



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Cliniche e Sperimentali

CURRICOLUM: Metodologia Clinica e Medicina dell'Esercizio, Scienze Endocrinologiche, Diabetologiche e Nefrologiche

CICLO 35°

**TARGET RECETTORIALI DELLA LIQUIRIZIA NELLA
TIROIDE SANA E PATOLOGICA: EVIDENZE PER UN SUO
POSSIBILE RUOLO ANTIPROLIFERATIVO NEL CARCINOMA
TIROIDEO DIFFERENZIATO**

Tesi redatta con il contributo finanziario di Katjes Fassin GmbH & Co. KG

Coordinatore: Ch.mo Prof. Paolo Angeli

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Caterina Mian

Co-Supervisore: Dott.ssa Susi Barolo, dott. Loris Bertazza

Dottorando: Jacopo Manso

INDICE

1. RIASSUNTO	pag. 3
2. INTRODUZIONE	pag. 5
3. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 8
4. MATERIALI E METODI	pag. 8
4.1 Estrazione ed analisi del fitocomplesso di liquirizia	pag. 8
4.2 Studio degli effetti della liquirizia su colture cellulari di linee stabilizzate di PTC	pag. 9
4.3 Studio della vitalità cellulare	pag. 10
4.4 Studio della migrazione cellulare	pag. 11
4.5 Analisi di espressione genica del recettore per i mineralocorticoidi	pag. 11
4.6 Analisi dell'espressione proteica del recettore per i mineralocorticoidi	pag. 12
4.7 Analisi statistica	pag. 13
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 13
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag. 25
7. BIBLIOGRAFIA	pag. 26

1. ABSTRACT

Presupposti dello studio: L'aldosterone (Aldo) è il principale ormone steroideo ad azione mineralocorticoide prodotto dalle ghiandole surrenali. Nelle cellule bersaglio, l'Aldo esplica la propria azione attraverso il legame con il recettore per i mineralocorticoidi (MR). La liquirizia (Li) contiene più di 20 triterpenoidi e 300 flavonoidi. Sono vari i composti antitumorali isolati dalla Li, i cui possibili meccanismi anticancerogeni sono stati studiati in vitro e in vivo in modelli animali: tra questi l'acido glicirretinico (GA) induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare nella fase G2 e down-regola l'espressione di NF- κ B, del fattore di crescita endoteliale vascolare e MMP-9 in cellule di carcinoma prostatico e gastrico. Il GA è un noto agonista del MR. Non vi è invece alcun dato in letteratura sulla possibile presenza ed attività del MR sulle cellule di tiroide sana e di carcinoma papillare della tiroide (PTC).

Date queste premesse la Li potrebbe rappresentare una risorsa per la scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali per il carcinoma tiroideo differenziato (DTC).

Scopo dello studio: Questo progetto si poneva l'obiettivo di: 1) dimostrare per la prima volta in letteratura l'espressione genica (*NR3C2*) e proteica dell'MR nelle cellule tiroidee sane e patologiche (TH, GMN non tossico, PTC e sue varianti); 2) dimostrare l'espressione genica (*HSD11B2*) e proteica dell'enzima 11 β HSD2 nelle cellule tiroidee sane e patologiche; 3) studiare l'effetto in vitro dell'estratto di radice di Li e del suo principio attivo GA su colture cellulari di PTC. Successivamente, di studiare le vie molecolari implicate, aprendo la strada per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali per il trattamento del DTC.

Materiali e metodi: È stato estratto ed analizzato il fitocomplesso di Li (fito-Li). Il GA (MERK G85003-1G), l'Aldo (MERCK - A9477) e il canrenoato di potassio (MERCK - C7287) sono stati sciolti singolarmente in dimetil-solfossido. I prodotti così ottenuti sono stati utilizzati per tutti gli esperimenti. Sono state utilizzate due linee cellulari stabilizzate di carcinoma papillare tiroideo: BCPAP e K1. È stato studiato l'effetto della Li, sia sotto forma di fito-Li che di principio attivo GA, e del canrenoato di potassio (CA) sulla vitalità cellulare (test MTT) a 24h e 48h e sulla migrazione cellulare (test wound healing) a 24h su entrambe le linee cellulari. Dai campioni di tessuto tiroideo fresco congelato provenienti da 49 pazienti risultati affetti da PTC di cui 29 presentanti la controparte di tessuto sano è stato estratto l'RNA sia dal tessuto patologico (PTC) che dal parenchima tiroideo sano adiacente. Mediante RT-PCR è stata valutata l'espressione genica di *NR3C2*. Inoltre, è stata eseguita la RT-PCR per il gene *NR3C2* anche in 9 pazienti con PTC variante Hobnail e 3 pazienti affetti da carcinoma anaplastico tiroideo e 10 pazienti affetti da carcinoma midollare tiroideo. Per lo studio dell'espressione proteica del MR è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza (IF) associata alla microscopia confocale sia sui campioni di tessuto tiroideo fresco congelato che sulle due colture cellulari di PTC.

Risultati: I risultati del MTT test, eseguito nelle linee cellulari BCPAP e K1 esposte a dosaggi decrescenti di fito-Li o GA, mostrano complessivamente un significativo effetto di riduzione della vitalità cellulare dose-dipendente e tempo-dipendente (valutato a 24 e 48 h) per entrambi i composti e in entrambe le linee cellulari. Soprattutto nella linea cellulare BCPAP è evidente un'attenuazione dell'effetto di riduzione della vitalità cellulare a parità di concentrazione di fito-Li e GA dopo l'aggiunta di CA. Si evidenzia un chiaro effetto di

riduzione della migrazione cellulare in termini di percentuale di chiusura della “ferita” sia per il fito-Li (-37%) che per il GA (-18%) rispetto al controllo (DMSO) sulla linea cellulare BCPAP, Inoltre, si evidenzia un’ aumentata migrazione cellulare dopo incubazione con CA (+13%). Dopo co-incubazione con CA e fito-Li o GA si evidenzia un minor effetto di riduzione della migrazione rispetto alla fito-Li o GA da soli. Anche nella linea cellulare K1 si osserva una riduzione della migrazione cellulare sia per il fito-Li (-16%) che per GA (-20%). Inoltre, si evidenzia una aumentata migrazione cellulare dopo incubazione con CA (+14%). Tramite RT-PCR si dimostra un elevato livello di espressione dell’ mRNA per MR sia nella tiroide sana che nel PTC. Inoltre, si evidenzia una riduzione statisticamente significativa ($p=0.0002$) dell’ espressione del mRNA per MR nel PTC rispetto al tessuto sano tiroideo proveniente dal medesimo paziente. Inoltre, l’ espressione del MR è significativamente ridotta nel PTC variante Hobnail e nel carcinoma anaplastico rispetto al PTC variante classica e al tessuto tiroideo sano. Successivamente abbiamo dimostrato per la prima volta l’ espressione proteica del MR sia nelle cellule tiroidee sane che nel PTC e attraverso la quantificazione dell’ intensità del segnale di MR in IF abbiamo osservato una minor espressione proteica del MR nel PTC rispetto alla controparte sana (-39%). Dopo incubazione delle linee cellulari BCPAP e K1 con Aldo e come conferma della sua attivazione abbiamo evidenziato la migrazione del MR dal citoplasma al nucleo dopo 24 h.

Conclusioni: questo studio ha evidenziato per la prima volta in letteratura l’ espressione genica e proteica del MR sulle cellule tiroidee sane e tumorali, riconoscendo la tiroide come nuovo organo bersaglio dei mineralocorticoidi. Inoltre, ha generato le prime evidenze di un effetto antitumorale in vitro della Li e del suo principio attivo GA nel DTC, almeno in parte legate all’ attività agonista sul MR. La dimostrazione della riduzione dell’ espressione sia genica che proteica del MR sulle cellule di PTC in confronto al tessuto tiroideo sano è coerente con l’ effetto evidenziato di riduzione della vitalità cellulare e della migrazione cellulare in vitro verosimilmente mediato dal legame del GA con l’ MR: pertanto la perdita del MR potrebbe offrire un vantaggio replicativo alle cellule tumorali.

2. INTRODUZIONE

L'aldosterone (Aldo) è il principale ormone steroideo ad azione mineralocorticoide prodotto dalle ghiandole surrenali. Esso regola l'equilibrio idroelettrolitico dell'organismo aumentando il riassorbimento renale del sodio e l'escrezione renale di potassio e ioni idrogeno (1). La sua secrezione da parte della zona glomerulosa surrenalica è regolata dal sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone. Nelle cellule bersaglio, l'Aldo esplica la propria azione attraverso il legame con il recettore per i mineralocorticoidi (MR) a sede intracitoplasmatica e facente parte della più ampia famiglia dei recettori nucleari per gli ormoni steroidei. Il gene umano che codifica per l'MR è *NR3C2* (2). A conferire la specificità di azione ai mineralocorticoidi nelle cellule bersaglio contribuisce l'11 β -idrossisteroide-deidrogenasi tipo 2 (11 β HSD2), in grado di catalizzare la conversione del cortisolo in cortisone che non è pertanto più in grado di legare l'MR; l'Aldo è invece protetto dalla degradazione grazie all'emiacetale 11-18 (3).

L'Aldo esplica la sua azione attraverso effetti genomici (in ore-giorni) e non genomici (in secondi-minuti). Le cellule bersaglio dell'Aldo sono principalmente cellule epiteliali tra cui in particolare quelle renali (4). Tuttavia l'MR è localizzato anche in cellule non-epiteliali come i neuroni cerebrali (5), i cardiomiociti (6), le cellule muscolari lisce vascolari (3), le cellule endoteliali (7), i leucociti mononucleati (8,9), i pre-adipociti e gli adipociti (10,11) e negli eritrociti (12). Nelle cellule non epiteliali l'Aldo induce processi infiammatori, formazione di collagene, fibrosi e necrosi rendendolo a tutti gli effetti un fattore di rischio cardiovascolare determinando la progressione dell'aterosclerosi (13).

L'Aldo sembra avere anche un ruolo immunostimolante, infatti è stata dimostrata l'espressione dell'MR nelle cellule implicate nella risposta immunitaria innata ed adattiva: nei macrofagi, nelle cellule dendritiche (DCs), nei linfociti T e linfociti B naïve (8,14,15). Nei leucociti mononucleati (LMN) è stato dimostrato un incremento dei livelli di PAI-1 e p22(phox), i principali costituenti della NADPH ossidasi, dopo incubazione con Aldo, e una riduzione degli stessi dopo co-incubazione con canrenone (antagonista del MR), a conferma dell'azione pro-ossidante dei mineralocorticoidi (14). Herrada e collaboratori hanno dimostrato come l'attivazione dell'MR, in risposta all'Aldo, stimoli nelle DCs la via della MAP chinasi e induca tali cellule a secernere transforming growth factor beta (TGF- β) e interleuchina 6 (16). Inoltre, in risposta all'Aldo, le DCs attivano i linfociti T CD8+ e polarizzano la differenziazione dei linfociti T helper CD4+ verso il fenotipo T

helper 17 (TH-17) (17). Il fenotipo TH-17 è stato associato alla promozione dell'infiammazione e dei disturbi autoimmuni, in particolare nella tiroidite di Hashimoto (TH) (18,19).

In letteratura è poco indagata l'associazione tra iperaldosteronismo primario (IP) e tireopatie anche se vi sono alcune evidenze in tal senso. E' stato riscontrato un aumento significativo di prevalenza di TH in pazienti affetti da IP rispetto ai controlli sani normotesi comparabili per età, sesso, apporto iodico e area geografica (20). Un altro studio retrospettivo del nostro gruppo ha dimostrato una elevata prevalenza di gozzo multinodulare (GMN) non tossico nei pazienti con IP rispetto ai controlli (21). Molti meccanismi sono stati ipotizzati per spiegare questa associazione, ad esempio, la maggiore prevalenza di insulino-resistenza e sindrome metabolica nell'IP (22,23), il riscontro di una maggiore concentrazione di Aldo nei noduli colloidali benigni e la presenza di espressione di aldosterone-sintasi nel tessuto tiroideo (24). Ad ulteriore riprova del ruolo dell'Aldo nello stimolare la risposta autoimmunitaria e del possibile legame con la TH, Krysiak e colleghi nel 2011 hanno pubblicato il caso di un paziente con concomitante TH ed IP da adenoma surrenalico produttore Aldo, la cui rimozione chirurgica ha determinato un miglioramento del decorso clinico (in termini di funzionalità e riduzione autoimmunità tiroidea) della TH (25).

La liquirizia (Li) è una delle erbe più antiche ed utilizzate nella medicina tradizionale cinese. Tre piante officinali, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza inflata* Bat. e *Glycyrrhiza glabra* L. sono prescritte come Li. La Li contiene più di 20 triterpenoidi e 300 flavonoidi. Negli ultimi anni, molti studi hanno dimostrato che i composti attivi isolati dalla Li possiedono proprietà antitumorali, antimicrobiche, antivirali, antinfiammatorie, immunoregolatorie e molte altre attività che contribuiscono alla protezione del sistema nervoso, alimentare, respiratorio, endocrino e cardiovascolare (26). Sono vari i composti antitumorali isolati dalla Li, i cui possibili meccanismi anticancerogeni sono stati studiati in vitro e in vivo in modelli animali. Solo alcuni esempi sono: la glycyrrhizina che attenua i livelli di TNF- α e induce l'apoptosi attraverso le vie mitocondriali e caspasi-dipendenti nel carcinoma del colon e nella leucemia (27,28); il licochalcone A (LCA), un flavonoide estrogenico, blocca la progressione del ciclo cellulare alla transizione G2/M e induce l'apoptosi nel carcinoma gastrico (29), induce apoptosi da stress del reticolo endoplasmatico attraverso la via della fosfolipasi C γ 1-, Ca $^{2+}$ - e la via delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel carcinoma epatico (30), induce apoptosi attraverso la via del recettore caspasi-dipendente Fas1-mediato nel carcinoma orale (31); la glabridina (GLD) inibisce la migrazione, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule umane di adenocarcinoma

mammario MDA-MB-231 inibendo la via di segnalazione FAK/Rho (32) e il suo effetto sulla crescita delle cellule tumorali mammarie è bifasico, ovvero a basse concentrazioni mostra un effetto di stimolo sulla crescita cellulare dipendente dal legame con il recettore per gli estrogeni (ER) mentre ad alte concentrazioni ha un effetto antiproliferativo indipendente dal ER (33). L'acido glicirretinico (GA) induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare nella fase G2 e down-regola l'espressione di NF- κ B, del fattore di crescita endoteliale vascolare e MMP-9 in cellule di carcinoma prostatico e gastrico (34,35).

Inoltre, molti studi hanno dimostrato, sia in vitro che in vivo, che i composti attivi estratti dalla Li possiedono proprietà antinfiammatorie e immunoregatorie come il GA (26). Il nostro gruppo ha dimostrato che il GA si lega all'MR e blocca l'11 β HSD2 esibendo un'attività pro-infiammatoria in vitro nei LMN simile a quella dell'Aldo (36,37), mentre la somministrazione dell'estratto di radice di Li ha un'azione antinfiammatoria e anti-sclerotica come dimostrato da studi su animali e umani (38–40). Questa discrepanza è probabilmente legata alla presenza nell'estratto della radice di Li della GLD che ha un'azione estrogeno-simile e antinfiammatoria.

Gli estrogeni sono un potente fattore di crescita sia per le cellule tiroidee benigne che maligne e ciò potrebbe spiegare la maggiore prevalenza dei noduli tiroidei e del carcinoma tiroideo nel sesso femminile. Tuttavia, a differenza di altri tumori, non vi è ancora una conoscenza dettagliata sull'impatto degli estrogeni nel carcinoma tiroideo (41). La presenza del ER è stata dimostrata con percentuali differenti nel tessuto tiroideo normale, negli adenomi tiroidei, nel GMN e nel carcinoma tiroideo differenziato (DTC) (42). Diversi studi hanno dimostrato la presenza del ER nel carcinoma papillare della tiroide (PTC) con percentuale variabile tra il 40-67% (43). In particolare l'ER α sembra esacerbare lo sviluppo del PTC mentre il ER β sembra giocare un ruolo protettivo (44). Non è chiaro l'impatto prognostico della presenza del ER nel PTC essendo alcuni studi a favore di una maggiore aggressività del PTC ER positivi (45,46) ed altri contrari (47).

Non vi è invece alcun dato in letteratura sulla possibile presenza ed attività del MR sulle cellule di tiroide sana e di PTC.

Date queste premesse la Li rappresenta un'interessante e promettente risorsa per la scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali e potrebbe rappresentare una nuova risorsa per il trattamento del DTC.

3. SCOPO DEL PROGETTO

Questo progetto si poneva l'obiettivo di:

- 1) dimostrare per la prima volta in letteratura l'espressione genica (*NR3C2*) e proteica dell'MR nelle cellule tiroidee sane e patologiche (TH, GMN non tossico, PTC e sue varianti);
- 2) dimostrare l'espressione genica (*HSD11B2*) e proteica dell'enzima 11 β HSD2 nelle cellule tiroidee sane e patologiche;
- 3) studiare l'effetto in vitro dell'estratto di radice di Li e del suo principio attivo GA su colture cellulari di PTC. Successivamente, di studiare le vie molecolari implicate, aprendo la strada per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali per il trattamento del DTC.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Estrazione ed analisi del fitocomplesso di liquirizia

La radice di Li è stata frantumata con pestello. Il prodotto ottenuto è stato quindi estratto con etanolo all'80% per 24 ore a 4 ° C. Successivamente la miscela è stata filtrata su carta da filtro Whatman n ° 1 e la soluzione risultante è stata centrifugata per eliminare il particolato. Il solvente etanolo è stato rimosso a pressione ridotta utilizzando un evaporatore sottovuoto rotante a temperatura controllata (Rotavapor R-210, Flawil, Svizzera). L'estratto grezzo di Li è stato successivamente pesato e sciolto in dimetil-solfossido (DMSO) (p/v) per facilitare la solubilità del prodotto. Questo estratto grezzo di Li + DMSO (fito-Li) è stato utilizzato per tutti gli esperimenti, suddiviso in aliquote e conservato a -80 ° C. Dopo lo scongelamento, ciascuna aliquota è stata utilizzata una sola volta. Abbiamo inoltre analizzato, in collaborazione con il dipartimento di scienze del farmaco, l'estratto grezzo di Li così ottenuto in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) riscontrando una netta prevalenza di GA e di Saponine G2 e B2, tabella 1.

retention time (min)	identification	[M-H]-	fragmentation	estratto a caldo di liquirizia 02/11/2020 mg/g	estratto a caldo di liquirizia 24/03/2021 mg/g
14.3	licorice saponin G2 isomer 1	837	775 661 351	1.17±0.02	0,80±0.01
15.0	licorice saponin G2 isomer 2	837	745 631 351	0.24±0.01	0.22±0.01
15.6	glycyrrhizin (glycyrrhizic acid) *	821	759 645 351	7.38±0.02	5.51±0.02
15.9	licorice saponin B2	807	745 631 351	4.30±0.01	2.65±0.02
16.4	glycyrrhizic acid isomer 1	821	759 645 351	0.49±0.01	0.09±0.01
16.7	licorice saponin B2 isomer	807	745 631 351	2.95±0.02	1.91±0.01
			total	16.52	11.19

Tabella 1. Analisi in HPLC dei principali principi attivi del nostro estratto grezzo di Li

Il GA (MERK G85003-1G), l'Aldo (MERCK - A9477) e il canrenoato di potassio (MERCK - C7287) sono stati sciolti singolarmente in DMSO. I prodotti così ottenuti sono stati utilizzati per tutti gli esperimenti, suddivisi in aliquote e conservati a -80 ° C. Dopo lo scongelamento, ciascuna aliquota è stata utilizzata una sola volta.

4.2 Studio degli effetti della liquirizia su colture cellulari di linee stabilizzate di PTC

Sono state utilizzate due linee cellulari stabilizzate di carcinoma papillare tiroideo: BCPAP e K1. Le linee cellulari BCPAP presentano la mutazione BRAF V600E, TERT e TP53, mentre le K1 presentano le mutazioni BRAF V600E e PI3KCA E542K e TP53. Entrambe derivano dalla European Collection of Cell Cultures (ECACC, Sigma-Aldrich, Milano, Italy). Le due linee sono state coltivate in RPMI 1640 (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS; Gibco), L-glutammina (2 mM) e penicillina streptomycina (100 IU/ml–100 µg/ml). Le linee cellulari stabilizzate aderiscono in monostrato in fiasche di coltura T-75 e vengono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C con il 5% di CO2 sino a quando raggiungono il 90% di confluenza. Raggiunta tale soglia le cellule

vengono staccate utilizzando la tripsina-EDTA 0.05% (Sigma-Aldrich) e piastrate in una nuova fiasca di coltura T-75 alla densità prescelta

L'effetto della Li, sia sotto forma di fito-Li che di principio attivo GA, è stato testato in vitro in 2 linee cellulari umane di carcinoma papillare tiroideo (BCPAP e K1) al fine di valutarne gli effetti sulla vitalità cellulare (test MTT) e sulla migrazione cellulare (test wound healing). L'effetto è stato valutato con concentrazioni decrescenti di fito-Li e GA e a diversi tempi di trattamento. Lo stesso è stato eseguito anche per il CA e la combinazione di quest'ultimo con fito-LI e GA.

4.3 Studio della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante test MTT per determinare gli effetti in vitro di fito-Li e GA in entrambe le linee cellulari di PTC. L'MTT è un test colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura e quindi di valutare l'effetto del trattamento con un contaminante sulla vitalità della popolazione cellulare. Il test si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]) di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione dell'MTT porta alla formazione di cristalli di formazano impermeabili alle membrane cellulari: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula vitale, ma non l'uscita del prodotto correttamente metabolizzato. La reazione è perciò direttamente proporzionale al grado di attività metabolica delle cellule. La trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, a causa della formazione nelle cellule vitali dei granuli di formazano blu che si formano durante la reazione di riduzione. Nelle cellule morte invece non si formeranno i granuli di formazano, non possedendo enzimi mitocondriali attivi, ed i sali di tetrazolio resteranno disciolti nel terreno di coltura. Al termine del trattamento in piastre da 96 pozzetti, vengono aggiunti 20 µL per pozzetto di una soluzione 5 mg/ml di MTT, e si incuba a 37°C per un tempo massimo di 4 ore. Al termine dell'incubazione il terreno viene rimosso ed i cristalli di formazano vengono disciolti in 100 µL per pozzetto di DMSO. Si mette in agitazione la piastra per permettere il completo scioglimento dei cristalli, quindi si ricavano i valori di assorbanza mediante lettura allo spettrofotometro (Victor, Perkin Elmer) alla lunghezza d'onda di 550 nm, sottraendo il valore di background ottenuto leggendo contemporaneamente alla lunghezza d'onda di 620 nm.

4.4 Studio della migrazione cellulare

La migrazione cellulare è stata valutata mediante il test “wound healing” per determinare gli effetti in vitro di fito-Li, GA, canrenoato di potassio (CA) e la combinazione di CA con fito-Li o GA in entrambe le linee cellulari BCPAP e K1. Il test “wound healing” si esegue separando le cellule di una coltura cellulare attraverso un puntale e andando a misurare successivamente attraverso un microscopio ad alto ingrandimento l’eventuale chiusura della “ferita” così ottenuta ad alcuni tempi prestabiliti in più punti della coltura. Sono stati scelti come tempi di osservazione 4 ore e 6 ore e 24 h, dopo alcune analisi preliminari sulle linee cellulari in studio e vista l’elevata velocità di crescita delle due linee cellulari BCPAP e K1. Per valutare l’effetto finale sulla migrazione cellulare è stato scelto il tempo a 24 h. La misura del delta di chiusura è stata normalizzata per la dimensione iniziale di ogni ferita.

4.5 Analisi di espressione genica del recettore per i mineralocorticoidi

Dai campioni di tessuto tiroideo fresco congelato provenienti da 49 pazienti risultati affetti da PTC di cui 29 presentanti la controparte di tessuto sano è stato estratto l’RNA sia dal tessuto patologico (PTC) che dal parenchima tiroideo sano adiacente. La popolazione in studio era così costituita: 16 uomini e 33 donne.

Mediante real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) è stata valutata l’espressione genica di *NR3C2*.

Inoltre, è stata eseguita la RT-PCR per il gene *NR3C2* anche in 9 pazienti con PTC variante Hobnail e 3 pazienti affetti da carcinoma anaplastico tiroideo e 10 pazienti affetti da carcinoma midollare tiroideo.

Il cDNA per la quantificazione dell’espressione genica è stato sintetizzato usando un cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Milan, Italy) ad alta capacità, seguendo le istruzioni del produttore.

La RT-PCR è stata eseguita in un ABI-PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems, Milan, Italy) usando il metodo della quantificazione relativa (2-DDCt method), come già descritto altrove (48). I livelli di espressione dell’mRNA sono stati calcolati con il Sequence Detection Software rel. 2.4 (Applied Biosystems, Milan, Italy) usando il 2-DDCt method e normalizzando per il gene “housekeeping” ACTB (Hs99999903_m1). Tutte le reazioni in tempo reale sono state realizzate in triplicato.

4.6 Analisi dell'espressione proteica del recettore per i mineralocorticoidi

Per lo studio dell'espressione proteica del MR è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza (IF) associata alla microscopia confocale.

Le cellule sono state seminate alla concentrazione opportuna in piastre da 12 pozzetti contenenti un vetrino polilisinato. Dopo 24 ore, sono state trattate e dopo ulteriori 24 ore sono state fissate in PFA al 2% per 20 minuti, permeabilizzate con Triton X-100 allo 0.5% in PBS per 15 minuti. Tutti i passaggi sono stati eseguiti a temperatura ambiente.

I vetrini sono stati incubati con un anticorpo primario per l'individuazione di MR (Invitrogen mouse *NR3C2* Monoclonal antibody H10E4C9F, REF MA1-620) e secondario (anti mouse-FITC Sigma F0257) precedentemente diluiti in PBS contenente 0.5% di BSA. L'anticorpo primario è stato diluito 1:100 e incubato a 4°C overnight, mentre l'anticorpo secondario è stato incubato 1:300 a 37°C per 1 ora. I nuclei sono stati colorati con DRAQ-5 1:300. Infine, i vetrini sono stati montati con la soluzione anti-fade Mowiol. L'analisi dei campioni cellulari (BCPAP e K1 in presenza di vari trattamenti) è stata effettuata mediante microscopia confocale (Leica TCS SP8, Leica Microsystems) con un intervallo z di 1 µm utilizzando un obiettivo a immersione in olio 63x/1.4 (dimensione dell'immagine 1024x1024 pixel).

L'analisi di tali immagini è stata effettuata quantificando la presenza di MR all'interno del nucleo delle cellule misurando l'intensità media del segnale in 9 ROIs per ogni immagine.

Le sezioni di tessuto tiroideo incluse in paraffina (fornite dal Prof. Pennelli- Anatomia Patologica) sono state incubate con i medesimi anticorpi dei campioni cellulari sopra descritti.

Per l'analisi dei campioni di tessuto di pazienti è stato utilizzato il microscopio a fluorescenza Leica DMI6000CS (Leica Microsystems) e i campioni sono stati analizzati utilizzando obiettivi a contrasto di interferenza differenziale (DIC) e fluorescenza. Le immagini sono state acquisite con obiettivo 10x0.25 dry (dimensione dell'immagine 1024x1024 pixel).

Al momento dell'analisi, per ogni immagine è stata misurata l'intensità di fluorescenza del marcatore per MR, normalizzata per l'intensità di segnale del colorante nucleare.

Tutte le immagini sono state acquisite utilizzando una fotocamera DFC365FX ed elaborate utilizzando Leica Application Suite (LAS-AF) 3.1.1. software (Leica Microsystems).

Le immagini del tessuto sano e malato ottenute mediante immunistoichimica sono state fornite dal Prof. Pennelli (Anatomia Patologica).

4.7 Analisi statistica

Il test di Shapiro-Wilk è stato usato per valutare la distribuzione normale di ogni variabile in studio.

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard per le variabili distribuite normalmente e come mediane con il loro range interquartile (IQR) per quelle che non erano

Il test di Mann-Whitney, il test di Wilcoxon per i dati appaiati e il test t di Student sono stati usati per confrontare i livelli di espressione genica (mRNA) e proteica (intensità del segnale in IF) tra PTC e la sua controparte sana, come appropriato.

Un valore della $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del MTT test, eseguito nelle linee cellulari BCPAP e K1 esposte a dosaggi decrescenti di fito-Li o GA, mostrano complessivamente un significativo effetto di riduzione della vitalità cellulare dose-dipendente e tempo-dipendente (valutato a 24 e 48 h) per entrambi i composti e in entrambe le linee cellulari, come mostrato nelle **Figura 1, 2, 3, 4**.

Al crescere delle concentrazioni di fito-Li e GA e del tempo di incubazione la vitalità cellulare decresce significativamente in entrambe le linee cellulari. Alle massime concentrazioni l'effetto è più marcato per la fito-Li rispetto al GA in entrambi le linee cellulari, sia a 24h che a 48 h, **Figura 1, 2, 3, 4**. Questo è verosimilmente imputabile alla presenza nel fito-Li di molteplici principi attivi che alle massime concentrazioni interferiscono maggiormente con la vitalità cellulare.

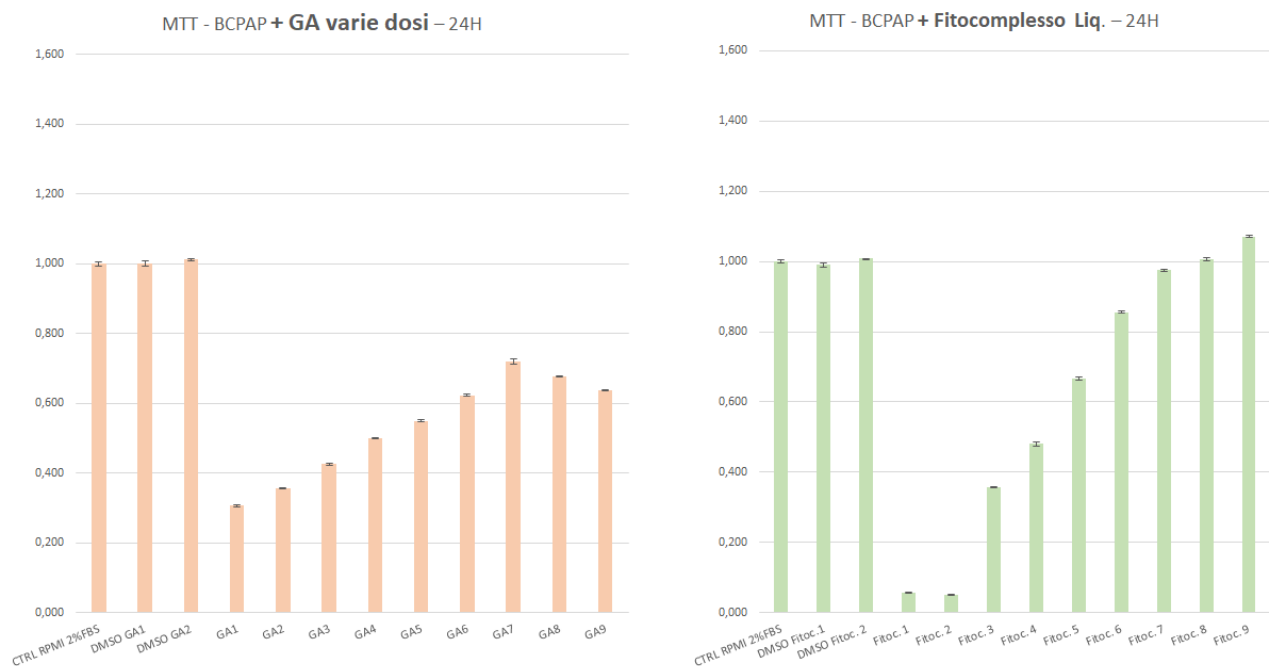


Figura 1. Test di vitalità cellulare MTT valutato a 24 h su cellule BCPAP a dosi decrescenti di acido glicirretinico (GA), e fitocomplesso di Li (Fitoc). **A)** DMSO GA1 e GA2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di GA; GA1: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,100 ug/ul; GA2: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,067 ug/ul; GA3: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,044 ug/ul; GA4: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,030 ug/ul; GA5: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,020 ug/ul; GA6: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,013 ug/ul; GA7: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,009ug/ul; GA8: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,006 ug/ul; GA9: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,004 ug/ul. **B)** DMSO Fitoc.1 e Fitoc.2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di Fitoc; Fitoc.1: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,4 ug/ul; Fitoc.2: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,3 ug/ul; Fitoc.3: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,225 ug/ul; Fitoc.4: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,169 ug/ul; Fitoc.5: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,127 ug/ul; Fitoc.6: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,095 ug/ul; Fitoc.7: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,071 ug/ul; Fitoc.8: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,053 ug/ul; Fitoc.9: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,04 ug/ul

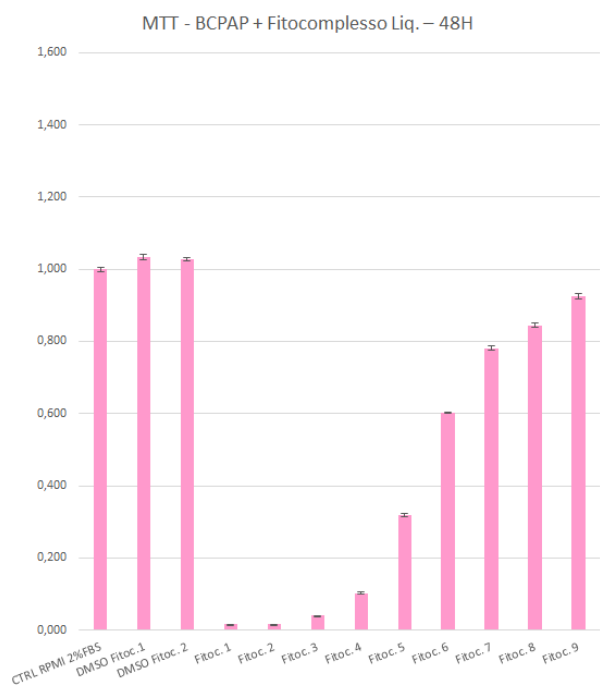
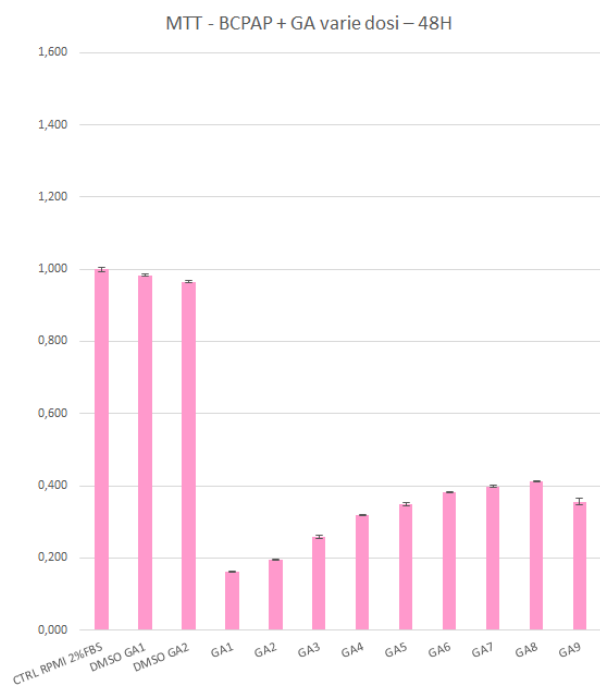


Figura 2. Test di vitalità cellulare MTT valutato a 48 h su cellule BCPAP a dosi decrescenti di acido glicirretinico (GA), e fitocomplesso di Li (Fitoc). **A)** DMSO GA1 e GA2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di GA; GA1: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,100 ug/ul; GA2: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,067 ug/ul; GA3: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,044 ug/ul; GA4: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,030 ug/ul; GA5: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,020 ug/ul; GA6: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,013 ug/ul; GA7: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,009ug/ul; GA8: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,006 ug/ul; GA9: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,004 ug/ul. **B)** DMSO Fitoc.1 e Fitoc.2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di Fitoc; Fitoc.1: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,4 ug/ul; Fitoc.2: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,3 ug/ul; Fitoc.3: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,225 ug/ul; Fitoc.4: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,169 ug/ul; Fitoc.5: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,127 ug/ul; Fitoc.6: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,095 ug/ul; Fitoc.7: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,071 ug/ul; Fitoc.8: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,053 ug/ul; Fitoc.9: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,04 ug/ul

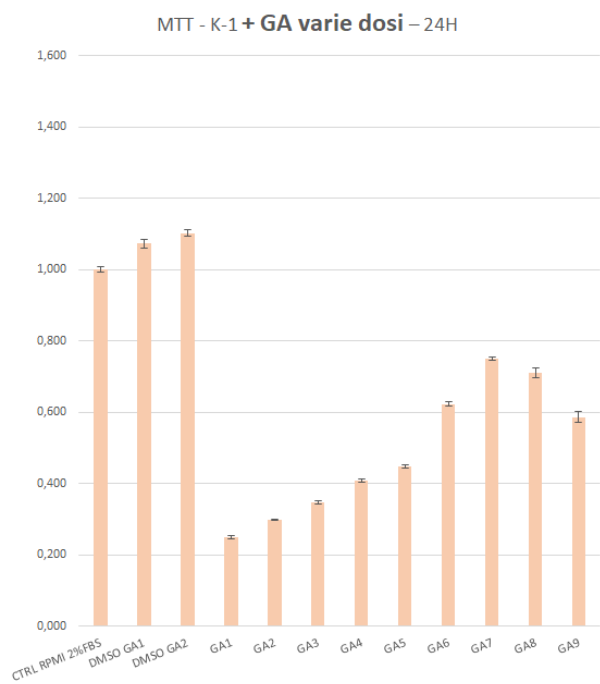


Figura 3. Test di vitalità cellulare MTT valutato a 24 h su cellule K1 a dosi decrescenti di acido glicirretinico (GA), e fitocomplesso di Li (Fitoc). **A)** DMSO GA1 e GA2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di GA; GA1: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,100 ug/ul; GA2: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,067 ug/ul; GA3: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,044 ug/ul; GA4: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,030 ug/ul; GA5: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,020 ug/ul; GA6: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,013 ug/ul; GA7: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,009nug/ul; GA8: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,006 ug/ul; GA9: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,004 ug/ul. **B)** DMSO Fitoc.1 e Fitoc.2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di Fitoc; Fitoc.1: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,4 ug/ul; Fitoc.2: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,3 ug/ul; Fitoc.3: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,225 ug/ul; Fitoc.4: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,169 ug/ul; Fitoc.5: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,127 ug/ul; Fitoc.6: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,095 ug/ul; Fitoc.7: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,071 ug/ul; Fitoc.8: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,053 ug/ul; Fitoc.9: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,04 ug/ul

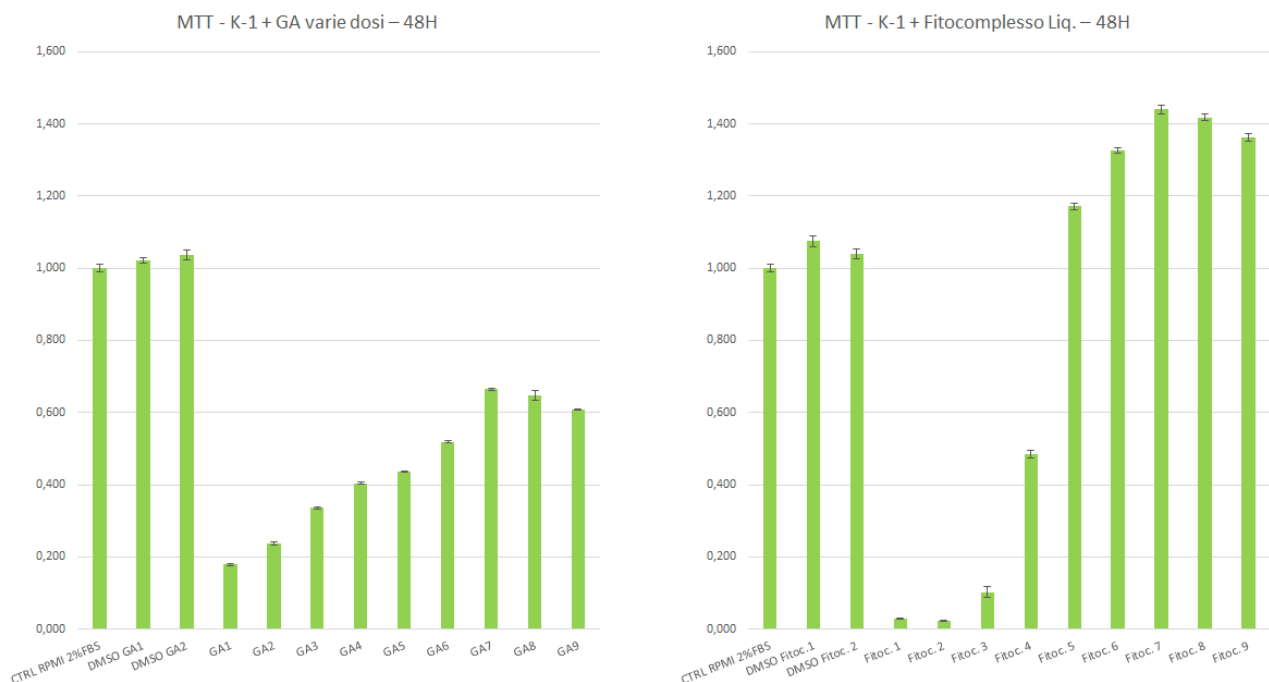


Figura 4. Test di vitalità cellulare MTT valutato a 48 h su cellule K1 a dosi decrescenti di acido glicirretinico (GA), e fitocomplesso di Li (Fitoc). **A)** DMSO GA1 e GA2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di GA; GA1: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,100 ug/ul; GA2: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,067 ug/ul; GA3: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,044 ug/ul; GA4: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,030 ug/ul; GA5: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,020 ug/ul; GA6: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,013 ug/ul; GA7: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,009nug/ul; GA8: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,006 ug/ul; GA9: incubazione con concentrazione di GA pari a 0,004 ug/ul. **B)** DMSO Fitoc.1 e Fitoc.2: incubazione cellule con il solo DMSO a concentrazione pari a quella presente alle due concentrazioni massime di Fitoc; Fitoc.1: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,4 ug/ul; Fitoc.2: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,3 ug/ul; Fitoc.3: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,225 ug/ul; Fitoc.4: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,169 ug/ul; Fitoc.5: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,127 ug/ul; Fitoc.6: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,095 ug/ul; Fitoc.7: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,071 ug/ul; Fitoc.8: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,053 ug/ul; Fitoc.9: incubazione con concentrazione di Fitoc pari a 0,04 ug/ul

È stato quindi calcolato l'“half maximal inhibitory concentration” (IC50) sia per la fito-Li sia per il GA in entrambe le linee cellulari, **Figura 5**. Lo stesso è stato eseguito anche per il canrenoato di potassio (CA).

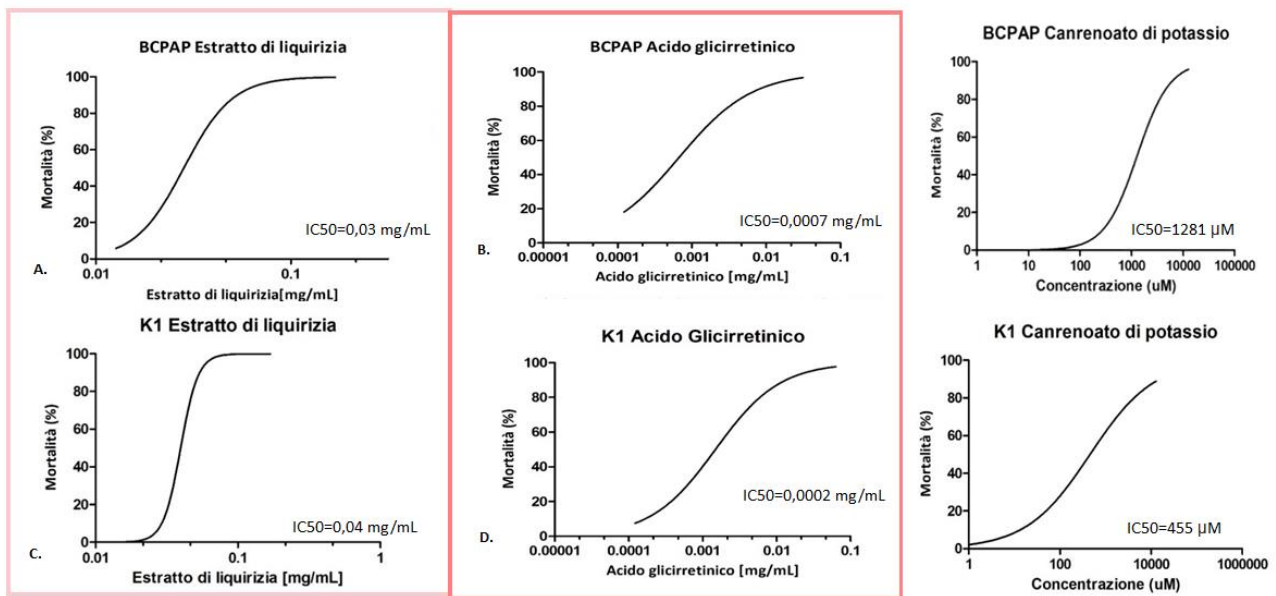


Figura 5. MTT curva dose-risposta e calcolo IC50 a 24h per fito-Li, acido glicirretinico e canrenoato di potassio nelle linee cellulari BCPAP e K1.

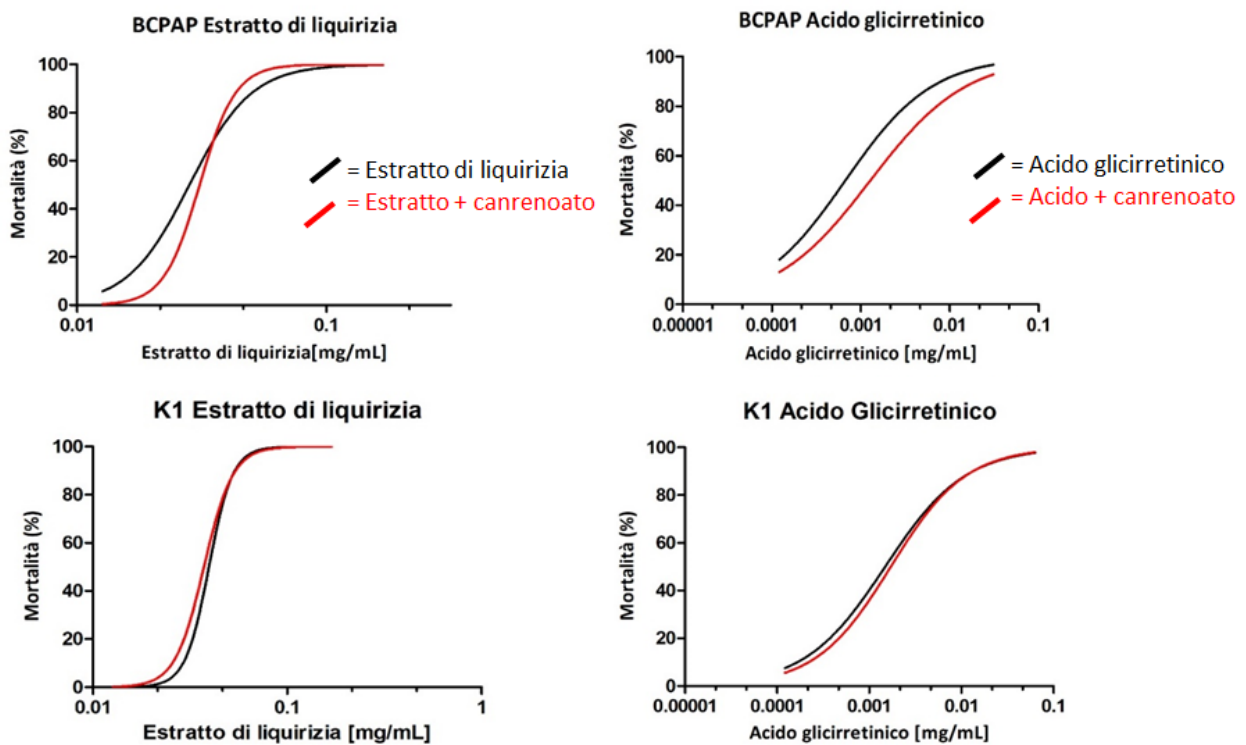


Figura 6. MTT curva dose-risposta per fito-Li e acido glicirretinico con aggiunta di canrenoato di potassio alla sua concentrazione IC50 nelle linee cellulari BCPAP e K1.

Come mostrato in **Figura 6**, soprattutto nella linea cellulare BCPAP è evidente un'attenuazione dell'effetto di riduzione della vitalità cellulare a parità di concentrazione di fito-Li e GA dopo l'aggiunta di CA alla sua IC50. Dato che il CA è un antagonista selettivo del MR è verosimile che l'effetto di riduzione della vitalità cellulare sulle linee di PTC sia almeno in parte mediato dal legame con MR, di cui tuttavia non è nota in letteratura la presenza sulle cellule tiroidee.

È interessante notare come il fito-Li alle concentrazioni minori abbia un effetto stimolante sulla vitalità cellulare solo nella linea cellulare K1, **Figura 3 e 4**. Si può ipotizzare che l'effetto sulla vitalità cellulare di alcuni principi attivi presenti nel fitocomplesso sia dipendente sia dal substrato genetico della cellula (le linee cellulari K1 presentano mutazione di BRAF, PI3KCAe TP53) che dalla concentrazione.

Per quanto riguarda lo studio dell'effetto sulla migrazione cellulare in vitro del fito-Li e del GA sulle due linee di PTC, alla luce delle precedenti curve dose-risposta MTT ottenute, sono state selezionate come concentrazioni efficaci per valutarne l'effetto l'IC50 dei rispettivi composti.

Dai risultati analizzati dopo 24 h di incubazione emerge:

-un netto effetto di riduzione della migrazione cellulare in termini di percentuale di chiusura della "ferita" sia per il fito-Li (-37%) che per il GA (-18%) rispetto al controllo (DMSO) sulla linea cellulare BCPAP, con effetto maggiore da parte del fito-Li. Inoltre, si evidenzia un'aumentata migrazione cellulare dopo incubazione con CA (+13%). Dopo co-incubazione con CA e fito-Li o GA si evidenzia un minor effetto di riduzione della migrazione rispetto alla fito-Li o GA da soli, **Figura 7**;

- un netto effetto di riduzione della migrazione cellulare in termini di percentuale di chiusura della "ferita" sia per il fito-Li (-16%) che per GA (-20%) sulla linea cellulare K1, con effetto maggiore da parte del GA. Inoltre, si evidenzia una aumentata migrazione cellulare dopo incubazione con CA (+14%). Dopo co-incubazione con CA e fito-Li o GA si evidenzia un aumento della migrazione cellulare rispetto alla fito-Li o GA da soli, **Figura 7**.

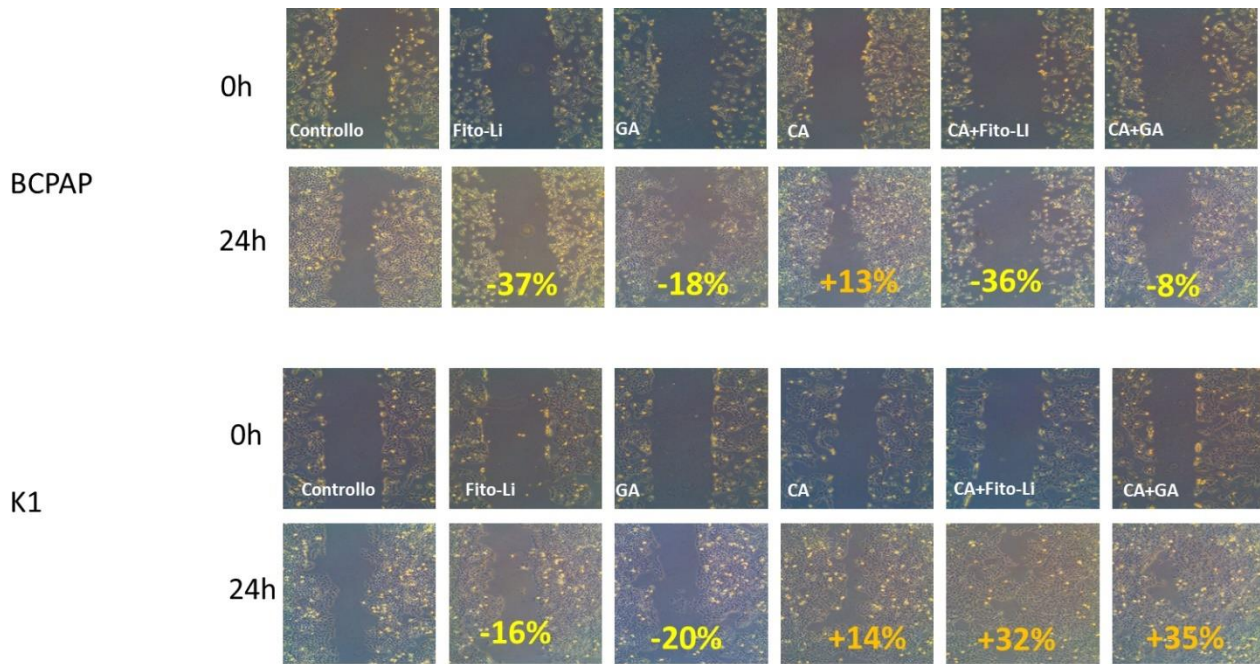


Figura 7. Test wound healing sulle linee cellulari BCPAP e K1 valutato a 24 ore di incubazione con o senza fito-Li, GA, CA o la combinazione di questi.

Si può ipotizzare che il differente effetto del fito-Li e del GA sulla migrazione cellulare osservato nelle due linee cellulari sia dipendente dal diverso substrato genetico della cellula (le due linee cellulari differiscono per tipi di mutazione) e dall'interazione dei molteplici principi attivi del fito-Li con quest'ultimo.

È interessante notare come il CA stimoli la migrazione cellulare per verosimile antagonismo con il MR presente sulle cellule.

Abbiamo escluso un possibile effetto tossico del DMSO sulle linee cellulari come mostrato dalla assenza di alterazione della vitalità (MTT) quando le colture cellulari sono state trattate isolatamente con la medesima concentrazione di DMSO presente nelle due concentrazioni massime di fito-Li e GA, vedi 2° e 3° colonna delle **Figure 1,2,3,4**. Pertanto, gli effetti evidenziati sulla vitalità cellulare e sulla migrazione cellulare sulle due linee cellulari di PTC in studio sono effettivamente imputabili al fito-Li, al GA e al CA.

Alla luce dell'effetto del GA di riduzione della vitalità cellulare e migrazione cellulare su entrambe le linee di PTC, l'effetto opposto osservato sulla migrazione cellulare da parte del CA e considerato che il GA e il CA si legano al MR (49), abbiamo teorizzato la presenza del MR anche sulle cellule tiroidee ed in particolare nel PTC. La presenza del MR sulle cellule tiroidee non è mai stata dimostrata in Letteratura.

Pertanto, mediante RT-PCR è stata valutata l'espressione genica di *NR3C2* (recettore dei mineralocorticoidi) dai campioni di tessuto tiroideo fresco congelato provenienti da 49 pazienti risultati affetti da PTC di cui 29 presentanti la controparte di tessuto sano. La popolazione in studio era così costituita: 16 uomini e 33 donne di età compresa tra i 5-63 anni (età mediana 45 anni). I tumori presentavano la mutazione somatica di BRAF nel 43 % dei casi, TERT nel 8% e 1 paziente presentava entrambe le mutazioni di BRAF e TERT.

Come mostrato in **Figura 8**, si dimostra per la prima volta in letteratura un elevato livello di espressione dell'mRNA per il MR, sia nella tiroide sana che nel PTC. Inoltre, si evidenzia una riduzione statisticamente significativa ($p=0.0002$) dell'espressione del mRNA per MR nel PTC (mediana 0.95, IQR 0.09 to 1.64) rispetto al tessuto sano tiroideo (mediana 1.28, IQR 0.14 to 3.60) proveniente dal medesimo paziente.

Come analisi preliminare abbiamo eseguito l'analisi dell'espressione genica del MR anche su tessuti di forme più aggressive di carcinoma tiroideo: il PTC variante Hobnail e il carcinoma anaplastico. Come mostrato in **Figura 9**, l'espressione del MR è significativamente ridotta in queste forme più aggressive rispetto al PTC variante classica e al tessuto tiroideo sano.

Inoltre, è stata eseguita l'analisi anche su 10 pazienti operati di carcinoma midollare della tiroide in cui non è stata rilevata espressione a livello genico del MR.

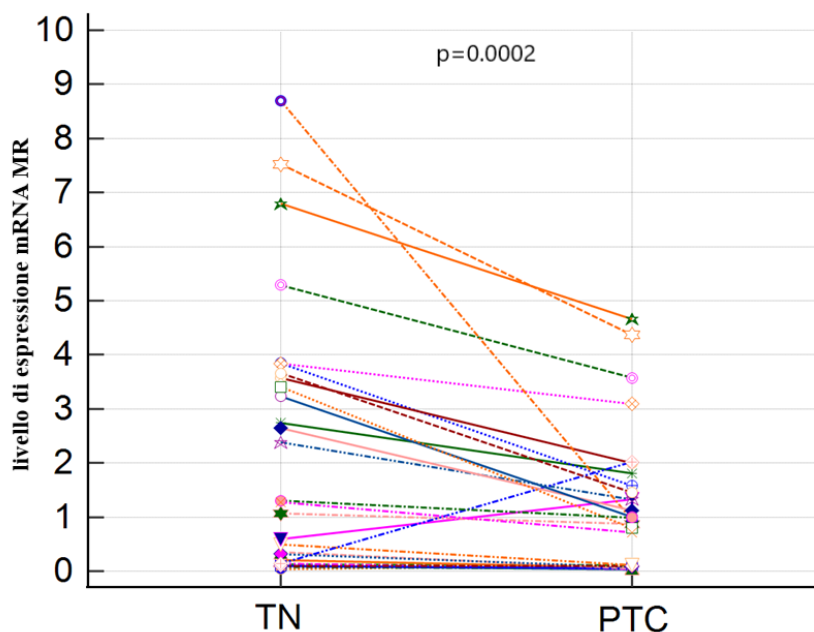


Figura 8. Livelli di espressione genica del gene *NR3C2* (recettore dei mineralocorticoidi). MR= recettore dei mineralocorticoidi; PTC= carcinoma papillare della tiroide; TN= tessuto normale tiroideo.

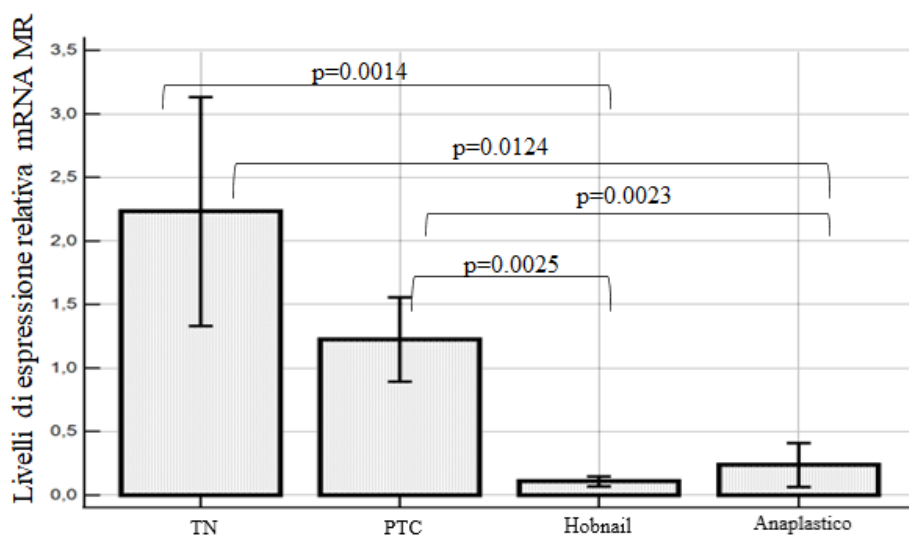


Figura 9. Livelli di espressione genica del gene *NR3C2* (recettore dei mineralocorticoidi) in diverse varianti di carcinoma tiroideo. MR= recettore dei mineralocorticoidi; PTC= carcinoma papillare della tiroide; TN= tessuto normale tiroideo;

Dopo aver dimostrato l'espressione genica del MR nel tessuto tiroideo sano e in misura minore anche nel PTC abbiamo indagato l'espressione proteica del MR mediante IF abbinata alla microscopia confocale nei medesimi campioni. Come si può vedere in **Figura 10 A e B**, abbiamo dimostrato per la prima volta la presenza del MR sia nelle cellule tiroidee sane che nel PTC. Attraverso la quantificazione dell'intensità del segnale di MR in IF abbiamo inoltre trovato una minor espressione proteica statisticamente significativa ($p=0.0167$) del MR nel PTC (media 0.44 ± 0.03) rispetto alla controparte sana (media 0.71 ± 0.09) con una riduzione di circa il 39%, **Figura 11**.

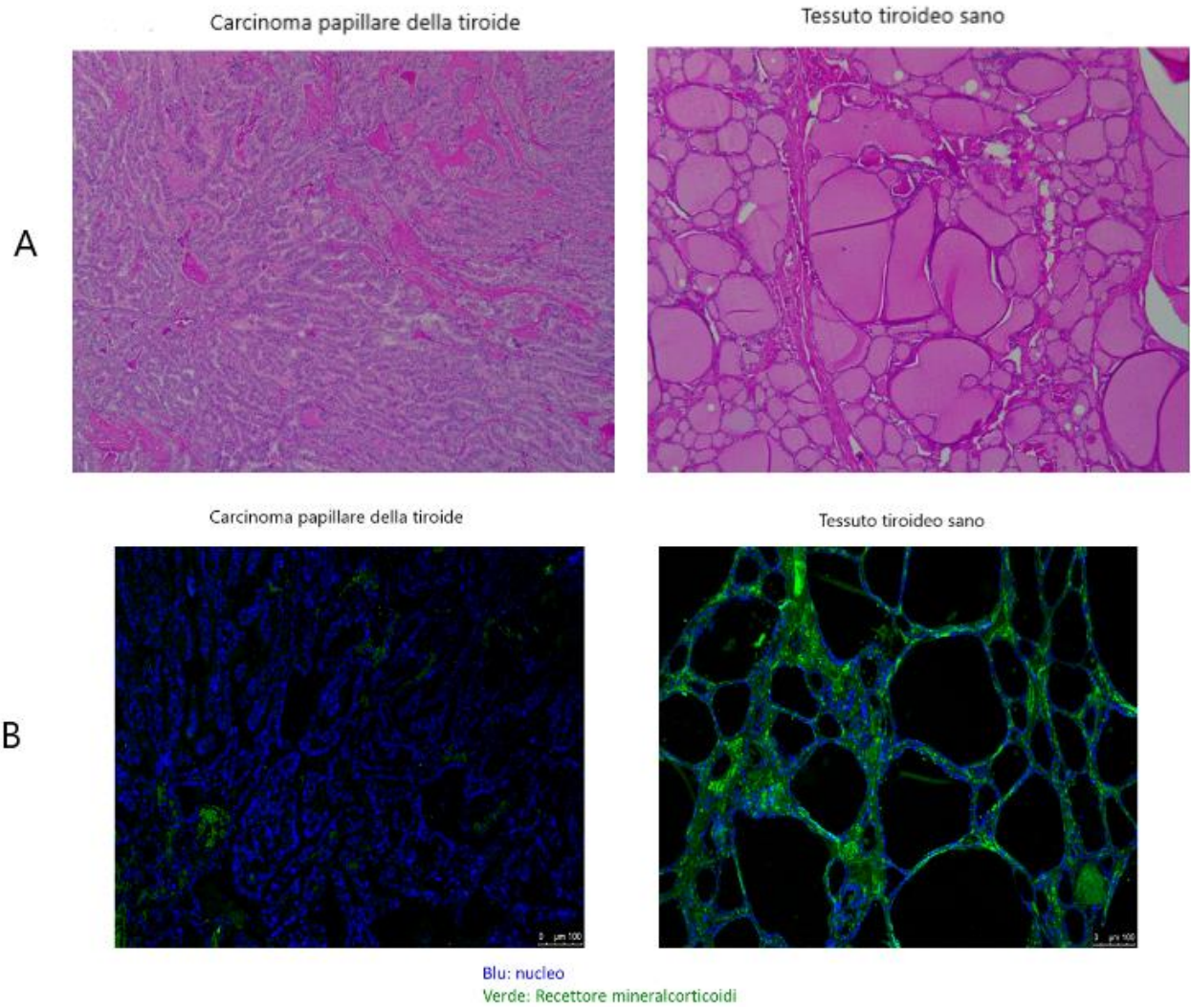


Figura 10 A e B. A) Immunoistochimica di tessuto di carcinoma papillare della tiroide e controparte sana. B) Immunofluorescenza per il recettore dei mineralocorticoidi nel medesimo tessuto in microscopia confocale

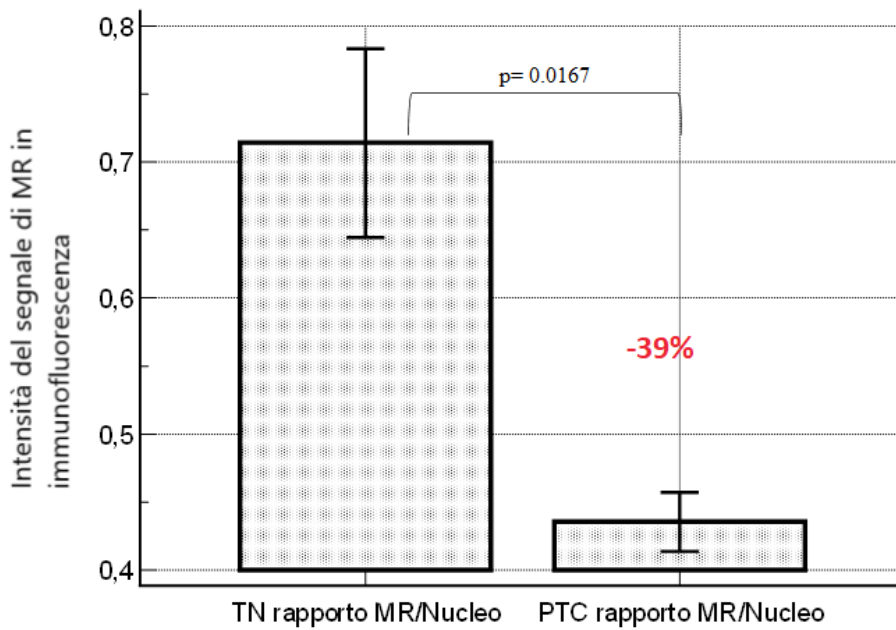


Figura 11. Quantificazione del segnale in immunofluorescenza per il recettore dei mineralocorticoidi associata alla microscopia confocale nel tessuto tiroideo sano versus carcinoma papillare della tiroide. PTC= carcinoma papillare della tiroide; TN= tessuto tiroideo sano.

Come per l'espressione genica si conferma una riduzione della presenza del MR nell'istotipo più aggressivo di PTC (Hobnail) rispetto alla variante classica di PTC, **Figura 12.**

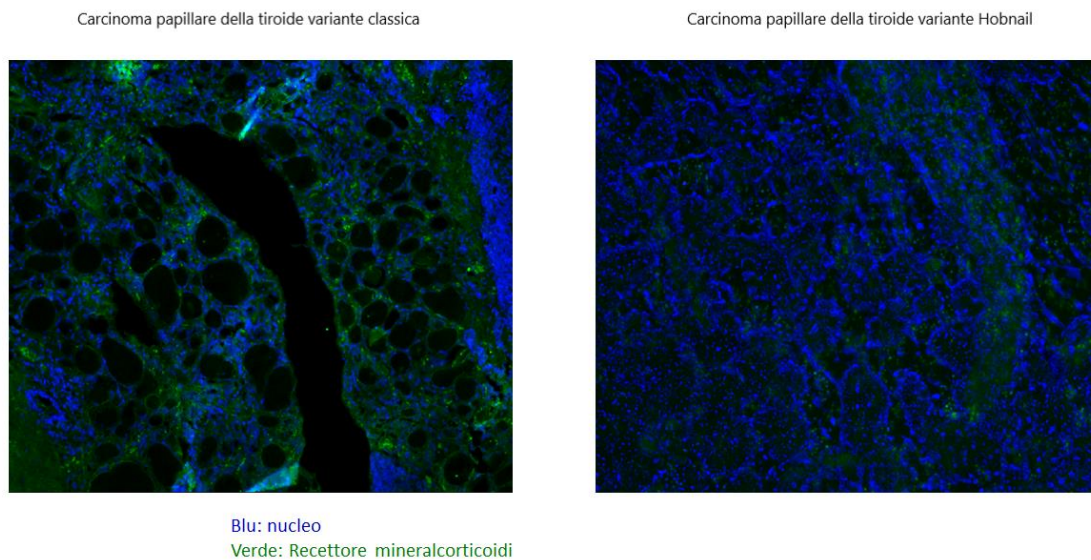


Figura 12. Immunofluorescenza per il recettore dei mineralocorticoidi associata alla microscopia confocale nel carcinoma papillare della tiroidea variante classica versus variante Hobnail

Dopo aver dimostrato la presenza del MR nel tessuto tiroideo abbiamo voluto dimostrare anche la sua reale attività. Pertanto, abbiamo incubato le linee cellulari di PTC, BCPAP e K1, con Aldo e come conferma della sua attivazione abbiamo evidenziato la migrazione del MR dal citoplasma al nucleo dopo 24 h, **Figura 13 e 14.**

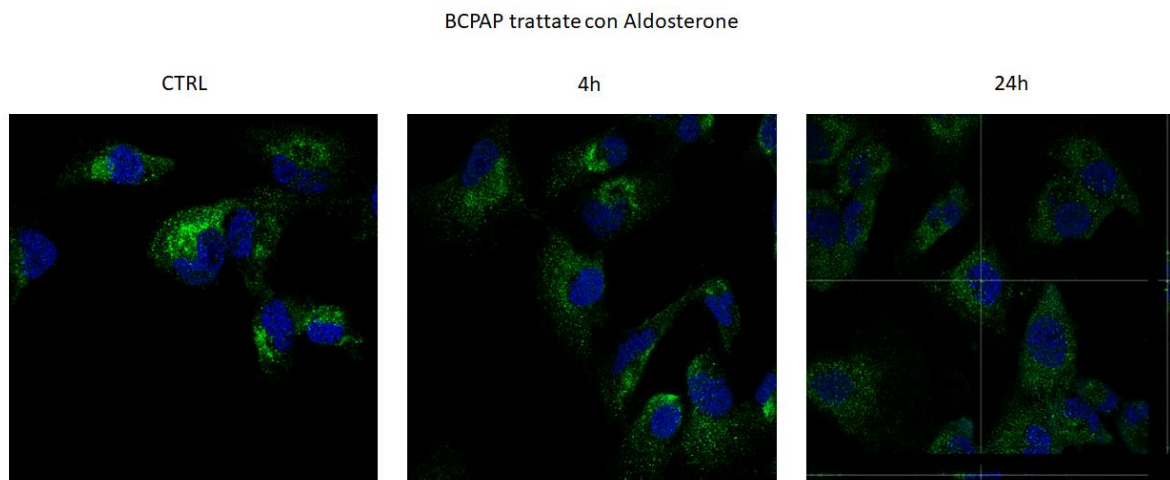


Figura 13. Immunofluorescenza per il recettore dei mineralocorticoidi associata alla microscopia confocale nella linea cellulare di BCPAP incubata con aldosterone. CTRL= tempo 0

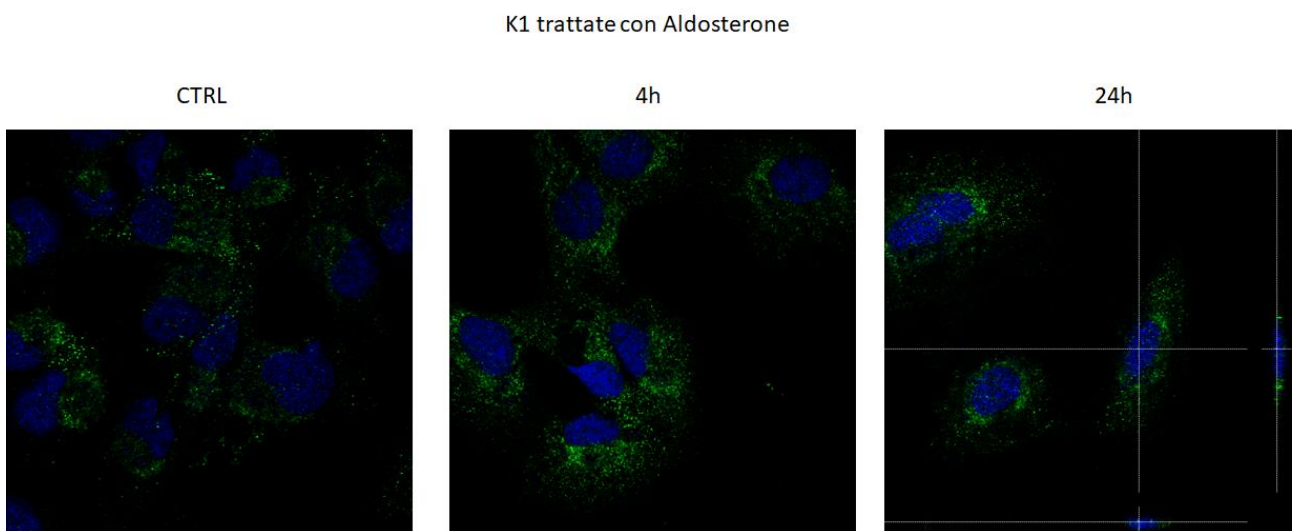


Figura 14. Immunofluorescenza per il recettore dei mineralocorticoidi associata alla microscopia confocale nella linea cellulare di K1 incubata con aldosterone. CTRL= tempo 0

La dimostrazione della riduzione dell'espressione sia genica che proteica del MR sulle cellule di PTC in confronto al tessuto tiroideo sano è coerente con l'effetto evidenziato di riduzione della vitalità cellulare e della migrazione cellulare in vitro verosimilmente mediato dal legame del GA con l'MR: pertanto la perdita del MR offrirebbe un vantaggio replicativo alle cellule tumorali. Alternativamente, la perdita del MR potrebbe essere solo l'espressione della sdifferenziazione cellulare tipica del processo oncogenetico che tuttavia, in ogni caso, conferirebbe un vantaggio replicativo alle cellule con minor espressione di MR (più evidente negli istotipi più aggressivi di PTC).

La scoperta della presenza e dell'attività del MR sulle cellule tiroidee apre una nuova branca di ricerca e dovrà chiarire quali possano essere le funzioni fisiologiche e fisiopatologiche del MR nel tessuto tiroideo che non era considerato un organo bersaglio dei mineralocorticoidi.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo studio ha evidenziato per la prima volta in letteratura l'espressione genica e proteica del MR sulle cellule tiroidee sane e tumorali, riconoscendo la tiroide come nuovo organo bersaglio dei mineralocorticoidi. Inoltre, ha generato le prime evidenze di un effetto antitumorale in vitro della Li e del suo principio attivo GA nel DTC, legato almeno in parte all'attività agonista sul MR.

Le nostre prospettive future sono:

- migliorare la comprensione del ruolo dei mineralocorticoidi nella cancerogenesi del DTC;
- aprire la strada alla scoperta e allo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali derivati dalla Li o dal GA nel DTC nell'epoca della "precision medicine".

Sono già in corso esperimenti a completamento del progetto volti a studiare:

- Il livello di espressione genica e proteica di MR anche nella TH e nel gozzo multinodulare;
- Il livello di espressione genica e proteica di 11 β HSD2 nella tiroide sana e patologica;
- La risposta molecolare delle colture cellulari di PTC dopo l'esposizione ad Aldo e fito-Li;
- Test wound healing nelle colture cellulari di PTC trattate con Aldo;

- L'analisi del ciclo cellulare, degli effetti sulle pathway di fosforilazione (MAPK e ERK), sull'apoptosi (Caspase assay) e RT-PCR per E-Caderina per lo studio della transizione epitelio-mesenchimale;
- I livelli di espressione genica e proteica del ER α e Er β sulle linee cellulari BCPAP e K1.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ruhs S, Nolze A, Hübschmann R, Grossmann C. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol* [Internet]. 2017 Jul [cited 2019 Apr 13];234(1):T107–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348113>
2. Balsamo A, Cicognani A, Gennari M, Sippell WG, Menabò S, Baronio F, et al. Functional characterization of naturally occurring NR3C2 gene mutations in Italian patients suffering from pseudohypoaldosteronism type 1. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2019 Apr 14];156(2):249–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287415>
3. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* [Internet]. 1988 Oct 28 [cited 2019 Apr 14];242(4878):583–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2845584>
4. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Apr 14];26(1–4):8–20. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/advan.00051.2001>
5. Patel PD, Sherman TG, Goldman DJ, Watson SJ. Molecular Cloning of a Mineralocorticoid (Type I) Receptor Complementary DNA from Rat Hippocampus. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1989 Nov [cited 2019 Apr 14];3(11):1877–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2558305>
6. Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. [cited 2019 Apr 14];14(11–12):859–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2966024>
7. Caprio M, Newfell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, et al. Functional Mineralocorticoid Receptors in Human Vascular Endothelial Cells Regulate Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression and Promote Leukocyte Adhesion. *Circ Res* [Internet]. 2008 Jun 6 [cited 2019 Apr 14];102(11):1359–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467630>
8. Armanini D, Strasser T, Weber PC. Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *Am J Physiol* [Internet]. 1985 Mar [cited 2019 Feb 25];248(3 Pt 1):E388-90. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1985.248.3.E388>

9. Armanini D, Endres S, Kuhnle U, Weber PC. Parallel determination of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in T- and B-lymphocytes of human spleen. *Acta Endocrinol (Copenh)* [Internet]. 1988 Aug [cited 2019 Apr 14];118(4):479–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840791>
10. Penfornis P, Viengchareun S, Le Menuet D, Cluzeaud F, Zennaro M-C, Lombès M. The mineralocorticoid receptor mediates aldosterone-induced differentiation of T37i cells into brown adipocytes. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2000 Aug [cited 2019 Apr 14];279(2):E386–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913039>
11. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* [Internet]. 2007 Jul [cited 2019 Apr 14];21(9):2185–94. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.06-7970com>
12. Bordin L, Donà G, Sabbadin C, Ragazzi E, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Human Red Blood Cells Alterations in Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Jun [cited 2019 Feb 25];98(6):2494–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539731>
13. McCurley A, McGraw A, Pruthi D, Jaffe IZ. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors: role in vascular function and contribution to cardiovascular disease. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2019 Apr 14];465(12):1661–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636772>
14. Calò LA, Zagheretto F, Pagnin E, Davis PA, De Mozzi P, Sartorato P, et al. Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Apr [cited 2019 Feb 25];89(4):1973–6. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-031545>
15. Bene NC, Alcaide P, Wortis HH, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in immune cells: emerging role in cardiovascular disease. *Steroids* [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Apr 15];91:38–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X14000762>
16. Carvajal CA, Herrada AA, Castillo CR, Contreras FJ, Stehr CB, Mosso LM, et al. Primary aldosteronism can alter peripheral levels of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Apr 15];32(9):759–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605974>
17. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, Amador CA, González PA, Cortés CM, et al. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2019 Mar 18];184(1):191–202. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0802886>
18. Ehlers M, Schott M. Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer: are they immunologically linked? *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Apr 15];25(12):656–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25306886>
19. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 15];2017:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316374>

20. Sabbadin C, Mian C, Nacamulli D, Donà G, Presotto F, Betterle C, et al. Association of primary aldosteronism with chronic thyroiditis. *Endocrine* [Internet]. 2017 Jan 9 [cited 2019 Feb 25];55(1):303–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26860513>
21. Armanini D, Nacamulli D, Scaroni C, Lumachi F, Selice R, Fiore C, et al. High prevalence of thyroid ultrasonographic abnormalities in primary aldosteronism. *Endocrine* [Internet]. 2003 Nov [cited 2019 Apr 15];22(2):155–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/ENDO:22:2:155>
22. Turchi F, Ronconi V, di Tizio V, Boscaro M, Giacchetti G. Blood pressure, thyroid-stimulating hormone, and thyroid disease prevalence in primary aldosteronism and essential hypertension. *Am J Hypertens* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2019 Apr 15];24(12):1274–9. Available from: <https://academic.oup.com/ajh/article-lookup/doi/10.1038/ajh.2011.144>
23. Ayturk S, Gursoy A, Kut A, Anil C, Nar A, Tutuncu NB. Metabolic syndrome and its components are associated with increased thyroid volume and nodule prevalence in a mild-to-moderate iodine-deficient area. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Apr 15];161(4):599–605. Available from: <https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/161/4/599.xml>
24. Greenman Y, Trostanetsky Y, Ben-Shemen S, Grazas N, Limor R, Osher E, et al. Thyroid cysts: a new extra-adrenal site of aldosterone synthase expression and increased aldosterone content. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Apr 15];66(6):886–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.2007.02828.x>
25. Krysiak R, Okopien B. Coexistence of primary aldosteronism and Hashimoto’s thyroiditis. *Rheumatol Int* [Internet]. 2012 Aug 26 [cited 2019 Apr 13];32(8):2561–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789613>
26. Yang R, Wang L, Yuan B, Liu Y. The Pharmacological Activities of Licorice. *Planta Med* [Internet]. 2015 Sep 14 [cited 2019 Apr 15];81(18):1654–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26366756>
27. Khan R, Khan AQ, Lateef A, Rehman MU, Tahir M, Ali F, et al. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. Aziz SA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 14 [cited 2019 Apr 16];8(2):e56020. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056020>
28. CHUEH F-S, HSIAO Y-T, CHANG S-J, WU P-P, YANG J-S, LIN J-J, et al. Glycyrrhizic acid induces apoptosis in WEHI-3 mouse leukemia cells through the caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Oncol Rep* [Internet]. 2012 Dec [cited 2019 Apr 16];28(6):2069–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972479>
29. Xiao X, Hao M, Yang X, Ba Q, Li M, Ni S, et al. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Lett* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2019 Apr 16];302(1):69–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383510005793>
30. Choi A-Y, Choi JH, Hwang K-Y, Jeong YJ, Choe W, Yoon K-S, et al. Licochalcone A induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress via a phospholipase C γ 1-, Ca $^{2+}$ -, and reactive oxygen species-dependent pathway in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Apoptosis* [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 2019 Apr 16];19(4):682–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-013-0955-y>

31. Kim J-S, Park M-R, Lee S-Y, Kim DK, Moon S-M, Kim CS, et al. Licochalcone A induces apoptosis in KB human oral cancer cells via a caspase-dependent FasL signaling pathway. *Oncol Rep* [Internet]. 2014 Feb [cited 2019 Apr 16];31(2):755–62. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2929>
32. Hsu Y-L, Wu L-Y, Hou M-F, Tsai E-M, Lee J-N, Liang H-L, et al. Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by inhibiting focal adhesion kinase/Rho signaling pathway. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Apr 16];55(2):318–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201000148>
33. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Stern N, Shelach R, Kaye A, et al. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Oct 15 [cited 2019 Apr 13];60(20):5704–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059763>
34. Lin D, Zhong W, Li J, Zhang B, Song G, Hu T. Involvement of BID translocation in glycyrrhetic acid and 11-deoxy glycyrrhetic acid-induced attenuation of gastric cancer growth. *Nutr Cancer* [Internet]. 2014 Apr 3 [cited 2020 Sep 21];66(3):463–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24547973/>
35. Shetty A V., Thirugnanam S, Dakshinamoorthy G, Samykutty A, Zheng G, Chen A, et al. 18 α -glycyrrhetic acid targets prostate cancer cells by down-regulating inflammation-related genes. *Int J Oncol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2020 Sep 21];39(3):635–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637916/>
36. Fiore C, Bordin L, Pellati D, Armanini D, Clari G. Effect of glycyrrhetic acid on membrane band 3 in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2019 Feb 26];479(1):46–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986108004062>
37. Bordin L, Saccardi C, Donà G, Sabbadin C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Mineralocorticoid receptor is involved in the aldosterone pathway in human red blood cells. *Am J Transl Res* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 25];8(2):314–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158328>
38. Pratesi C, Scali M, Zampollo V, Zennaro MC, De Lazzari P, Lewicka S, et al. Effects of licorice on urinary metabolites of cortisol and cortisone. *J Hypertens Suppl* [Internet]. 1991 Dec [cited 2019 Feb 25];9(6):S274-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1818967>
39. Armanini D, De Palo CB, Mattarello MJ, Spinella P, Zaccaria M, Ermolao A, et al. Effect of licorice on the reduction of body fat mass in healthy subjects. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2003 Jul 28 [cited 2019 Feb 25];26(7):646–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14594116>
40. Armanini D, Lewicka S, Pratesi C, Scali M, Zennaro MC, Zovato S, et al. Further studies on the mechanism of the mineralocorticoid action of licorice in humans. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 1996 Oct 4 [cited 2019 Feb 25];19(9):624–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957748>
41. Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2019 Apr 13];21(5):T273–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052473>
42. Chaudhuri PK, Prinz R. Estrogen receptor in normal and neoplastic human thyroid tissue. *Am J Otolaryngol* [Internet].

[cited 2019 Apr 13];10(5):322–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2817247>

43. Jalali-Nadoushan M-R, Amirtouri R, Davati A, Askari S, Siadati S. Expression of estrogen and progesterone receptors in papillary thyroid carcinoma. *Casp J Intern Med* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 13];7(3):183–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27757203>
44. Lu Y, Li J, Li J. Estrogen and thyroid diseases: an update. *Minerva Med* [Internet]. 2016 Aug [cited 2019 Apr 13];107(4):239–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148682>
45. Vannucchi G, De Leo S, Perrino M, Rossi S, Tosi D, Cirello V, et al. Impact of estrogen and progesterone receptor expression on the clinical and molecular features of papillary thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Apr 13];173(1):29–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862786>
46. Rubio GA, Catanuto P, Glassberg MK, Lew JI, Elliot SJ. Estrogen receptor subtype expression and regulation is altered in papillary thyroid cancer after menopause. *Surgery* [Internet]. 2018 Jan [cited 2019 Apr 13];163(1):143–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29128169>
47. Sturniolo G, Zafon C, Moleti M, Castellví J, Vermiglio F, Mesa J. Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor- α and Progesterone Receptor in Patients with Papillary Thyroid Cancer. *Eur Thyroid J* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Apr 13];5(4):224–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101486>
48. Barollo, S.; Bertazza, L.; Fernando, S.W.; Censi, S.; Cavedon, E.; Galuppini, F.; Pennelli, G.; Fassina, A.; Citton, M.; Rubin, B.; et al. Overexpression of L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) and 2 (LAT2): Novel Markers of Neuroendocrine Tumors. *PLoS ONE* 2016, 11, e0156044.
49. Sabbadin C, Bordin L, Donà G, Manso J, Avruscio G, Armanini D. Licorice: From Pseudohyperaldosteronism to Therapeutic Uses. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jul 18;10:484. doi: 10.3389/fendo.2019.00484. PMID: 31379750; PMCID: PMC6657287.