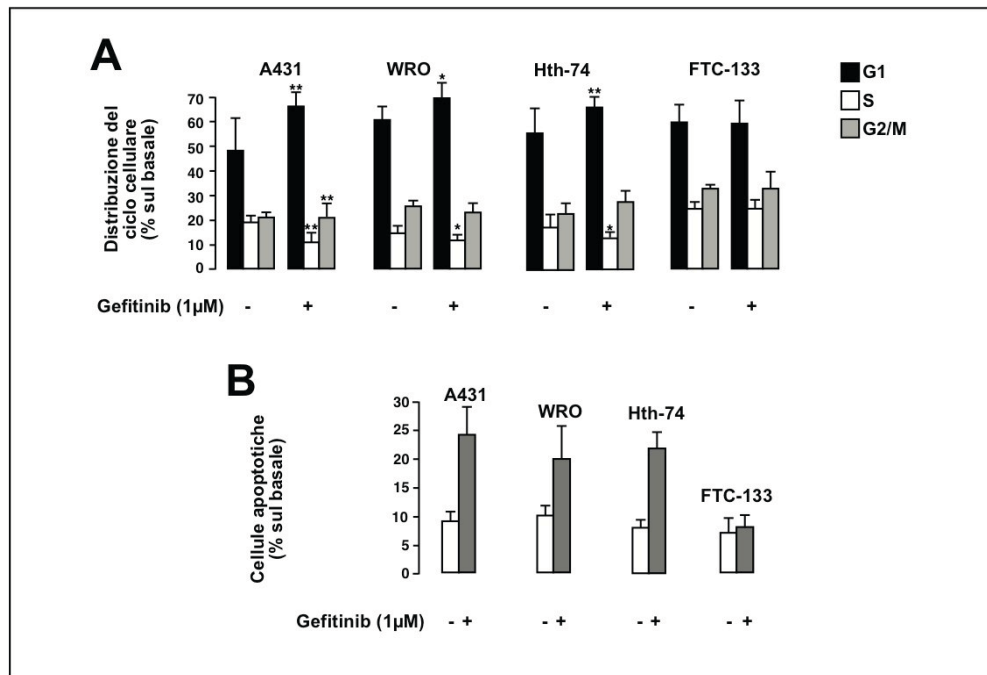


Figura 7. Effetti del Gefitinib sul ciclo cellulare e sulla apoptosi delle cellule di carcinoma tiroideo.

Le linee cellulari indicate sono state incubate con 1µM di Gefitinib per 48 ore. (A) La colorazione con propidio ioduro e analisi FACS della distribuzione del ciclo cellulare. I numeri indicano la percentuale delle cellule totali e rappresentano la media ± DS di tre diversi esperimenti. (B) Colorazione con l'annessina e analisi FACS di cellule apoptotiche. I numeri indicano la percentuale delle cellule totali e rappresentano la media ± DS di tre diversi esperimenti. Le cellule trattate sono state statisticamente confrontate con cellule non trattate (* p< 0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Questi risultati indicano che, in accordo con i risultati del saggio MTT, il Gefitinib è in grado di bloccare il ciclo cellulare e di indurre l'apoptosi solo in alcune cellule di carcinoma tiroideo ma il farmaco ha un effetto minimo in altre linee cellulari. Queste osservazioni suggeriscono che alcune linee cellulari di carcinoma tiroideo possono avere sviluppato meccanismi di resistenza al Gefitinib.

Il Gefitinib aumenta la sensibilità delle cellule di carcinoma tiroideo ai farmaci chemioterapici.

Per esaminare ulteriormente gli effetti del Gefitinib sulla proliferazione delle cellule di carcinoma tiroideo abbiamo cercato di vedere se il Gefitinib potesse essere in grado di incrementare gli effetti citotossici di alcuni dei farmaci chemioterapici utilizzati per il trattamento dei carcinomi tiroidei. A questo fine le cellule sono state trattate con 2 µM di doxorubicina, 5µM di cisplatino o 5 µM di taxolo, sia in presenza sia in assenza di 1

μM di Gefitinib. Il saggio MTT ha mostrato che il Gefitinib ha un effetto sinergico nelle linee cellulari BC-PAP, SW1736 e TPC1 incubate o trattate con doxorubicina, nelle cellule FF1 e WRO trattate con cisplatino e nelle linee cellulari FF1, SW1736, Hth-74 e TPC1 incubate con taxolo (vedi tabella 3).

	Basale	Doxorubicina	Cisplatino	Taxolo
<i>A431</i>				
Basale	100 \pm 3.3	9.6 \pm 19.1	96.4 \pm 4.5	25.9 \pm 11.7
Gefitinib	44.1 \pm 16.0***	5.7 \pm 5.9*	24.2 \pm 4.3***	10.2 \pm 9.1**
<i>FTC-133</i>				
Basale	100 \pm 3.5	39.3 \pm 6.3	28.9 \pm 8.3	51.3 \pm 4.7
Gefitinib	97.1 \pm 2.9	41.9 \pm 4.5	35.5 \pm 13.1	51.67 \pm 6.6
<i>FF-1</i>				
Basale	100 \pm 8.7	13.4 \pm 7.4	26.3 \pm 10.8	52.4 \pm 6.9
Gefitinib	79.3 \pm 8.1**	16.3 \pm 9.7	18.4 \pm 7.8**	44.49 \pm 9.5*
<i>SW-1736</i>				
Basale	100 \pm 9.4	36.5 \pm 5.3	56.7 \pm 9.2	39.0 \pm 6.3
Gefitinib	87.9 \pm 10.2*	34.6 \pm 4.6	48.8 \pm 14.5*	32.6 \pm 7.1*
<i>Hth-74</i>				
Basale	100 \pm 6.4	47.9 \pm 9.1	19.9 \pm 6.9	55.2 \pm 5.5
Gefitinib	45.1 \pm 10.1***	33.2 \pm 6.9**	12.1 \pm 17.3**	36.3 \pm 11.5**
<i>WRO</i>				
Basale	100 \pm 9.5	12.4 \pm 4.8	84.8 \pm 11.2	58.7 \pm 12.0
Gefitinib	46.6 \pm 11.5***	3.5 \pm 4.5**	29.5 \pm 13.7***	21.8 \pm 8.1***
<i>8505-C</i>				
Basale	100 \pm 3.5	28.8 \pm 9.6	78.7 \pm 4.7	27.4 \pm 7.8
Gefitinib	106.1 \pm 4.6	22.9 \pm 6.0	82.8 \pm 5.8	33.9 \pm 2.2
<i>TPC-1</i>				
Basale	100 \pm 4.5	13.8 \pm 13.3	42.7 \pm 9.9	34.3 \pm 11.1
Gefitinib	86.2 \pm 17.4	12.7 \pm 5.3	37.2 \pm 14.2	35.7 \pm 9.6
<i>C-643</i>				
Basale	100 \pm 4.7	102.1 \pm 4.5	49.5 \pm 13.7	51.0 \pm 9.1
Gefitinib	107.2 \pm 3.1	102.5 \pm 6.3	51.9 \pm 12.8	55.8 \pm 10.3
<i>BC-PAP</i>				
Basale	100 \pm 4.9	32.0 \pm 7.8	50.4 \pm 7.4	30.3 \pm 5.2
Gefitinib	90.6 \pm 6.2	29.7 \pm 8.1	46.3 \pm 5.7*	36.2 \pm 19.1

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Tabella 3. *Effetti del Gefitinib in combinazione con altri farmaci sulla proliferazione cellulare.*

Le cellule indicate sono state impiantate in piastre da 96 pozzetti e cresciute in 10% di FBS. Successivamente esse sono state incubate sia in presenza sia in assenza di 1µM di Gefitinib solo o in combinazione o con 2µM di doxorubicina, o con 5µM di cisplatino o con 5 µM di taxolo per 48 ore. La proliferazione è stata quindi valutata con l'MTT Test. Ogni risultato rappresenta la media ± DS di tre diversi esperimenti eseguiti in quadruplicato.

Questi risultati indicano che il Gefitinib è in grado di aumentare l'effetto citotossico di doxorubicina, cisplatino e taxolo anche se in misura diversa nelle differenti linee cellulari. Così, sebbene non molto efficace sulla proliferazione quando usato da solo, il Gefitinib può però rendere sensibili alcune cellule di carcinoma tiroideo ad altri farmaci chemioterapici.

Il Gefitinib inibisce l'invasività cellulare stimolata dall'EGF.

Molte evidenze suggeriscono che la attivazione del recettore per l'EGF ha un ruolo nel determinare l'invasività delle cellule neoplastiche. In questo studio pertanto abbiamo cercato di scoprire se il Gefitinib sia in grado di inibire l'invasività delle cellule di carcinoma tiroideo EGF-indotta utilizzando un sistema ricostruito di membrane basali (matrigel). Tra tutte le linee cellulari a nostra disposizione, sono qui state utilizzate solo le cellule TPC1, 8305-C e BC-PAP in quanto scarsamente sensibili agli effetti del Gefitinib sulla proliferazione cellulare. Abbiamo quindi lasciato che le suddette cellule migrassero attraverso camere di Boyden modificate, sia in presenza sia in assenza di EGF, come descritto nei "Metodi". L'EGF ha aumentato la migrazione attraverso il matrigel in tutte e tre le linee cellulari testate così come anche nella linea cellulare di controllo A431 (vedi figura 8). L'incubazione con il Gefitinib ha significativamente inibito l'invasività cellulare EGF-indotta in misura diversa nelle differenti linee cellulari testate, mentre ha avuto un effetto minimo o nessun effetto sulla migrazione basale (ovvero non indotta da EGF) (vedi figura 8)

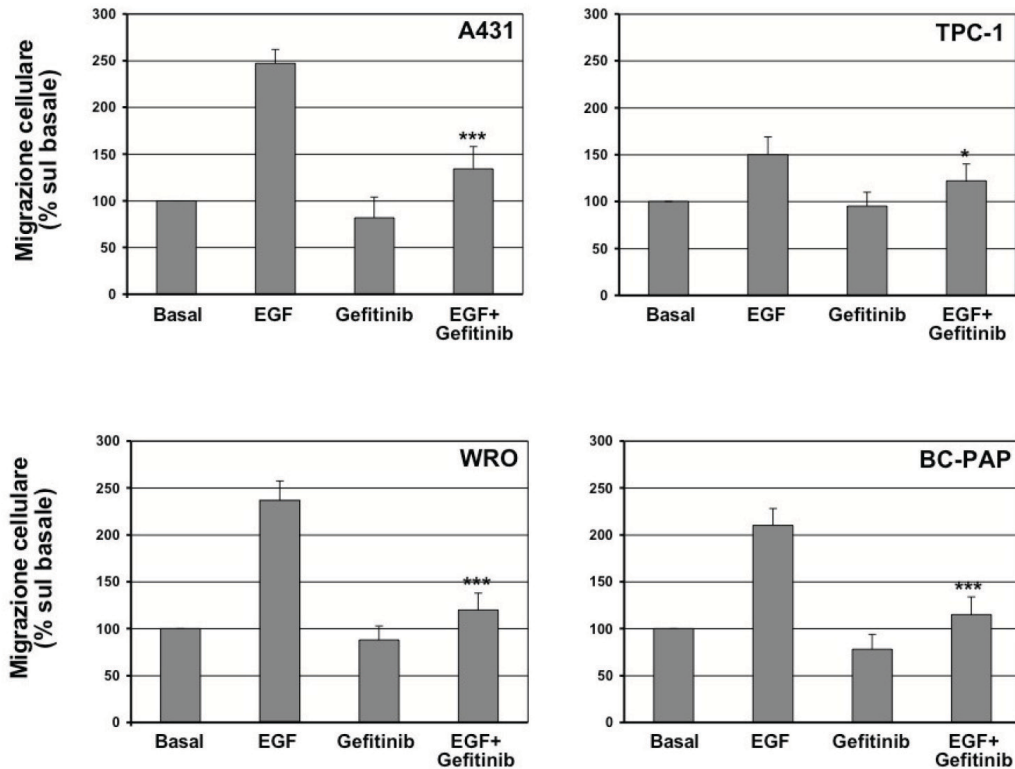


Figura 8. Effetti del Gefitinib sulla invasività cellulare EGF-indotta.

Le cellule indicate sono state prima incubate sia in presenza sia in assenza di 1 μ M di Gefitinib, poi raccolte e lasciate migrare in camere di boyden modificate per 48 ore, sia in presenza sia in assenza di 1 μ M di Gefitinib, 1 μ g/ml di EGF o entrambi come indicato nei “Metodi”. Le cellule migrate sono poi state colorate con crystal violetto e l’assorbanza è stata poi misurata a 590 nm. I numeri rappresentano la percentuale della invasività basale e sono medie \pm DS di tre diversi esperimenti eseguiti in triplicato. Il confronto statistico è stato fatto con le cellule trattate con EGF (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Questi risultati indicano che l’inibizione del recettore dell’EGF determina una attenuazione o riduzione della invasività cellulare EGF-indotta e della migrazione nelle cellule di carcinoma tiroideo.

Il Gefitinib inibisce la fosforilazione dell’EGF-R in tutte le linee di carcinoma tiroideo.

Per comprendere il meccanismo che sta alla base della responsività delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib, abbiamo testato gli effetti di questo farmaco sulla attivazione del recettore dell’EGF nelle linee cellulari di carcinoma tiroideo. A tal fine colture di cellule di cancro tiroideo sono state esposte ad 1 μ M di Gefitinib per un’ora. Anche in questo caso le cellule A431, che iperesprimono il recettore dell’EGF, sono state utilizzate come controllo positivo. Analisi di Western blotting con anticorpi anti-

pEGFR e anti-EGFR hanno mostrato che le cellule di carcinoma tiroideo esprimono il recettore per l'EGF in grado variabile (vedi figura 9A, riquadri in basso). Tra le linee cellulari testate, il più alto contenuto di proteina EGFR è stato osservato nella linea cellulare SW-1736, mentre il più basso nelle cellule 8305-C. Il Western blotting con l'anticorpo anti-pEGFR ha mostrato un grado variabile di fosforilazione basale dell'EGFR nelle cellule testate (vedi figura 9A, riquadri in alto). In questi esperimenti, il Gefitinib ha inibito la fosforilazione del recettore in tutte le linee cellulari testate (vedi figura 9A, riquadri in alto). E' stato poi anche testato l'effetto del Gefitinib sulla fosforilazione dell'EGFR stimolata dal suo ligando nelle linee cellulari TPC-1, BC-PAP, SW1736 trattate con 1 µg/ml di EGF per 5 minuti sia in presenza sia in assenza di 1 µM di Gefitinib. Lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-EGFR e poi blottati con l'anticorpo anti-fosfotirosina come indicato nei "Metodi". In tutte le linee cellulari, il Gefitinib ha inibito efficacemente la fosforilazione ligando-stimolata del recettore dell'EGF (vedi figura 9B, riquadri in alto).

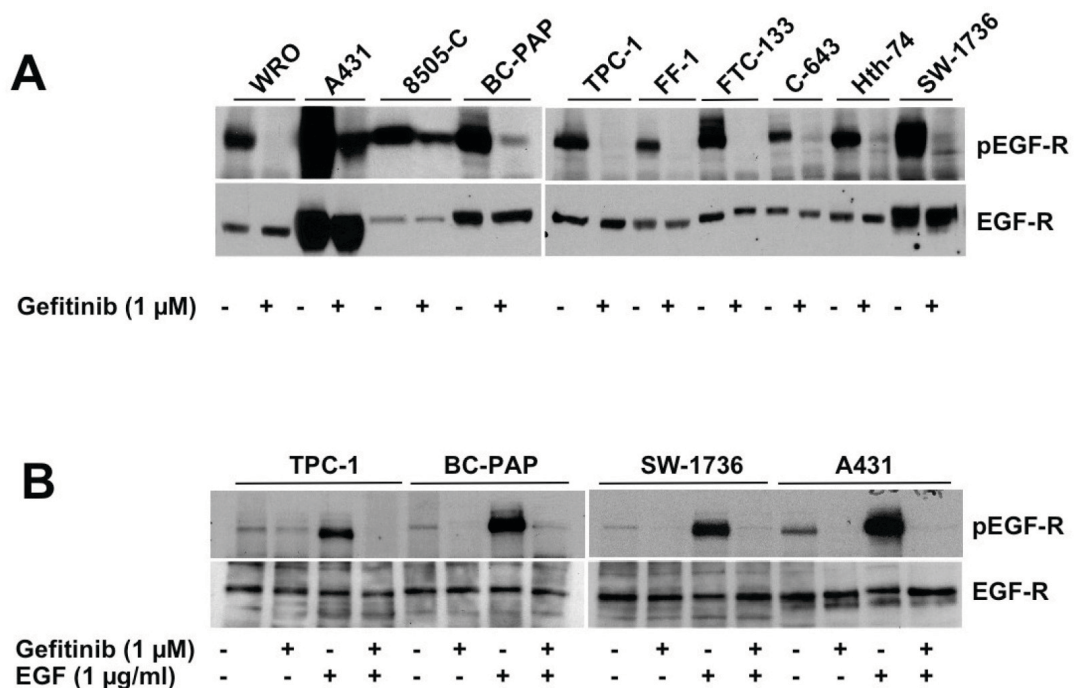


Figura 9. Effetti del Gefitinib sulla fosforilazione dell'EGFR delle cellule di carcinoma tiroideo.

(A) Le linee cellulari indicate sono state incubate sia in presenza sia in assenza di 1µM di Gefitinib per un'ora. I lisati cellulari sono poi stati sottoposti ad analisi con Western blotting con un anticorpo anti-pEGFR, come descritto nei "Metodi". La linea cellulare A431 (che iperesprime il recettore per l'EGF) è stata utilizzata come controllo positivo. I filtri sono poi stati nuovamente "blottati" con un anticorpo anti-EGFR. (B) Le linee cellulari indicate sono state incubate con 1 µM di Gefitinib come

sopra e dopo stimolato con 1µg/ml di EGF per 5 minuti. I lisati cellulari sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-EGFR e ad analisi con Western blotting con l'anticorpo anti-fosfotirosina. I filtri sono poi stati nuovamente "blottati" con l'anticorpo anti-EGFR.

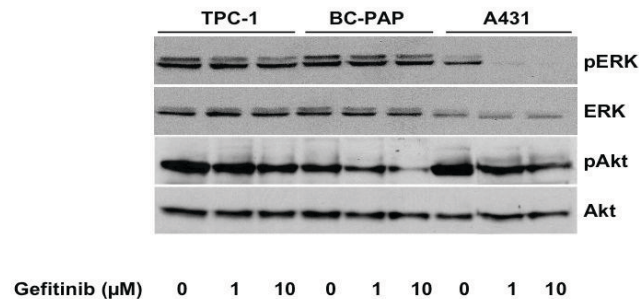
Questi risultati indicano che il Gefitinib inibisce efficacemente la fosforilazione dell'EGFR nelle cellule di carcinoma tiroideo. Pertanto sembra che l'effetto del Gefitinib sulla proliferazione non è in relazione con il grado della inibizione della fosforilazione dell'EGFR.

Il Gefitinib inibisce in maniera variabile le molecole del segnale poste a valle del recettore dell'EGF.

Per analizzare ulteriormente i potenziali meccanismi responsabili della resistenza delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib, abbiamo esaminato l'effetto di questo farmaco sulle molecole intracellulari a valle attivate dal recettore dell'EGF. Abbiamo focalizzato il nostro studio su due effettori principali degli effetti dell'EGF e cioè ERK e Akt. Nelle linee cellulari TPC1 e BC-PAP esposte a 1µM o a 10 µM di Gefitinib il Western blot con anti-pERK ha mostrato che alla dose di 1µM il Gefitinib è scarsamente efficace nell'inibire la fosforilazione di ERK nelle cellule di carcinoma tiroideo esaminate (vedi figura 14A), mentre nella linea cellulare di controllo A431 la fosforilazione di ERK1/2 è risultata essere totalmente inibita (vedi figura 10A). Quando questa stessa analisi è stata estesa anche alle altre linee cellulari di carcinoma tiroideo, il risultato è stato che il Gefitinib ha efficacemente inibito la fosforilazione nelle linee WRO, Hth-74 e FTC-133, mentre il farmaco non ha mostrato o non ha avuto un effetto significativo sulle altre linee cellulari testate (vedi figura 10B). Questi dati sono stati confermati dal fatto che il Western blot con anti-ERK non ha mostrato alcuna variazione nel livello di espressione della proteina ERK. (vedi figura 10B, riquadri in basso). È estremamente interessante notare come, in questi esperimenti, il Gefitinib ha inibito efficacemente la fosforilazione di ERK solo nelle linee cellulari che esprimono il BRAF "wild type" (non mutato) ovvero le linee WRO, Hht-74 e FTC-133, ma è stato inefficace in tutte quelle linee cellulari in possesso della mutazione V600E del BRAF ovvero le linee 8505-C, SW-1736, BC-PAP, FF-1. Inoltre, il Gefitinib non è stato in grado di inibire la fosforilazione di ERK né nelle cellule C-643 in possesso della mutazione G12A/Q61R HRAS né nelle cellule TPC1 recanti il riarrangiamento RET/TPC1. Successivamente anche PKB/Akt, l'altro importante target posto a valle del recettore dell'EGF, è stato studiato nelle linee cellulari TPC-1 e BC-PAP incubate con 1µM o 10 µM di Gefitinib.

Le cellule A431 sono state utilizzate come controllo. I Western blot con anti-pAkt hanno mostrato che alla dose di 1 μM il Gefitinib è stato in grado di ridurre significativamente la fosforilazione di Akt. Allo stesso modo i Western blot con anti-pAkt hanno indicato che, a differenza di quanto abbiamo visto per la fosforilazione di ERK, il Gefitinib in questo caso è stato in grado di inibire la fosforilazione di Akt in tutte le cellule testate eccetto le linee cellulari C-643 (cellule portatrici della mutazione G12A/Q61R, che può direttamente attivare la via della PI3-K) e FTC-133 (cellule mancanti o con delezione del gene PTEN con consequenziale up-regolazione della via PI3-K) (vedi figura 10B, riquadri in mezzo). Questi dati sono confermati dal fatto che non sono state osservate variazioni significative nel livello di espressione della proteina Akt (vedi figura 10B, riquadri in mezzo). In sintesi, questi risultati indicano che, nonostante l'efficacia sulla inibizione della fosforilazione del recettore dell'EGF, il Gefitinib ha un effetto limitato sulle molecole del segnale poste a valle di EGFR. Questo limite potrebbe dipendere dalla presenza di mutazioni genetiche che porterebbero ad una attivazione costitutiva delle più importanti vie di trasduzione del segnale poste a valle dell'EGFR.

A



B

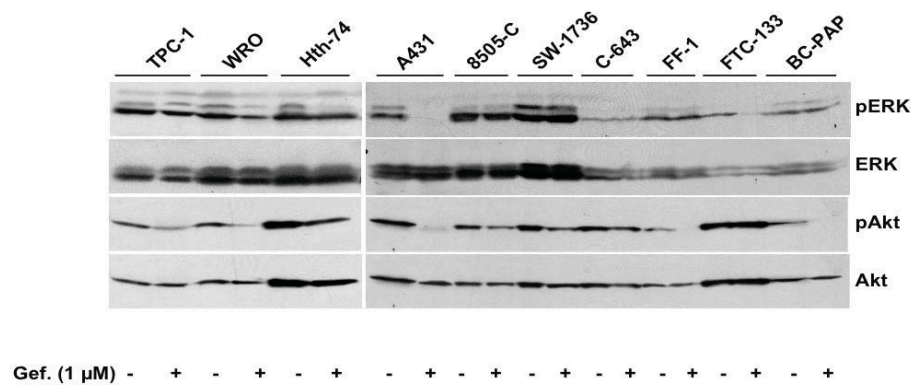


Figura 10. *Effetti del Gefitinib sulle molecole del segnale a valle dell'EGFR delle cellule di carcinoma tiroideo.*

(A) Le linee cellulari TPC-1, BC-PAP e A431 sono state incubate con 1 μ M e 10 μ M di Gefitinib. I lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi con Western blot con anti-pERK e anti-pAkt . I filtri sono poi stati nuovamente “blottati” con anti-ERK e anti-Akt per la normalizzazione proteica. (B) Le cellule indicate sono state incubate con 1 μ M di Gefitinib come sopra. I lisati poi sono stati “blottati” con anti-pMAPK e anti-pAkt. I filtri sono poi stati nuovamente “blottati” con anti-EKT e anti-Akt per la normalizzazione.

L'inibizione del BRAF (V600E) incrementa la sensibilità delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib.

È bene innanzitutto precisare che la mutazione V600E del BRAF è un'alterazione genetica frequente nel carcinoma tiroideo. Inoltre diverse evidenze sperimentali indicano che le mutazioni attivanti presenti nei geni che codificano per molecole di segnale poste a valle del recettore dell'EGF possono essere causa di resistenza al Gefitinib (Kruser TJ, Wheeler DL Mechanism of resistance to HER family targeting antibodies.). Pertanto in questo studio abbiamo cercato di capire se la presenza della mutazione V600E del BRAF potesse in qualche modo essere responsabile della resistenza al Gefitinib nelle cellule di carcinoma tiroideo. Onde verificare quest'ipotesi sono state studiate sia le linee cellulari recanti il BRAF “wild type” (non mutato) ovvero WRO e Hth-74, sia le linee cellulari in possesso della mutazione V600E ovvero BC-PAP e SW-1736. Le cellule sono state dunque incubate con dosi crescenti di Gefitinib insieme con dosi crescenti di un inibitore selettivo del BRAF, il PLX4032. Il saggio MTT in queste condizioni sperimentali ha indicato che la presenza del PLX4032 non ha modificato l'effetto del Gefitinib nelle linee cellulari WRO e Hth-74 recanti il BRAF wild type, mentre nelle linee cellulari BC-PAP e SW-1736 recanti il BRAF mutato ha significativamente aumentato l'effetto inibitorio del Gefitinib sulla proliferazione cellulare delle stesse (vedi figura 11). Questi risultati hanno indicato che l'inibizione del BRAF(V600E) previene la resistenza al Gefitinib e che pertanto questa alterazione molecolare può essere un meccanismo di resistenza al Gefitinib.

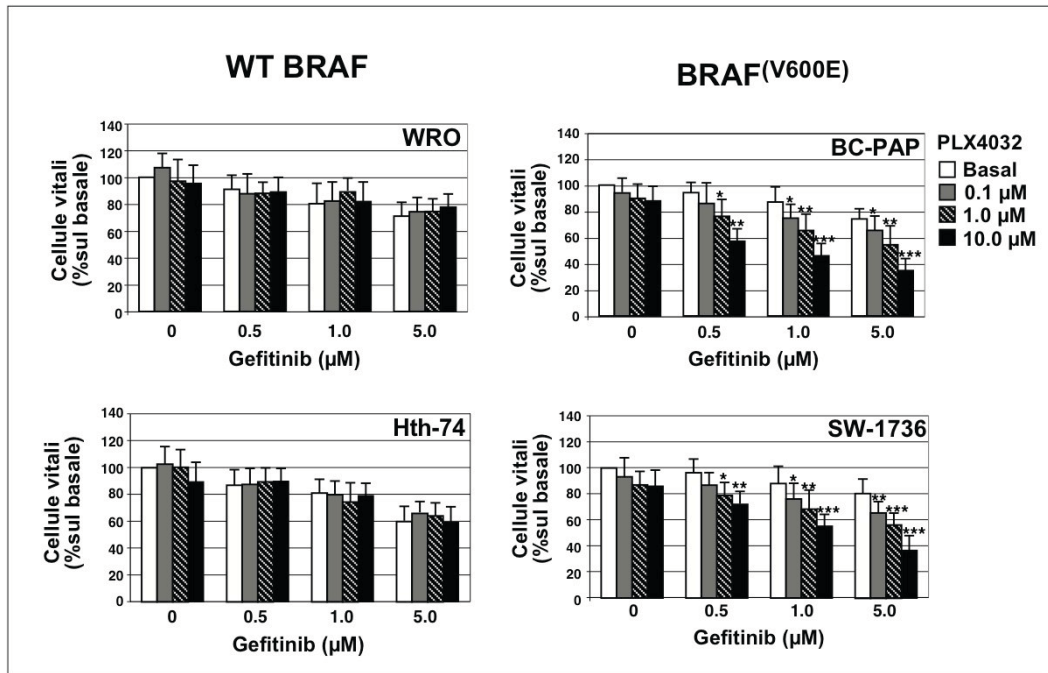


Figura 11. Effetto dell'inibizione del BRAF sulla risposta della cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib.

Le linee cellulari indicate sono state impiantate in piastre a 96 pozzetti ed incubate con dosi crescenti di Gefitinib (0.5, 1.0, 5.0 µM), o di PLX4032 (0.1, 1.0, 10 µM) o entrambi per 48 ore. La proliferazione cellulare è stata poi valutata mediante il saggio MTT. Ogni grafico rappresenta la media ± DS di tre diversi esperimenti eseguiti in quadruplicato. Il confronto statistico è stato fatto con le cellule rappresentate dalle le barre colorate in bianco (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

CAPITOLO 5 – RISULTATI: 2° PROGETTO

Espressione proteica dei diversi recettori: EGF-R, IGFI-R ed IR.

Sono state analizzate quattro diverse linee cellulari di Ca tiroideo, le quali hanno mostrato differenti livelli di espressione proteica di EGF-R, IGFI-R, IR ed un diverso rapporto IR:IGFI-R.

Analisi di Western blotting con anticorpi anti-EGFR e anti-IGFI-R hanno mostrato che le cellule di carcinoma tiroideo esprimono il recettore per l'EGF in grado variabile così come il recettore per l'IGFI-R. Tra le linee cellulari testate, il più alto contenuto di proteina EGFR è stato osservato nella linea cellulare FF1, mentre il più basso nelle cellule C643 e Hth-74. Viceversa, è stato riscontrato alti livelli di IGFI-R nelle Hth-74 e C643, bassi livelli nelle FF1.

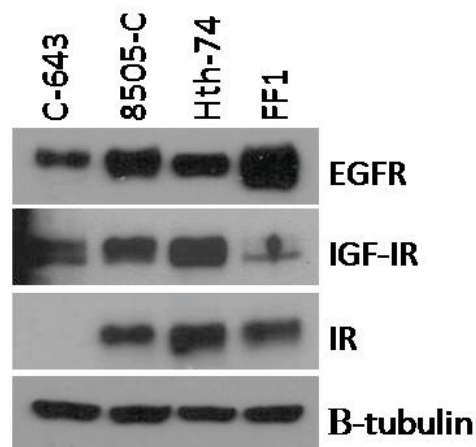


Figura 12. *Espressione proteica dei diversi recettori.*

Effetto dell'NVP-AEW541 sulla proliferazione cellulare e sulla fosforilazione di IGFI-R

Sulle stesse linee cellulari di Ca tiroideo sopra analizzate, sono stati valutati gli effetti dell'NVP-AEW541 sulla proliferazione cellulare mediante saggio MTT.

La figura sotto mostra che, le Hth-74 sono le più sensibili all'azione dell'NVP-AEW541 rispetto alle altre linee cellulari che hanno invece mostrato un variabile grado di resistenza. Le 8505C e le FF1 sono risultate le più resistenti.

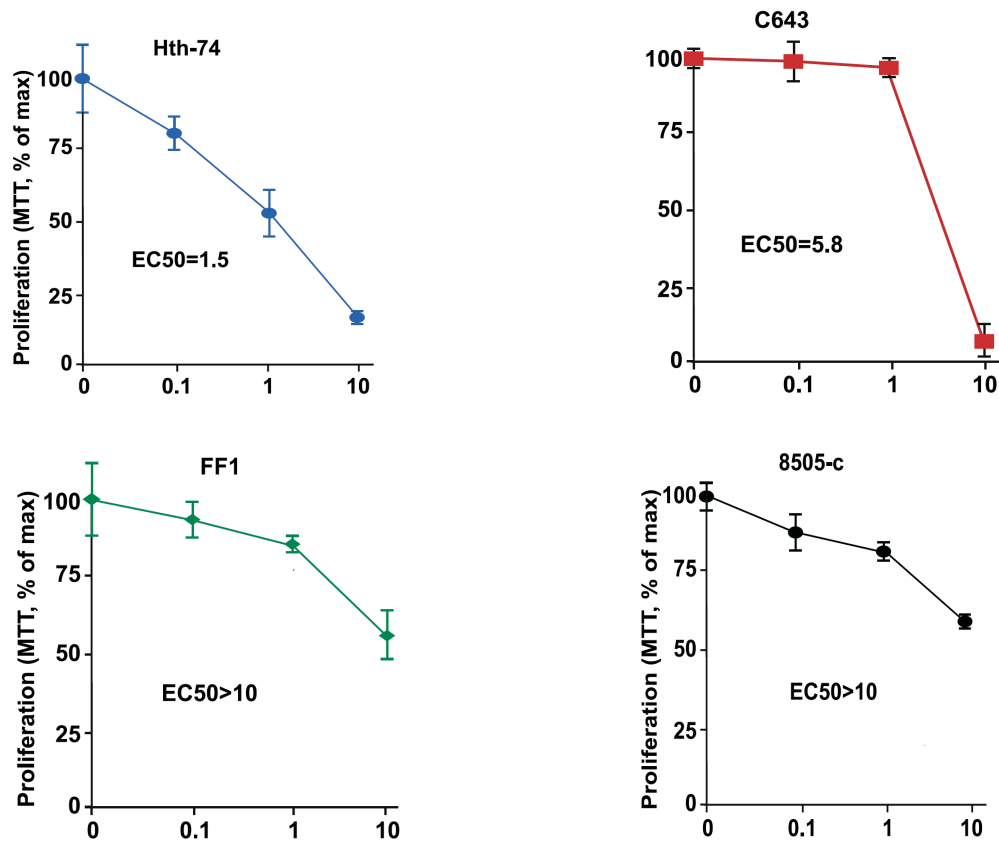


Figura 13. Effetti dell’NVP-AEW541 sulla proliferazione delle cellule di carcinoma tiroideo.

Le linee cellulari indicate sono state impiantate in piastre a 96 pozzetti con dosi crescenti di NVP-AEW541 (0.1, 1.0, 10 μM) per 48 ore. La proliferazione è stata valutata con il saggio MTT. Ogni figura indica la media ± DS di tre esperimenti diversi eseguiti in quadruplicato.

La figura 13 mostra che l’NVP-AEW541 a dosaggi crescenti riduce in maniera consistente (di circa il 40% ad un dosaggio di 1μM) il numero di cellule proliferanti nella linea cellulari Hth-74. Al contrario, sulle altre linee cellulari l’NVP-AEW541 ha un effetto marginale. Questi risultati indicano che, eccetto le linee cellulari Hth-74 (EC50=1.5 μM) ed in parte le C-643 (EC50=5.8 μM), le altre due linee cellulari di carcinoma tiroideo sono refrattarie all’NVP-AEW541 (FF1 ed 8505c con un EC50>10 μM).

Sulla base di tali risultati sono state individuate cellule resistenti e cellule sensibili all’NVP-AEW541.

L’NVP-AEW541 inibisce la fosforilazione dell’IGFI-R in tutte le linee di carcinoma tiroideo sia resistenti sia sensibili.

Per comprendere il meccanismo che sta alla base della responsività delle cellule di carcinoma tiroideo all’NVP-AEW541, abbiamo testato gli effetti di questo farmaco sulla attivazione del recettore dell’IGFI-R nelle linee cellulari di carcinoma tiroideo sia sensibili che resistenti. A tal fine le cellule di cancro tiroideo sono state esposte a dosi crescenti di NVP-AEW541 (0, 0.5, 1, 3 μ M) per un’ora. In questo esperimento si è visto che in tutte le linee cellulari testate, sia in quelle resistenti che in quelle sensibili, l’NVP-AEW541 è in grado di inibire la fosforilazione di IGFI-R.

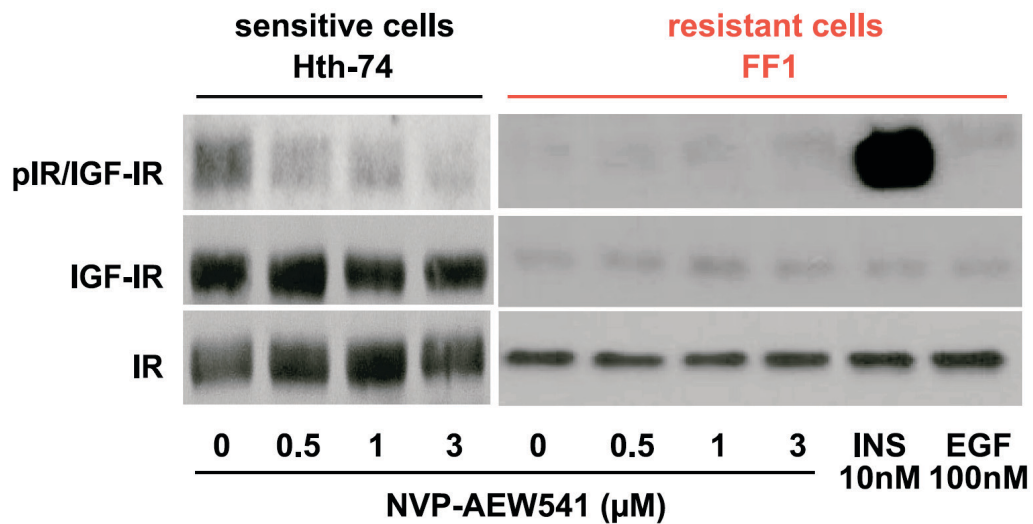


Figura 14. Effetti dell’NVP-AEW541 sulla fosforilazione dell’IGFI-R nelle cellule di carcinoma tiroideo.

Le linee cellulari indicate sono state incubate con dosi crescenti di NVP-AEW541 per un’ora. I lisati cellulari sono poi stati sottoposti ad analisi con Western blotting con un anticorpo anti-pIGFI-R, come descritto nei “Metodi”.

Questi risultati indicano che l’NVP-AEW541 inibisce efficacemente la fosforilazione dell’IGFI-R nelle cellule di carcinoma tiroideo. Pertanto sembra che l’effetto dell’NVP-AEW541 sulla proliferazione non è in relazione con il grado di inibizione della fosforilazione dell’IGFI-R.

L’NVP-AEW541 inibisce in maniera variabile le molecole del segnale poste a valle del recettore dell’IGFI-R.

Cellule esprimenti elevati livelli di EGF-R, IGF-IR ed alto rapporto IR-A:IGF-IR sono state utilizzate per studiare lo stato di attivazione di IGF-IR e delle vie di segnale a valle di esso mediante analisi Western Blot utilizzando anticorpi commerciali specifici.

L’analisi al Western Blot ha mostrato che, dopo trattamento di 1h con NVP-AEW541 nelle Hth74 (linea cellulare sensibile) la via di AKT è inibita in maniera più efficace rispetto alla via di ERK1/2. Viceversa, nelle FF1 si osserva un aumento di attivazione di ERK1/2 dopo NVP-AEW541 e nessuna inibizione di AKT.

Inoltre, nelle FF1 il trattamento con NVP-AEW541 induce un significativo aumento della fosforilazione di EGFR.

Questi dati sono confermati dal fatto che non sono state osservate variazioni significative nel livello di espressione della proteina ERK, AKT ed EGFR.

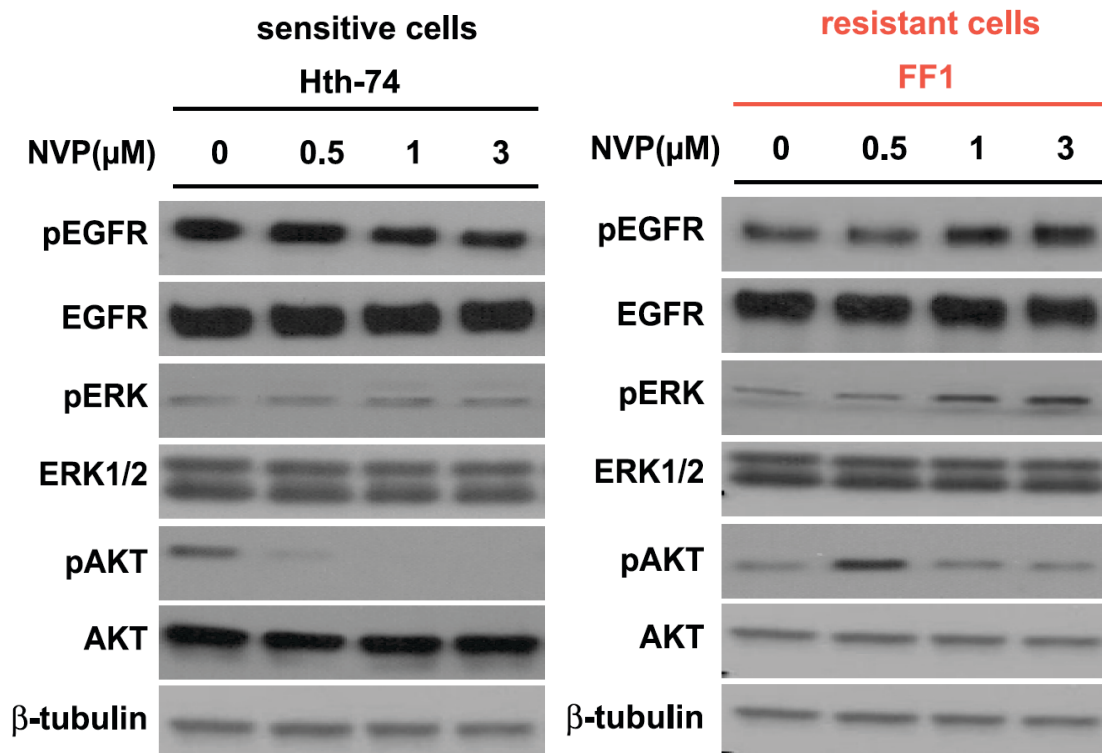


Figura 15. Effetti dell’NVP-AEW541 sulle molecole del segnale a valle dell’IGFI-R delle cellule di carcinoma tiroideo.

Le due linee indicate sono state incubate con concentrazioni crescenti di NVP-AEW541 per 1h. I lisati sono poi stati “blottati” con anti-pEGFR, anti-pERK ed anti-pAKT.

L'inibizione dell'EGFR incrementa la sensibilità delle cellule di carcinoma tiroideo all'NVP-AEW541.

Le linee cellulari prese in esame, ed in particolare le FF1 che risultano essere resistenti all'NVP-AEW541 e le C643 che invece da saggi precedenti son risultate sensibili all'effetto dell' NVP-AEW541, sono state incubate con dosi crescenti di NVP-AEW541 insieme con dosi crescenti di un inibitore selettivo dell'EGFR, il Gefitinib. Il saggio MTT in queste condizioni sperimentali ha indicato che il trattamento combinato con NVP-AEW541 ed il Gefitinib riduce la proliferazione più efficacemente del solo NVP-AEW541 nelle FF1, che mostrano alti livelli di IR ed EGFR ed attivazione di EGFR dopo trattamento con NVP-AEW541. Nelle C643, che invece mostrano bassi livelli di EGFR ed un rapporto IR:IGF-IR paragonabile a quello delle FF1, la presenza del Gefitinib non ha modificato l'effetto dell'NVP-AEW541 da solo.

Questi risultati hanno indicato che l'inibizione dell'EGFR previene la resistenza all'NVP-AEW541 e che pertanto un trattamento combinato con NVP-AEW451 e Gefitinib (inibitore di EGFR) potrebbe superare i meccanismi di resistenza all'inibizione singola di IGF-IR.

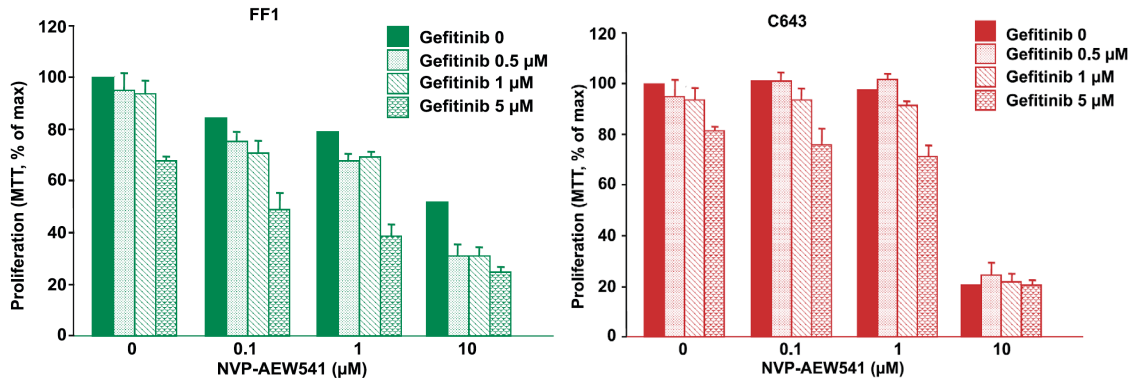


Figura 16. *Effetto dell'inibizione dell'EGFR sulla risposta della cellule di carcinoma tiroideo all'NVP-AEW541*

Le due linee cellulari indicate sono state impiantate in piastre a 96 pozzetti ed incubate con dosi crescenti di NVP-AEW541 (0.1, 1.0, 10.0 μM), o di Gefitinib (0.5, 1.0, 5.0 μM) o entrambi per 48 ore. La proliferazione cellulare è stata poi valutata mediante il saggio MTT. Ogni grafico rappresenta la media ± DS di tre diversi esperimenti eseguiti in quadruplicato.

L'inibizione di MEK incrementa la sensibilità delle cellule di carcinoma tiroideo all'NVP-AEW541.

Abbiamo inoltre effettuato lo stesso esperimento utilizzando stavolta uno specifico inibitore di MEK, il PD98059. A tal proposito, le FF1, linea risultata resistente all'NVP-AEW541 e con un significativo aumento della fosforilazione di ERK dopo trattamento con NVP-AEW541, sono state incubate con dosi crescenti di NVP-AEW541 ed uno specifico inibitore selettivo di MEK, il PD98059. Il saggio MTT in queste condizioni sperimentali ha indicato che la presenza del PD98059 ha parzialmente ridotto la resistenza all'NVP-AEW541 da solo. Mentre nelle Hth-74 il trattamento combinato non ha modificato l'effetto dell'NVP-AEW541 da solo.

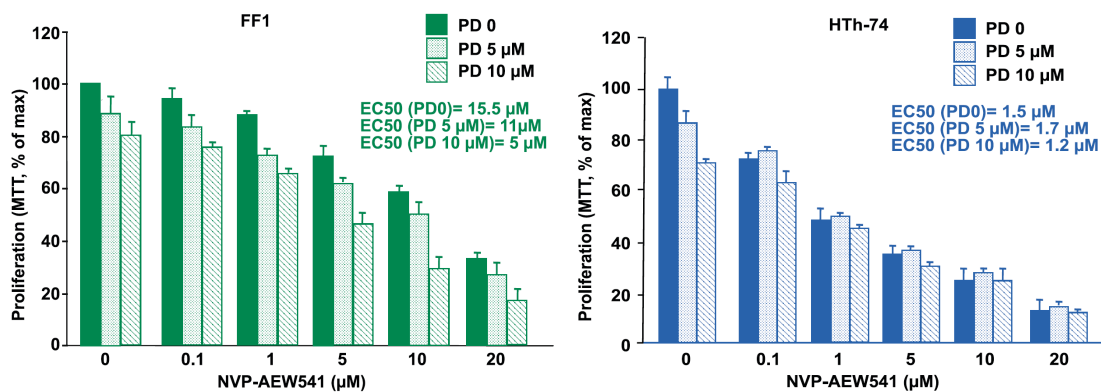


Figura 17. Effetto dell'inibizione di MEK sulla risposta della cellule di carcinoma tiroideo all'NVP-AEW541

Le due linee cellulari indicate sono state impiantate in piastre a 96 pozzetti ed incubate con dosi crescenti di NVP-AEW541 (0.1, 1.0, 5, 10.0, 20.0 μ M), o di PD (5.0, 10.0 μ M) o entrambi per 48 ore. La proliferazione cellulare è stata poi valutata mediante il saggio MTT. Ogni grafico rappresenta la media \pm DS di tre diversi esperimenti eseguiti in quadruplicato.

Anche in questo caso, questi risultati hanno indicato che l'inibizione di ERK previene la resistenza all'NVP-AEW541 e che pertanto un trattamento combinato con NVP-AEW541 e PD98059 (inibitore di EGR) potrebbe superare i meccanismi di resistenza all'inibizione singola di IGF-IR.

CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In linea con studi precedenti, questa ricerca indica che le cellule di carcinoma tiroideo esprimono una quantità significativa di recettore per l'EGF "attivato". Inoltre l'attivazione dell'EGFR sembra essere in parte responsabile della proliferazione cellulare e pare che possa in qualche modo contribuire all'acquisizione del fenotipo invasivo; pertanto tale recettore potrebbe rappresentare un interessante target dell'inibitore selettivo dell'EGFR "Gefitinib", farmaco utilizzato spesso come trattamento adiuvante in molte neoplasie maligne. Comunque, sebbene in tutte le linee cellulari di carcinoma tiroideo testate è stata osservata una notevole inibizione della fosforilazione del recettore, il Gefitinib ha avuto effetti significativi sulla proliferazione cellulare solo in alcune linee cellulari ed in particolare su cellule WRO e Hht-74 (linee che esprimono BRAF "wild type"). Inoltre anche sull'attivazione di ERK il Gefitinib ha avuto effetti poco significativi; al contrario il Gefitinib ha inibito efficacemente l'attivazione di Akt nella maggior parte delle linee cellulari testate. Comunque in generale è bene dire che, il Gefitinib non risulta efficace in tutte quelle linee cellulari recanti mutazioni dei geni che codificano per molecole poste a valle di EGFR quali 8505-C, SW-1736, BC-PAP, FF-1, tutte in possesso della mutazione BRAF (V600E), mentre, al contrario, si è dimostrato essere efficace in cellule WRO e Hht-74, le quali non hanno mutazioni significative a carico dei geni codificanti per molecole della via di traduzione del segnale attivata da EGFR. Oltretutto il Gefitinib non è riuscito ad esercitare effetti significativi neanche in cellule C-643 che presentano tipicamente la mutazione HRAS G12A/Q61R. In aggiunta, il Gefitinib non è capace di indurre l'apoptosi in cellule FTC-133 le quali presentano la delezione di PTEN. Se da un lato il Gefitinib si è dimostrato essere scarsamente efficace quando utilizzato in monoterapia, tuttavia è stato in grado di incrementare l'effetto citotossico di farmaci chemioterapici quali doxorubicina e cisplatino. Ed ancora, è interessante notare che il Gefitinib è capace di ridurre l'invasività delle cellule di carcinoma tiroideo indipendentemente dalla presenza o meno di mutazioni attivanti la via di traduzione del segnale di EGFR. Pertanto è ragionevole supporre che questi due ultimi effetti sono essenzialmente dipendenti dall'azione del Gefitinib sulla via PI3-K/Akt (a conferma di ciò opportuno ribadire che il Gefitinib inibisce l'attivazione di Akt nella maggior parte delle linee cellulari testate). Dal momento che tutti questi dati suggeriscono che la resistenza delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib relativamente alla proliferazione cellulare ed

all'apoptosi è spesso dovuta alla iperattivazione di ERK secondaria alla presenza della mutazione di BRAF (V600E), in questo studio abbiamo anche cercato di vedere se l'inibizione del BRAF potesse incrementare gli effetti del Gefitinib: ed infatti, lo studio ha mostrato che l'inibizione del BRAF ad opera dell'inibitore selettivo PLX4032 di fatto ripristina gli effetti del Gefitinib in quelle cellule in possesso della mutazione del BRAF, mentre d'altro canto il blocco del BRAF con lo stesso farmaco non ha mostrato avere alcun effetto nelle cellule prive della mutazione. Questi risultati sono in linea con precedenti osservazioni che indicano che uno dei più comuni meccanismi di resistenza alle terapie con inibitori dell'EGFR è la mutazione di KRAS: infatti, dal momento che BRAF, come RAS, appartiene alla via RAS/RAF/MEK/ERK, è ragionevole supporre che l'attivazione costitutiva del BRAF possa essere causa di resistenza al Gefitinib. Sebbene questi risultati sono stati ottenuti in vitro, essi possono trovare applicazione clinica nella "target therapy" dei carcinomi poco differenziati della tiroide. A tal proposito è importante dire che tutti i trials clinici effettuati sino ad ora sull'uso del Gefitinib nei carcinomi poco differenziati della tiroide, eseguiti per altro su un campione di pazienti numericamente esiguo, hanno fornito scarsi risultati e, dal momento che la mutazione BRAF (V600E) è una fra le più comuni alterazioni genetiche presenti nei carcinomi papillari aggressivi (poco differenziati) della tiroide, è ragionevole supporre che alcuni dei casi suddetti, poco o non responsivi al Gefitinib, siano imputabili alla presenza della mutazione del BRAF (V600E). Dunque, è chiaro che, alla luce di quanto detto sino ad ora, lo studio del genotipo del BRAF potrebbe essere usato per selezionare pazienti da sottoporre a terapie combinate basate cioè sull'utilizzo di inibitori specifici del BRAF insieme con inibitori specifici dell'EGFR e, dal momento che il Gefitinib è risultato essere un composto ben tollerato, potrebbe essere possibile usare proprio il Gefitinib in combinazione con i nuovi inibitori del BRAF come trattamento adiuvante nei carcinomi poco differenziati della tiroide. In conclusione i nostri dati indicano che:

- sebbene nelle cellule di carcinoma tiroideo l'EGFR è altamente espresso/attivato, questo non implica la presenza di un fenomeno "oncogene addiction" EGFR-dipendente. Infatti l'inattivazione dell'EGFR da parte di Gefitinib solo sporadicamente esita in un significativo effetto citostatico/citotossico;
- un importante meccanismo di resistenza delle cellule di carcinoma tiroideo al Gefitinib è la presenza della mutazione BRAF(V600E);

- è degno di nota il fatto che, anche in presenza della mutazione del BRAF (V600E) e della costitutiva attivazione della via del segnale di Erk, il Gefitinib è ancora in grado di inibire la via PI3-Kinasi;
- l'inibizione di quest'ultima potrebbe poi essere responsabile dell'inibizione e/o riduzione dell'invasività delle cellule di carcinoma tiroideo come anche dell'incremento della loro chemiosensibilità ottenuta con l'uso del Gefitinib;
- l'inibizione dell'oncogene BRAF (V600E) mediante inibitore specifico ripristina l'effetto citostatico/citotossico di Gefitinib.

Ovviamente per poter validare questi risultati ottenuti in vitro e per far sì che questi trovino poi applicazione in trias clinici, sono necessarie ulteriori ricerche in vivo (vedi figura 16).

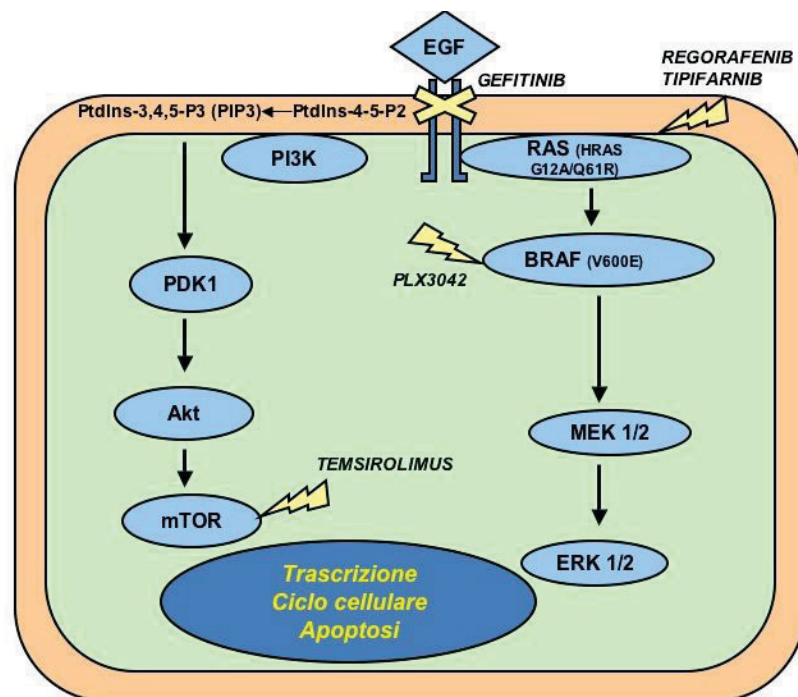


Figura 18: Principali tappe delle vie di traduzione del segnale e loro inibitori.

Stesso discorso nel secondo progetto. Sebbene le terapie a bersaglio molecolare contro IGF-IR sembrano promettenti, soprattutto nei tumori dove IGF-IR risulta iperespresso, (es: tumore tiroideo anaplastico), tuttavia c'è crescente necessità di identificare fattori di risposta farmacologica a tale inibizione per il possibile sviluppo di meccanismi compensatori di resistenza. La deregolazione del sistema IGF, in particolare l'iperpressione di IR-A ed EGF-R, tipica dei tumori più aggressivi della tiroide,

potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio al blocco di IGF-IR e quindi un fattore responsabile della scarsa risposta antitumorale a tale inibizione in questi tumori. Pertanto, se il nostro studio conferma tale ipotesi il livello di espressione di IR-A ed EGF-R potrebbe rappresentare un marcatore e fattore predittivo di efficacia terapeutica al blocco di IGF-IR nei tumori tiroidei. Pertanto, la terapia combinata di doppio blocco per IGF-IR ed IR-A/EGF-R potrebbe superare i meccanismi di resistenza all'inibizione singola di IGF-IR aprendo nuove prospettive terapeutiche per quei tumori tiroidei più aggressivi per i quali, ad oggi, i comuni chemioterapici risultano poco efficaci.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Jemal A., Siegel R, Ward E., Murray T, Xu Ju, Smigal C, Thun Mj. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin Vol 56: p106, 2006.
- 2) Albores-Savaedra, Henson D.E., Glazer E., Schwartz A.M.. Endocr Pathol 18: pp 1-7, 2007.
- 3) Landis S.H., Murray T., Bolden S. et al. “Cancer Statistics”, CA Cancer J Clinics, 1998 Vol:48, pp 6-30.
- 4) Kosary C.L., Ries L.A.G., Miller B.A.,et al. “SEER Cancer Statistic Review, 1973-1992: Tables and Graphs”, Bethesda, MD, National Cancer Institute, NIH Pub. N.O. , pp96-2789,1995
- 5) DeLellis RA, Lloyd R, Heitz PU: WHO classification of tumors, pathology and genetics — tumors of endocrine organs. 2004 Lyon, France: IARC Press.
- 6) Nikiforov YE: Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. Mod Pathol, 2008 May;21 Suppl 2:S37–43.
- 7) Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res, 2003 April 1;63(7):1454-7.
- 8) Pellegriti G. ,De Vathaire F., Scollo C., Attard M, Giordano C., Arena S. Dardanoni G., Frasca F., Malandrino P.,Vermiglio F., Privitera D.M., D’azzo G., Trimarchi F., Vigneri R. “Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of sicily.” J Natl Cancer Inst, Vol 101 pp: 1575-1583, 2009.
- 9) Surveillance Epidemiology and End Results Cancer Registries Program: <http://seer.cancer.gov/>.
- 10) Thomposon D.E., Soda M, Tokunaga M, et al. “Cancer incidence in atomic bomb survivors”. Radiate Res Vol 137: p 17 ,1994

- 11) Kazakov V.S., Demidchick E.P., Astakhova L.N. "Thyroid cancer after Chernobyl". *Nature* Vol 359 :p 21 ,1992.
- 12) Nikiforov Y.E. "Radiation- induced thyroid cancer: what we have learned from Chernobyl." *Endocr Pathl* Vol 17: p307, 2006.
- 13) Nikiforov Y.E., Gnepp D.R., "Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus", *Cancer* Vol 74, pp.748-766.
- 14) Leenhardt L.M.D., Aurengo A.M.D., "Post-Chernobyl thyroid carcinoma in children". *Bailliere's Clinical endocrinology and Metabolism* Vol 14, pp 667-677.
- 15) Hancock S.L. , Cox R.S. , Mc Dougall I.R.. "Thyroid disease after treatment of Hodgink's disease". *N. Engl J Med* Vol 325, p 307 1991
- 16) Ron E. , Lubin J.H., Shore R.E., Mabuchi K., Modan B., Pottern L.M. ,Schneider A.B., Tucker M.A., Boice J.D. "Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies". *Radiat Research* Vol 141, p 259, 1995
- 17) De Vathaire F., Schweisguth O., Rodary C., Francois P., Sarrazin D, Oberlin O., Hill C., Raquin MA, Dutreix A., Flamant R. "Long-term risk of second malignant neoplasm after a cancer in childhood". *Br J Cancer* Vol 59 ,p 448 , 1989
- 18) Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD: Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer*, 2007 Jan 15;96(1):16-20.
- 19) Belfiore A., La Rosa G., La Porta G., Giuffrida D., Milazzo G., Lupo L., Regalbuto C, Vigneri R. "Cancer risk in patient with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake , sex, age and multinodularity" . *Am J Med*, Vol 93: pp 363-369, 1992.
- 20) Galanti M.R., Sparen P., Karlsoon A., Grimelius L., Ekbom A. " Is residence in areas of endemic goiter a risk factor for thyroid cancer?". *Int J Cancer* Vol 61: pp 615-621 1995.
- 21) Arnbjornsson E., Arnbjornsson A., Olaffson A. "Thyroid cancer in relation to volcanic activity", *Arch Environ Health* Vol 41: pp 36-42, 1986.

- 22) Mack W.J., Preston-Martin S. "Epidemiology of thyroid cancer" *Thyroid cancer*, Fajan J.A. (Ed.), Kluver Academic Publisher, Boston , pp 1-25 1998.
- 23) Pellegriti G., Belfiore A., Giuffrida D., Lupo L., Vigneri R. "Outcome of differentiated thyroid cancer in Grave's patients". *J Clin Endocrinol Metab* , Vol 83: pp 2805-2809 1998.
- 24) J. Gerenova, M. Buyschaert, C.Y. de Burdere, C.H. Daumerie, "Prevalence of thyroid cancer in Grave's disease: a retrospective study of a cohort of 103 patients treated surgically". *European Journal of internal Medicine*, Vol 14: pp 321-325 2003.
- 25) Memon A., Darif M., Al-Saleh K, Suresh A. "Epidemiology of reproductive and hormonal factors in thyroid cancer: evidence from a case-control study in the Middle-East." *Int J Cancer* , Vol 97: pp 82 , 2002.
- 26) Van Hoeven K.H., Menendez-Botet C.J., Strong E.W., Huvos A.G., " Estrogen and progesterone receptor content in human thyroid disease." *Am J Clin Pathology* Vol 99: pp 175 1993.
- 27) Goldman M.B., Monson R.R., Maloof F., "Cancer mortality in women with thyroid disease". *Cancer Res*, Vol 50: pp 2283-2289 1990.
- 28) Goodman M.T., Kolonel L.N. Wilkens R.N. "The association of body size, reproductive factors and thyroid cancer." *Br J Cancer*, Vol 66: pp 1180-1184 1992.
- 29) Pal T., Vogl F.D., Chappius P.O., Tsang R., Brierley J., Renard H., Sanders K., Kantemiroff T., Bagha S., Goldar D.E., Narod S.A., Foulkes W.D. "Increased risk for nonmedullary thyroid cancer in the first degree relatives of prevalent cases of nonmedullary thyroid cancer: a hospital-based study." *J Clin Endocrinol Metab* , Vol 86: pp 5307 , 2001.
- 30) Malchoff C.D. " Familial non-medullary thyroid carcinoma" *Cancer Control* Vol 13: pp 106-110, 2006.
- 31) Marchesi M., Biffoni M., Biancari F., Faloci C., Cresti R., Mariotti F., Nobili R., Benedetti. "Familial papillary carcinoma of the thyroid: a report of nine first-degree

- relatives of four families”. *European Journal of Surgical Oncology*, Vol 26: pp789-791, 2000.
- 32) Spitz M.R., Sider J.K., Katz R.L., Pollack E.S., Newell G.R. “Ethnic patterns of thyroid cancer incidence in the United States 1973-1981”. *Int J Cancer*, Vol 42: pp 549, 1988.
 - 33) Franceschi S., Fassina A., Talamini R., Mazzolini A., Vianello S., Bidoli E., Serraino D., La Vecchia C. “Risk factors for thyroid cancer in northern Italy.” *Int J Epidemiol*, Vol 18: pp 578 , 1978.
 - 34) Breslow N.E., Enstrom J.E. “Geographic correlation between cancer mortality rates and alcohol-tobacco consumption in the United States.” *J Natl Cancer Inst*, Vol 53: pp 631, 1974.
 - 35) Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE: Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1): 94-101.
 - 36) Delellis R.A., Lloyd R.V., Heitz P.U., Heng C. “Pathology and genetics: tumors of endocrine organs: WHO classification and tumor series.” IARC Press, Lyon 2004.
 - 37) Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA: Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res*, 2005; 65: 4238-4245.
 - 38) Mariuzzi G.M. “Anatomia patologica e correlazioni anatomico-cliniche” Vol 1: pp 721-739, 2006.
 - 39) Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santusano F, Elisei R: Correlation between B-RFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer*, 2006 Jun;13(2):455-64

- 40) McIver B., Hay I.D., Giuffrida D.F., et al. "Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution", *Surgery* Vol 130: pp 1028-1034, 2001.
- 41) Sherman S.I. "Anaplastic carcinoma: clinical aspect", Wartofsky L. (Ed.), *Thyroid cancer. A comprehensive guide to clinical management* (1999), pp 319-325, Humana Press, Totowa, NJ.
- 42) Ball D.W., Baylin S.B., De Bustros A.C., "Medullary thyroid carcinoma", Braverman L.E., Utiger R.D., (Ed), *Werner and Ingbars: the thyroid 7th ed*, pp 946-960, 1996
- 43) Fardon S., Leight G.S., Dilley W.G. et al. "Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity". *Br J Surg* Vol 73: pp 278-281, 1986
- 44) Wong Y.E., Ray R., Gao D.L. et al. "Reproductive history, occupational exposure, and thyroid cancer risk among women textile workers in Shanghai, China". *Int Arch Occup Environ Health*, Vol 79: pp 251-258, 2006.
- 45) Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, Fukunaga FH, Tallini G, Rigopoulou D, Visconti R, Mastro A, Santoro M, Fusco A: RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*, 1996 Sep 21;11(6):1207-10
- 46) Greco A, Roccato E, Pierotti MA: TRK oncogenes in papillary thyroid carcinoma. *Treat Res*, 2004;122: 207–19.
- 47) Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA: RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, 1998 Jan;4(1):223-8.
- 48) Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS: Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res*, 1988;48: 4459-63.
- 49) Mingzhao Xing: Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Thyroid Cancer. *Thyroid*, 2010 July;20(7):697–706.
- 50) Gimm O, Perren A, Weng LP: Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol*, 2000;156:1693–700.

- 51) Alvarez-Nunez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, de Leiva A, Matias-Guiu X; Thyroid Neoplasia Study Group: PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*, 2006 Jan;16(1):17-23.
- 52) Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, Herrero A, Fusco A, Cameselle-Teijeiro J, Santoro M: Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res*, 2005;65:10199-10207.
- 53) Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, Vasko V, Xing M: Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:1161-1170.
- 54) Woyach JA, Shah MH: Therapeutic advances in the management of progressive thyroid cancer. *New Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):715-31.
- 55) Basi scientifiche per Linee Guida, NUOVE TERAPIE, Ministero della Salute, <http://www.iss.it/lgac/docu/cont.php?id=117&lang=1&tipo=32>.
- 56) Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA 2003 Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12:69-90
- 57) Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A 2000 Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:517-539
- 58) Frauman AG, Moses AC 1990 Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19:479-493
- 59) Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA 2003 High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-1457
- 60) Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A 2000 The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol* 13:882-887
- 61) Gimm O 2001 Thyroid cancer. *Cancer Lett* 163:143-156

- 62) Weinstein IB, Joe AK 2006 Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3:448-457
- 63) Soares P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M 2003 Molecular pathology of papillary, follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid. *Arkh Patol* 65:45-47
- 64) Puxeddu E, Fagin JA 2001 Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:493-513
- 65) Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA 2003 Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12:69-90
- 66) Duh QY, Siperstein AE, Miller RA, Sancho JJ, Demeure MJ, Clark OH 1990 Epidermal growth factor receptors and adenylate cyclase activity in human thyroid tissues. *World J Surg* 14:410-417; discussion 418
- 67) Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP 1991 Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5:727-754
- 68) Lamy F, Taton M, Dumont JE, Roger PP 1990 Control of protein synthesis by thyrotropin and epidermal growth factor in human thyrocytes: role of morphological changes. *Mol Cell Endocrinol* 73:195-209
- 69) Hunter T, Pines J 1991 Cyclins and cancer. *Cell* 66:1071-1074
- 70) Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, Komoike Y, Wakasugi E, Tamaki Y, Tsujimoto M, Matsuura N, Monden M 1996 Expression of p21 (WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. *Br J Cancer* 74:1269-1274
- 71) Zou M, Shi Y, Farid NR, al-Sedairy ST 1998 Inverse association between cyclin D1 overexpression and retinoblastoma gene mutation in thyroid carcinomas. *Endocrine* 8:61-64
- 72) Basolo F, Caligo MA, Pinchera A, Fedeli F, Baldanzi A, Miccoli P, Iacconi P, Fontanini G, Pacini F 2000 Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product, and Ki67 labeling index. *Thyroid* 10:741-746

- 73) Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP 1993 High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:179-184
- 74) Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD 2007 Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 96:16-20
- 75) Chiloeches A, Marais R 2006 Is BRAF the Achilles' Heel of thyroid cancer? *Clin Cancer Res* 12:1661-1664
- 76) Weinstein IB 2002 Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297:63-64
- 77) Jonkers J, Berns A 2004 Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 6:535-538
- 78) Sachdev D, Yee D. (2007) Disrupting insulin-like growth factor signalling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 6(1):1-12
- 79) Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75:73-82
- 80) Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML et al. (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol*, 177:517-35
- 81) Di Cola G, Cool MH, Accili D. (1997) Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors. *J Clin Invest*, 99:2538-44
- 82) Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ. (1992) Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*, 267(15):10759-63
- 83) Samani AA, Brodt P. (2001) The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*, 10:289-312
- 84) Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R et al. (2002) Insulin/Insulin like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*, 277(42):39684-95

- 85) Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, LeRoith D. (1997) Specific inhibition of the insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins. *Endocrinology*, 138:1427-33
- 86) Blum G, Gazit A, Levitzki A. (2000) Substratecompetitive inhibitors of IGF-I receptor kinase. *Biochem*, 39(51):15705-12
- 87) Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R et al. (2004) Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*, 5:221-30
- 88) Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J et al. (2004) In vivo antitumor activity of NVP-AEW541: A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell*, 5:231-39
- 89) Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O et al. (2004) Cyclolignans as inhibitors of the insulin like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res*, 64:236-42
- 90) Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002;110:763-73.
- 91) Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 2006;16:649-56.
- 92) Yeh MW, Rougier JP, Park JW, et al. Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1173-83.
- 93) Malaguarnera R, Mandarino A, Mazzon E, et al. The p53-homologue p63 may promote thyroid cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:953-71.
- 94) Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:43-60.

- 95) Mitsiades CS, Kotoula V, Poulaki V, et al. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in human thyroid carcinoma: mutational and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3662-6.