

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina DIMED

SCUOLA DI DOTTORATO IN RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E SPERIMENTALI

CURRICOLO METODOLOGIA CLINICA E MEDICINA DELL'ESERCIZIO, SCIENZE
ENDOCRINOLOGICHE, DIABETOLOGICHE E NEFROLOGICHE

CICLO XXXII

Nuovo approccio nel trattamento del carcinoma midollare tiroideo

Coordinatore: Ch.mo Prof. Paolo Angeli

Supervisore: Prof.ssa Caterina Mian

Correlatori: Dr. Loris Bertazza

Dottorando: Dr.ssa Susi Barollo

Anno Accademico: 2018/2019

Sommario

1. RIASSUNTO	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUZIONE.....	4
3.1 La ghiandola tiroidea	4
3.2 Carcinoma Midollare della Tiroide (MTC)	5
3.3 Trattamento dei Tumori Midollari di Tiroide	6
3.4 Oncogeni coinvolti nella tumorigenesi degli MTC.....	7
3.4.1 Oncogene RET	7
3.4.2 Oncogene RAS	10
3.5 Vie del segnale coinvolte nell'MTC e target molecolari dei farmaci utilizzati	11
3.5.1 Pathway PI3K/Akt/mTOR	11
3.5.2 Via del segnale delle MAP Chinasi (Ras/Raf/MEK/ERK pathway)	13
3.6 Modulatore biologico EF-24	16
4. SCOPO.....	18
5. MATERIALI E METODI	20
5.1 Raccolta dei tessuti da pazienti con MTC.....	20
5.2 Estrazione di DNA.....	20
5.3 Determinazione della concentrazione di DNA con Nanodrop ND-1000	20
5.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	21
5.5 Elettroforesi di acidi nucleici	23
5.6 Purificazione dei prodotti di amplificazione.....	24
5.7 PCR di sequenza e successiva purificazione	24
5.8 Sequenziamento genico	24
5.9 Colture cellulari di linee stabilizzate (TT e MZ-CRC-1).....	25
5.10 Colture cellulari primarie derivate da tumori midollari di tiroide.....	25

5.11	Composti chimici analizzati	26
5.12	Saggio di vitalità cellulare-MTT	26
5.13	IC50 e Combination Index (CI).....	27
5.14	Saggio di vitalità cellulare - Trypan blue	27
5.15	Estrazione proteica da cellule	28
5.16	Quantificazione della concentrazione proteica	28
5.17	Western Blot	29
5.17.1	Soluzioni utilizzate per l'analisi di Western Blot	30
5.18	In-Cell Western Assay (ICW).....	30
5.19	Analisi del ciclo cellulare attraverso la tecnica citofluorimetrica	32
5.20	Valutazione della morte cellulare programmata per apoptosi in citofluorimetria.....	32
5.21	Saggio di motilità Wound Healing Assay.....	33
5.22	Quantificazione della calcitonina	33
5.23	Livelli intracellulari dei ROS (test DCFH-DA).....	34
5.24	Analisi statistica.....	34
6.	RISULTATI	36
6.1	Saggi di vitalità MTT e determinazione dei valori di Combination Index (C.I.) per XL184, ZSTK474 ed EF24 nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT	36
6.2	Effetti dei farmaci sulle vie di segnale nelle linee cellulari TT e MZ-CRC-1.....	39
6.3	Valutazione del ciclo cellulare attraverso analisi di citofluorimetria.....	41
6.4	Valutazione dell'apoptosi per mezzo della colorazione con Annessina V-FITC e ioduro di propidio (PI).....	42
6.5	Effetti dei composti sulla secrezione di CT nelle linee cellulari stabilizzate di MTC	44
6.6	Saggio di mobilità cellulare di TT e MZ-CRC-1.....	45
6.7	EF24 aumenta i livelli di ROS intracellulari.....	47
6.8	Effetti dei composti nelle colture primarie ottenute da pazienti con MTC	48
7.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	52
8.	BIBLIOGRAFIA.....	56

1. RIASSUNTO

Il carcinoma midollare della tiroide (MTC) pur costituendo solamente il 5-10% di tutti i tumori tiroidei ha una prognosi infausta e risulta resistente ai trattamenti convenzionali. La mutazione di RET costituisce il marcatore molecolare a valenza prognostica più importante. Scopo dello studio è stato testare tre composti ZSTK474 e XL184 ed EF24 in linee cellulari di MTC stabilizzate e primarie attraverso varie metodiche tra cui saggi di vitalità, analisi delle vie di segnale, valutazione della modulazione del ciclo cellulare, apoptosi, motilità e dosaggio della calcitonina. Abbiamo studiato l'effetto di questi composti, singolarmente e in combinazione, in due linee cellulari umane stabilizzate di MTC, TT e MZ-CRC-1, mutate entrambe per RET, e in sei colture primarie di MTC. I bassi valori di IC50 hanno dimostrato l'efficacia dei farmaci, mentre l'indice di combinazione ha rivelato un importante effetto sinergico delle combinazioni di XL184 + ZSTK474 e XL184 + EF24. Inoltre abbiamo osservato, utilizzando i composti singolarmente e in combinazione, variazioni del ciclo cellulare e induzione di apoptosi o di necrosi. Sia XL184 che EF24, usati singolarmente o in combinazione, erano efficaci nel ridurre la secrezione di calcitonina. Mentre mediante l'utilizzo del Western blot e dell'In-Cell Western abbiamo potuto vedere l'efficacia dei composti nell'inibire le principali vie di segnale, MAPK e PI3K/Akt. Per di più in questo studio è stato testato per la prima volta EF24 negli MTC, dimostrando che già utilizzandolo singolarmente è efficace nell'inibire la vitalità cellulare. Abbiamo inoltre testato anche le combinazioni XL184 + ZSTK474 e XL184 + EF24, scoprendo che agiscono in modo sinergico, indipendentemente dallo stato mutazionale di RET. Questi risultati confermano e supportano l'idea che l'inibizione contemporanea di molteplici vie abbia un maggiore impatto clinico.

2. ABSTRACT

XL184 is a small-molecule kinase inhibitor recently included in first-line systemic therapy for patients with advanced, progressive medullary thyroid cancer (MTC). EF24 is a curcumin analog with a high bioavailability, and ZSTK474 is an inhibitor of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. We investigated the effect of these compounds, alone and in combination, in two rearranged during transfection (RET)-mutated TT and MZ-CRC-1 MTC cell lines and in six mostly RET wild-type human MTC primary cultures. Low IC50 values demonstrated the efficacy of the drugs, whereas the combination index revealed an important synergistic effect of combinations of XL184 + ZSTK474 and XL184 + EF24. Cell-cycle changes and the induction of apoptosis or necrosis were modulated by single compounds or combinations thereof. Both XL184 and EF24, alone or combined, were effective in reducing calcitonin secretion. Western blot and in-cell Western analysis showed that the compounds prompted a decrease in general reactivity to phosphorylated antibodies. Our data confirm XL184 alone as the reference drug for RET-mutated MTC, but we also demonstrated that EF24 alone is effective in inhibiting MTC cell viability. We tested the combinations XL184 + ZSTK474 and XL184 + EF24 too, finding that they act synergistically, irrespective of RET mutation status.

3. INTRODUZIONE

3.1 La ghiandola tiroidea

La tiroide è una ghiandola localizzata nella regione anteriore del collo, davanti e lateralmente alla laringe e ai primi anelli tracheali. A livello microscopico l'unità fondamentale è il follicolo di forma sferica od ovoidale, ripiena di colloide, con la parete formata da un unico strato di cellule che costituiscono l'epitelio follicolare. L'epitelio è costituito da tireociti responsabili della produzione degli ormoni e poggia su una lamina basale all'esterno della quale corrono i capillari. Tra i tireociti della parete follicolare sono localizzate le cellule C o parafolicolari (Figura1). La tiroide è una ghiandola endocrina che produce triiodotironina (T3) e tiroxina (T4): tali ormoni agendo attraverso recettori nucleari, svolgono un ruolo centrale nella differenziazione cellulare durante lo sviluppo e aiutano a mantenere l'omeostasi termica e metabolica nell'adulto. Le cellule C sono disperse all'interno dei follicoli o localizzate in zone parafolicolari e sono cellule deputate alla produzione di calcitonina un ormone che regola il metabolismo del calcio.

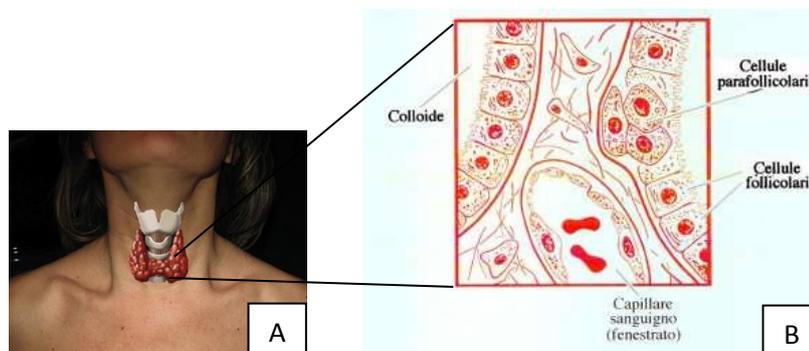


Figura 1: (A) visualizzazione schematica e localizzazione anatomica della ghiandola tiroidea; (B) ingrandimento raffigurante i tipi cellulari della tiroide.

Il carcinoma della tiroide è la neoplasia più comune del sistema endocrino, rappresentando circa l'1% delle neoplasie di nuova diagnosi. I tumori tiroidei sono distinti in tumori benigni, costituiti essenzialmente dagli adenomi iperplastici, e lesioni maligne, che nella maggioranza dei casi sono carcinomi, e possono originarsi sia dalle cellule follicolari sia dalle cellule C. Tra i

fattori di rischio per carcinoma della tiroide si contano quelli ormonali, la familiarità ed i fattori ambientali.

Sulla base di parametri istologici e clinici i carcinomi della tiroide possono essere distinti in tre categorie:

- a. carcinomi differenziati:
 - papillari (75%)
 - follicolari (15%)
- b. carcinomi midollari (5-10%)
- c. carcinomi anaplastici (2-5%)

3.2 Carcinoma Midollare della Tiroide (MTC)

Il Carcinoma Midollare della Tiroide (MTC) è un tumore endocrino ben differenziato che nasce dalle cellule C parafollicolari della ghiandola tiroidea. Le cellule C derivano dalle creste neurali e nei periodi successivi dello sviluppo migrano nell'abbozzo della ghiandola tiroidea, di origine endodermica, per localizzarsi riunite in piccoli gruppi nello stroma interfollicolare o più spesso tra la membrana basale e lo strato più profondo dei follicoli, dalla cui posizione il nome di "parafollicolari"; Le cellule parafollicolari vengono anche chiamate "cellule C", poiché secernono la calcitonina (CT), marcatore per eccellenza negli MTC. Essa è un peptide di 32 amminoacidi che partecipa all'omeostasi del calcio e del fosforo, insieme a paratiroidi, rene, intestino, ossa.

Il gene codificante questa sostanza (assieme al CT-gene related peptide) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 11 e viene espresso da svariati tessuti in risposta a stimoli infiammatori con la sintesi di pre-pro-calcitonina, trasformata in pro-calcitonina e così secreta. Esclusivamente nel tessuto parafollicolare però avviene il clivaggio definitivo, con la produzione della molecola ormonale attiva.

La calcitonina agisce su un recettore (CTR) accoppiato a proteine G con attività adenil-ciclasica e fosfolipasica ed abbassa la calcemia e la fosforemia con meccanismi differenti: aumentando l'escrezione urinaria di calcio e inibendo l'attività osteoclastica, l'assorbimento intestinale di calcio, il riassorbimento di fosfati dai tubuli renali e l'attivazione renale della vitamina D.

Poiché il Tumore Midollare della Tiroide deriva dalle cellule C, assume un diverso comportamento biologico rispetto agli altri istotipi di tumori tiroidei infatti non è in grado di captare lo iodio, non produce tireoglobulina ma produce calcitonina ed è indipendente dal TSH (Thyroid Stimulating Hormone) inoltre, acquisisce caratteristiche peculiari, per diagnosi, prognosi, gestione e trattamento. La prognosi è meno buona di quella media di tutti i tumori tiroidei ed infatti questo tipo è la causa di circa il 13% della mortalità totale. Sembra essere peggiore per le forme sporadiche (75-80% dei casi) identificate in stadi più avanzati rispetto a quelle ereditaria (20-25% dei casi) dove inizia ad esistere un'attenta sorveglianza [1].

Il comportamento biologico di MTC è in generale più aggressivo di quello degli altri tipi di tumori con il 30% dei casi che mostrano metastasi a distanza al momento della diagnosi. Si è stimato che ogni anno circa 200 italiani e 2400 soggetti in Europa vengono colpiti da MTC.

Nelle forme ereditarie l'MTC è trasmesso secondo modalità autosomica dominante e può presentarsi da solo (FMTC-Carcinoma Midollare della Tiroide Familiare) o come parte di Neoplasie Endocrine Multiple (MEN2). In particolare lo si trova nella MEN 2A dove si presenta in associazione con feocromocitoma ed iperparatiroidismo primitivo ed infine nella MEN 2B dove vi è l'associazione di MTC, feocromocitoma e ganglioneuromatosi. Da oltre 20 anni è noto che le MEN 2 e il FMTC sono sindromi tumorali causate da un numero relativamente limitato di mutazioni geniche puntiformi dell'oncogene RET, il quale codifica per un recettore di membrana con attività tirosin-chinasica. Queste mutazioni conferiscono al recettore uno stato di attivazione costitutiva ligando indipendente con conseguente proliferazione neoplastica degli organi bersaglio. RET infatti rappresenta il marcatore molecolare per eccellenza del tumore midollare della tiroide.

3.3 Trattamento dei Tumori Midollari di Tiroide

Il trattamento cardine degli MTC è la tiroidectomia totale. I pazienti con MTC possono essere definitivamente guariti solo quando il tumore è intratiroideo al momento del primo trattamento chirurgico. Purtroppo, però, i pazienti sono di solito diagnosticati e poi

trattati quando lo stato della malattia è già ampiamente diffusa. In particolare nei pazienti con metastasi a distanza vi è assoluta necessità di trovare modalità di trattamento alternative alla chirurgia. Infatti, il ruolo delle terapie convenzionali negli MTC è limitata a causa della mancanza di efficacia o di bassa tollerabilità. Anche la radioterapia e la chemioterapia risultano non efficaci nella cura di MTC. I regimi chemioterapici, generalmente indicati nei tumori neuroendocrini ben differenziati, danno risultati deludenti in particolar modo negli MTC [2].

La progressiva comprensione dell'oncogenesi del carcinoma midollare della tiroide ha portato nel tempo all'identificazione di target molecolari per il trattamento farmacologico, soprattutto delle forme metastatiche [3]. L'attuale terapia molecolare "mirata" è basata sull'utilizzo di Inibitori delle Tirosin-Chinasi (TKI), ovvero piccole molecole che competono per il sito di legame per l'ATP (adenosin-trifosfato) a livello del sito catalitico tirosin-chinasi. L'occupazione di questi siti impedisce l'autofosforilazione, l'attivazione delle tirosin-chinasi e previene la trasmissione del segnale intracellulare. Ad oggi l'unico farmaco in Italia per il trattamento della patologia è *Vandetanib* (ZD6474) un inibitore selettivo delle tirosin-chinasi di RET, del recettore del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e del recettore dell'Epidermal Growth Factor (EGF) in grado di inibire la crescita del tumore, arginare il flusso di sangue che alimenta le cellule tumorali e inibirne la crescita. Questo farmaco è però destinato ai soli pazienti con MTC localmente avanzato o con metastasi.

3.4 Oncogeni coinvolti nella tumorigenesi degli MTC

3.4.1 Oncogene RET

Mutazioni attivanti il proto-oncogene RET (REarranged during Transfection gene) sono implicate nella patogenesi di varie forme di MTC [4]. Sono state rilevate mutazioni germinali di questo gene in circa l'88-98% delle forme familiari mentre mutazioni somatiche del gene RET sono state riportate in circa 23-70% di MTC [5]. Il gene RET è localizzato sul cromosoma 10 (10q11.2), è lungo circa 55000 bp e contiene 21 esoni [6]; la proteina codificata è una tirosin-chinasi transmembrana nella cui porzione

extracitoplasmatica, in posizione N-terminale, è presente un dominio che contiene quattro motivi di adesione cellulare simil-caderinici dipendenti dal Ca^{2+} , per indurre e stabilizzare cambiamenti conformazionali necessari per l'interazione con i ligandi ed i co-recettori; in posizione C-terminale è presente un dominio ricco in cisteine, responsabile della struttura terziaria e della dimerizzazione del recettore. Sono inoltre presenti diversi siti di glicosilazione. Il dominio transmembrana, che comprende i codoni dal 636 al 657, permette l'accostamento dei monomeri RET attraverso interazioni inter-recettoriali non covalenti. Nella porzione intracitoplasmatica è presente un dominio in prossimità della membrana (juxtamembrane domain) ed un dominio tirosin-chinasico (Figura 2). L'attivazione del recettore RET ne determina la dimerizzazione a cui segue l'autofosforilazione dei residui di tirosina e la trasmissione di un segnale intracellulare con promozione di proliferazione e crescita cellulare [7]. Approfondendone il funzionamento, si è visto che la proteina RET lega fattori di crescita della famiglia del GDNF (GDNF, neurturina, artemina e persefina) in un complesso multi-molecolare [8].

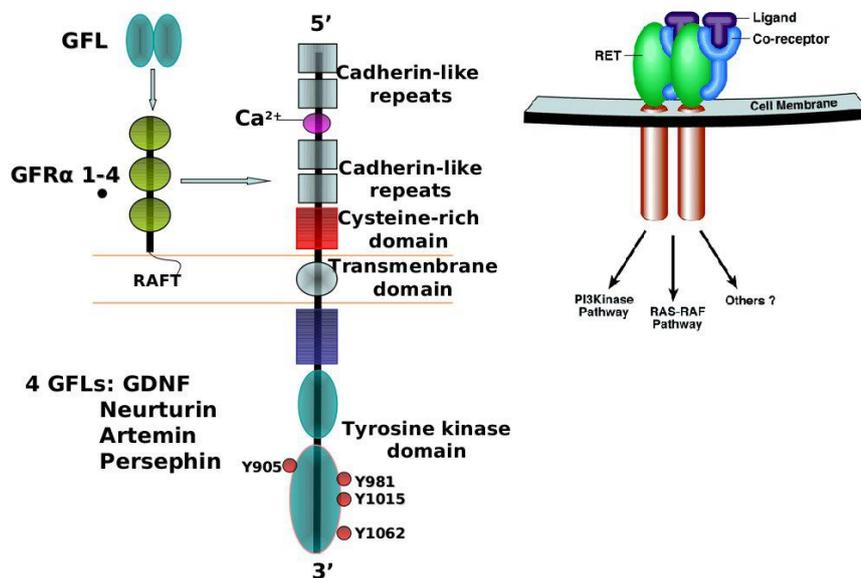


Figura 2: Struttura molecolare del proto-oncogene RET e processo di attivazione ligando-dipendente.

Questo complesso multi-molecolare, presente a livello della membrana plasmatica, è costituito dalla proteina RET accoppiata al co-recettore GFR- α 1-4 (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor Receptor) assieme al fattore di crescita. Il complesso GDNF-GFR- α

interagisce con il recettore RET determinando la dimerizzazione di due proteine monometriche RET, a cui consegue l'autofosforilazione a livello del dominio tirosin-chinasico intracellulare (processo di trans-fosforilazione) e la trasmissione del segnale all'interno della cellula. RET-fosforilato, infatti, funge da sito di ancoraggio di proteine di trasduzione del segnale intracellulare (Shc, ShcC, IRS1/2, FRS2, DOK1/4/5 ed Enigma). Viene attivata la via di segnalazione intracellulare della fosfolipasi C (PLC)/Ras/ERK, della fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3K)/V-akt murine thymoma vital oncogene homolog1 (AKT), p38MAPK e JNK. L'effetto finale è la trascrizione di geni implicati nella progressione del ciclo cellulare e nella proliferazione (ad esempio: ciclina D, c-myc) [9].

Le mutazioni interessanti RET sono in genere mutazioni puntiformi riguardanti "hot spots" nella sequenza nucleotidica. In particolar modo, però, mutazioni localizzate in domini differenti dell'oncogene e in particolar modo in sezioni localizzate da parti opposte del doppio strato fosfolipidico scaturiscono una differente risposta cellulare come vedremo di seguito.

È stato dimostrato che le mutazioni che causano MEN 2A sono localizzate nel dominio extracellulare ricco in cisteine. In particolare nell'80% dei casi la mutazione riguarda il codone 634 (esone 11) e nel 50% di questi casi c'è una singola mutazione per la quale un'arginina sostituisce la cisteina 634, o frequente è anche la sostituzione di una cisteina con un triptofano. Nel 10-15% dei casi le mutazioni riguardano i codoni 609, 611, 618 e 620 (tutti situati nell'esone 10) [10].

In circa la metà della popolazione con FMTC la mutazione si localizza a livello dell'esone 10 (principalmente codone 618 e 620). Nei restanti casi la mutazione può essere riscontrata negli esoni 11, 13, 14 e 15 dove la mutazione è a livello del dominio tirosin-chinasico andando ad alterare il sito di legame dell'ATP [11].

Approssimativamente il 95% dei pazienti con MEN 2B presenta una mutazione al codone 918 (esone 16) dove si ha una sostituzione di una metionina con una treonina. In questo modo viene alterata la "tasca" di riconoscimento del substrato a livello del sito catalitico della proteina.

È importante sottolineare la stretta relazione tra genotipo e fenotipo (Figura 3) [12].

In particolare nei pazienti con MEN 2B (mutazione nel codone 618 dell'esone 16), l'insorgenza dell'MTC avviene nel corso del primo anno di vita mentre nei pazienti affetti

da MEN 2A (mutazione nel codone 634, esone 11) l'età media dell'insorgenza dell'MTC è intorno ai 10 anni.

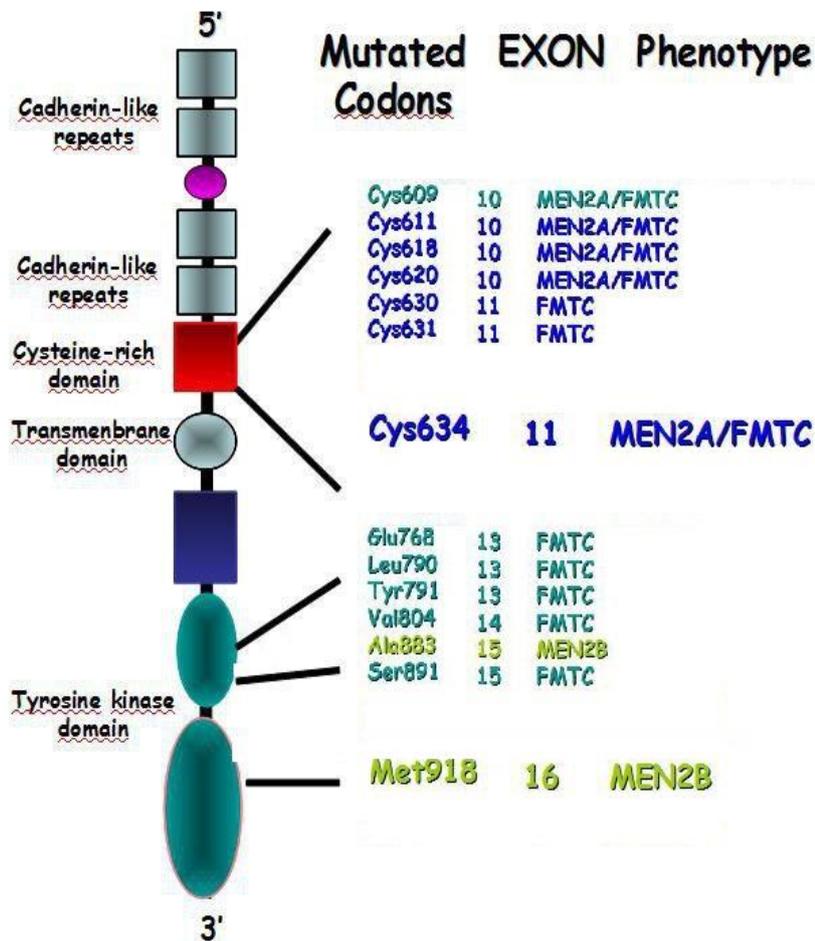


Figura 3: Correlazione genotipo-fenotipo nell'MTC ereditario.

3.4.2 Oncogene RAS

Il secondo fattore recentemente entrato nel dibattito scientifico sull'eziologia molecolare dei carcinomi midollari della tiroide è il gene RAS (RAI Sarcoma). Nell'uomo sono presenti tre geni RAS che codificano per tre distinte proteine ma altamente omologhe, di circa 21KDa: HRAS, NRAS e KRAS4A e KRAS4B (KRAS4A e KRAS4B sono due varianti dello stesso gene KRAS prodotte per splicing alternativo) (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Le proteine Ras rientrano nel gruppo delle "proteine G" (più precisamente delle "smallGTPasi") la cui

caratteristica è la capacità di passare da conformazioni “on” a conformazioni “off” a seconda che siano legate al guanosintrifosfato (GTP) o alla sua forma defosforilata (GDP) rispettivamente. La transizione tra questi due stati è regolata dai guanine nucleotide exchange factors (GEFs) che promuovono l’attivazione della proteina RAS attraverso la stimolazione della sostituzione del GDP con il GTP, e dalle GTPase-activating proteins (GAPs) che accelerano l’idrolisi del GTP mediata da Ras. Questa inattivazione di RAS mediata dalle GAPs è il principale target per le più comuni mutazioni somatiche che sono state trovate nelle varianti oncogeniche degli alleli di RAS (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Sostituzioni nei residui G12 e G13 ostacolano la formazione dei legami di van der Waals tra RAS e GAP, che porta ad un errato orientamento della glutamina catalitica (Q61) di RAS e quindi ad una diminuita idrolisi del GTP [13]. Il risultato di queste sostituzioni è un’aumentata attivazione di una moltitudine di effettori a valle nella pathway di RAS. Inoltre RAS e PI3K contribuiscono anche all’attivazione di molti effettori di segnalazione come il fattore nucleare- κ B (NF- κ B), il trasduttore di segnale e attivatore di trascrizione (STAT) e la beta catenina.

3.5 Vie del segnale coinvolte nell’MTC e target molecolari dei farmaci utilizzati

3.5.1 Pathway PI3K/Akt/mTOR

mTOR è una serina/treonina chinasi coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare, apoptosi, ciclo cellulare, angiogenesi, metabolismo e sintesi proteica. La segnalazione mTOR è regolata da numerosi stimoli, come fattori di crescita, aminoacidi e ipossia [14]. La via principale che controlla le funzioni di mTOR è il PI3K/Akt. L’attivazione di PI3K/Akt è guidata da diversi RTK, stimolati da fattori di crescita specifici (Figura 4). Quando questi recettori sono attivati, PI3K è reclutato e catalizza la conversione del difosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo- 3,4,5-trifosfato (PIP3) e quindi attiva Akt.

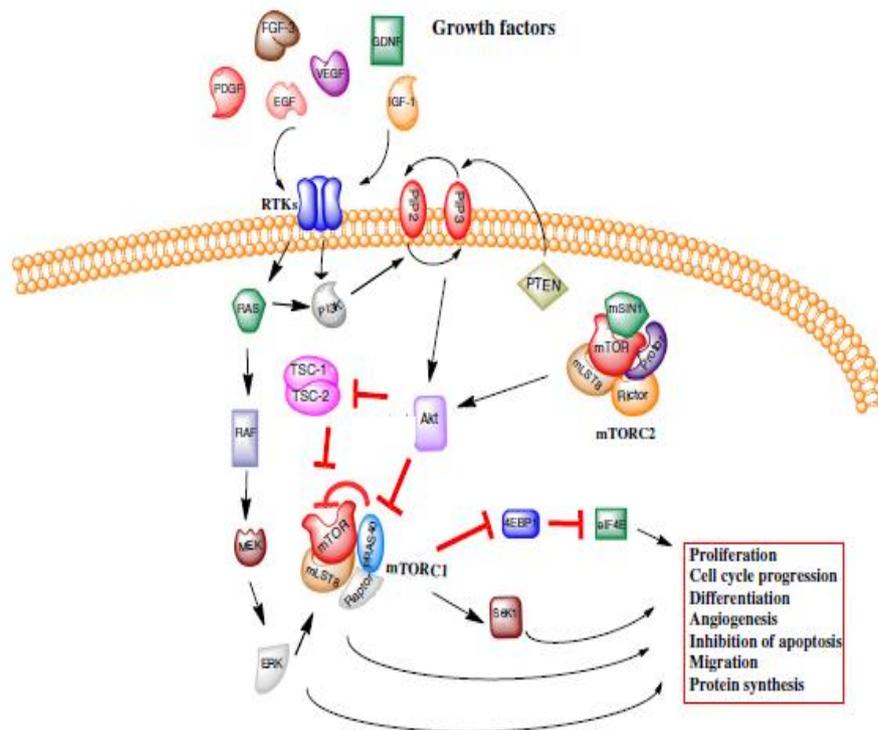


Figura 4: Schema riassuntivo della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR nelle cellule tumorali.

Quest'ultimo, attraverso l'inattivazione di regolatori negativi di mTOR gli permette di svolgere le sue multiple funzioni. D'altra parte, il principale regolatore negativo di mTOR è PTEN, un oncosoppressore che inibisce Akt, convertendo PIP3 in PIP2.

mTOR prende parte a due complessi multiproteici: mTOR complesso 1 e 2 (mTORC1 e mTORC2) (Figura 4). È interessante notare che l'attivazione di mTORC1 e quindi la fosforilazione di obiettivi a valle quali 4EBP1 e S6K1, porta preferenzialmente alla traduzione di mRNA di geni pro-cancerogeni implicati nella progressione, differenziazione e morte cellulare, nell'angiogenesi e nella migrazione. mTORC2, invece, fosforila Akt attivandolo. Come evidenziato in precedenza, dato che la segnalazione PI3K/Akt/mTOR controlla la proliferazione cellulare, la morte cellulare e l'angiogenesi, un'attivazione inadeguata di questo percorso può avere come risultato il manifestarsi del tumore.

Il farmaco **ZSTK474** (Figura 5) è un nuovo inibitore specifico di tutte e quattro le isoforme di PI3K (α , β , δ e γ) coinvolte rispettivamente nella cancerogenesi, nello sviluppo di patologie trombotiche e nell' infiammazione. ZSTK474 va ad inibire la fosforilazione dei componenti di segnalazione a valle di PI3K, come Akt e la glicogeno sintasi chinasi 3beta, determinando una diminuzione dei livelli della ciclina D1.

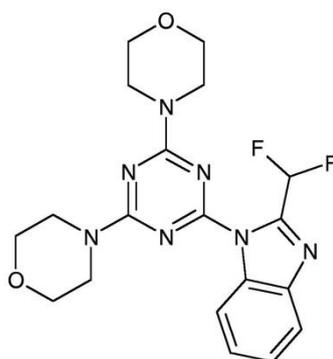


Figura 5: Configurazione chimica di ZSTK474

Il nuovo farmaco è già stato testato presso il Japanese Foundation for Cancer Research di Tokyo su un pannello di 39 linee cellulari di cancro umano e ha dimostrato un'alta efficacia antitumorale senza evidenziare tossicità [15].

3.5.2 Via del segnale delle MAP Chinasi (Ras/Raf/MEK/ERK pathway)

La cascata del segnale Ras/Raf/MAPK è un importante sequenza di eventi molecolari attivati da un segnale extracellulare capace di generare risposte da parte della cellula. Il segnale extracellulare può essere rappresentato da fattori di crescita di varia natura che vengono riconosciuti da opportuni recettori di membrana appartenenti alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici. Tali molecole interagendo con il dominio extracellulare del recettore, inducono la dimerizzazione dello stesso, la cui porzione intracellulare, essendo dotata di attività tirosin-chinasica intrinseca, è in grado di autofosforilare i residui di tirosina. Questi residui una volta fosforilati costituiscono un punto di legame per il gruppo SH2 delle proteine adattatrici Grb2 e Sos, le quali reclutano i fattori GEF in grado di

attivare la proteina Ras. La proteina Ras nella sua forma attiva, è in grado di fosforilare le proteine RAF che a loro volta fosforilano tutta una serie di proteine chinasi (MAP chinasi) capaci di traslocare nel nucleo e promuovere la trascrizione di geni che consentiranno alla cellula di rispondere al segnale iniziale (Figura 6). Le proteine a valle coordinano un'ampia varietà di risposte cellulari coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, nella sopravvivenza e nell'apoptosi e in molti altri processi cellulari e fisiologici [16]. Nei carcinomi tiroidei sono state identificate numerose anomalie genetiche che portano all'attivazione della cascata MAPK: le alterazioni molecolari trovate nel carcinoma papillare della tiroide, per esempio, coinvolgono geni che codificano per recettori tirosin chinasi RET e NTRK1 e per due effettori intracellulari della via ossia RAS e BRAF.

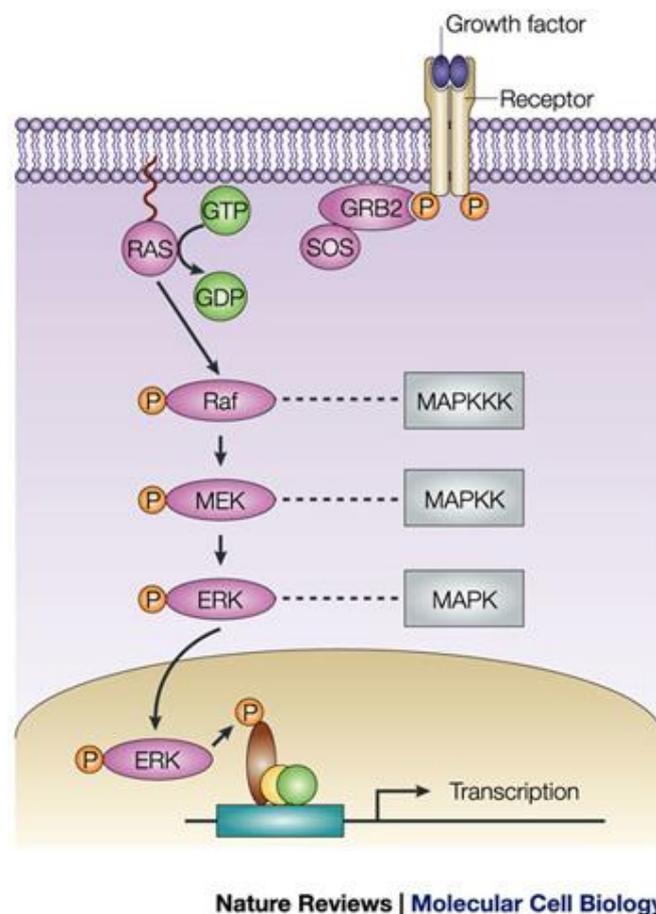


Figura 6: Rappresentazione schematica della via del segnale delle MAP Chinasi (Ras/Raf/MEK/ERK)

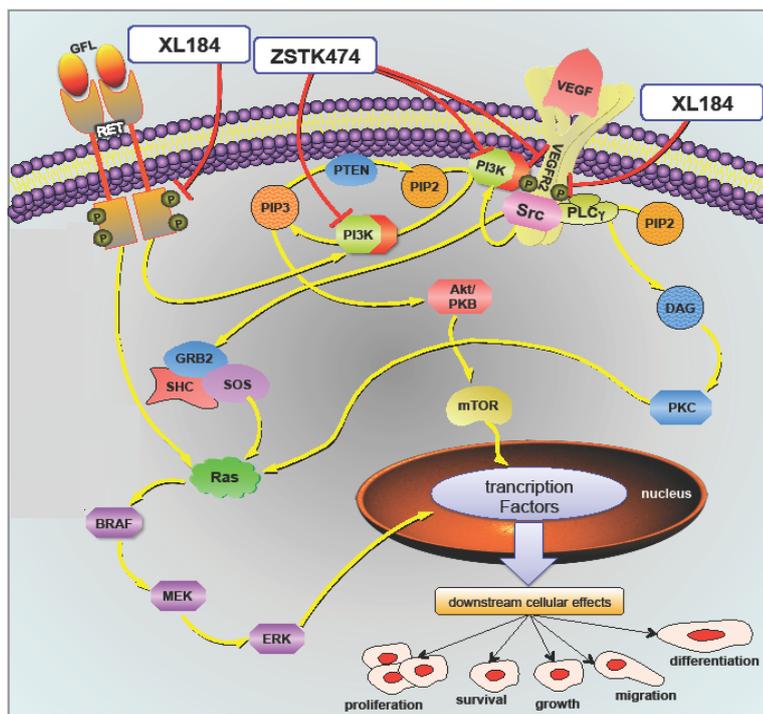


Figura 8: Riproduzione schematica delle pathway PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/MEK/ERK con rappresentazione dei target molecolari di XL184 e ZSTK474.

Lo spegnimento della cascata molecolare Ras/Raf/MEK/ERK e/o PI3K/Akt/mTOR può essere di beneficio terapeutico nei pazienti con malattia oncologica caratterizzata dall'attivazione di queste 2 vie di segnale (Figura 8).

3.6 Modulatore biologico EF-24

EF-24 è un composto analogo alla curcumina (Figura 9). La curcumina è un polifenolo naturale isolato dalla *Curcuma Longa*, spezia estratta dalla radice della pianta medesima. Per la sua capacità di indurre morte cellulare, la curcumina ha acquisito molto interesse come agente chemiopreventivo e antitumorale, proprietà che sono già state confermate in vitro e in studi preclinici su animali modello in diversi tipi di neoplasie. Le sue proprietà anti-infiammatorie e anti-ossidanti, la rendono particolarmente interessante nella terapia di molte malattie con componenti infiammatori, come il cancro, le malattie cardiovascolari, l'Alzheimer, l'artrite reumatoide e la sindrome metabolica [20]. Nonostante sia stato dimostrato che la curcumina modula molti target correlati con il cancro e con altre malattie croniche, uno dei limiti più importanti è la sua biodisponibilità

[21]. La scarsa biodisponibilità della curcumina è dovuta alla natura idrofobica della molecola.

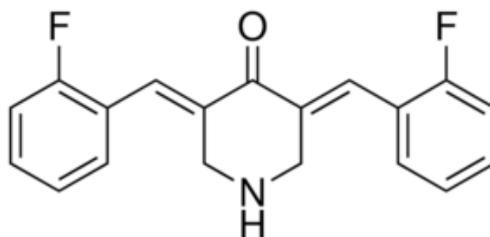


Figura 9: Configurazione chimica di EF-24

L' analogo della Curcumina, EF-24, è fino a 10 volte più potente nell'induzione della morte cellulare e maggiormente biodisponibile per le cellule. La conformazione a fitosoma (complesso tra un principio attivo naturale e un fosfolipide) di EF-24 contribuisce ad aumentarne la capacità di attraversare le membrane biologiche, sostanzialmente questa struttura prevede che EF-24 sia incorporata in un ambiente lipofilo e in questo modo risulti protetta dalla degradazione operata dall'acqua e, allo stesso tempo, il rapido scambio di fosfolipidi tra le membrane biologiche e i fluidi extracellulari la possa veicolare all'interno delle membrane, aumentando il suo assorbimento cellulare. A livello molecolare, la curcumina è segnalata per esercitare la sua attività anticancerogena modulando l'attività di molti target molecolari.

Questi target includono fattori di trascrizione, fattori di crescita, enzimi come le protein chinasi (PKA, PKC, FAK, Src), il glutatione S-transferasi, la DNA topoisomerasi-II, la telomerasi, l'eme-ossigenasi-1, metalloproteinasi, lipossigenasi (5-LOX), ciclossigenasi-2 (COX-2), alcune chemiochine e interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF).

4. SCOPO

L'attuale ruolo delle terapie convenzionali negli MTC è limitato a causa della mancanza di efficacia o di bassa tollerabilità. Anche la radioterapia e la chemioterapia risultano non efficaci nella cura di MTC. Ad oggi l'unico farmaco disponibile è il *Vandetanib* (ZD6474) che però è destinato ai soli pazienti con MTC localmente avanzato o con metastasi. Il tentativo attuale è dunque quello di sperimentare nuovi agenti terapeutici o combinazioni di questi per ottenere un miglior trattamento ed outcome specialmente nei pazienti con malattia metastatica ed in progressione.

Infatti lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare e valutare i potenziali effetti di 2 differenti nuovi farmaci e di un modulatore biologico, singolarmente e in combinazione su linee di carcinoma midollare di tiroide (MTC).

I farmaci utilizzati in questo studio sono inibitori delle vie MAPK e PI3K, in particolare sono stati testati: **ZSTK474** inibitore di PI3K e **XL-184** inibitore di MET, RET e VEGFR2 su linee cellulari di carcinoma midollare di tiroide sia stabilizzate che primarie. È stata inoltre valutata l'attività di un modulatore biologico **EF-24**, analogo della curcumina, da solo e in associazione con i farmaci sopra elencati alla ricerca di possibili sinergismi.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Raccolta dei tessuti da pazienti con MTC

Sono stati raccolti 6 campioni di carcinoma midollare della tiroide. Dopo l'operazione chirurgica una parte di tessuto è stata congelata in azoto liquido e conservata a -80°C; la porzione rimanente è stata utilizzata per l'allestimento di colture cellulari primarie e per le estrazioni di acidi nucleici. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato che li mette a conoscenza dell'utilizzo del campione per scopi di ricerca e lo studio è stato approvato dai comitati etici locali.

5.2 Estrazione di DNA

L'estrazione del DNA dal tessuto patologico tumorale è stata eseguita utilizzando il protocollo del kit QIAamp DNA tissue mini Kit (Qiagen). La procedura di purificazione comprende 4 fasi: lisi del campione biologico, assorbimento/legame del DNA alla membrana di silicio contenuta nella colonnina QIAamp, lavaggio e rimozione dei residui contaminanti, eluizione del DNA.

5.3 Determinazione della concentrazione di DNA con Nanodrop ND-1000

La concentrazione di DNA estratto viene misurata attraverso la lettura della densità ottica (D.O.) alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando uno spettrofotometro. Gli acidi nucleici ottenuti sono analizzati attraverso lo spettrofotometro UV-Visibile NanoDrop® ND-1000 che permette analisi altamente precise dei campioni con una notevole riproducibilità, elimina l'esigenza delle provette e dei vasi capillari, fa diminuire il tempo della misurazione ed inoltre elimina l'esigenza della maggior parte delle diluizioni. Questo strumento sfrutta una tecnologia che si basa sulla tensione superficiale che piccoli volumi

di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine; in questo modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche e può essere analizzata in modo semplice e veloce. Le misurazioni vengono effettuate utilizzando come riferimento (Blank) la stessa soluzione utilizzata per la dissoluzione dei campioni, cioè H₂O DNAsi free. Per valutare la presenza di eventuali contaminanti, viene osservato per ogni campione il rapporto D.O.260nm/280nm, calcolato automaticamente dal software. Per determinare la purezza dell'acido nucleico vengono utilizzati i rapporti:

Rapporto A₂₆₀/A₂₈₀ = indice della contaminazione da proteine. Per il DNA il rapporto deve essere 1.6-2.0.

Rapporto A₂₆₀/A₂₃₀ = indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi). Il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi.

5.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodica che permette l'amplificazione esponenziale in vitro di una determinata sequenza di DNA, sfruttando l'attività di sintesi della Taq polimerasi, estratta dal battere *Thermophilus Aquaticus*. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per poter sintetizzare degli oligonucleotidi (primers forward e reverse) (Tabella 1 e 2) che saranno ibridizzati ad esse. Il prodotto della reazione sarà una molecola di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligonucleotidi utilizzati. L'amplificazione viene effettuata tramite diversi cicli, ciascuno dei quali risulta composto di tre fasi fondamentali:

denaturazione: trattamento del DNA ad alte temperature (94-95°C) al fine di separare le due catene di DNA, rendendo possibile l'accesso dei primers al filamento complementare;

appaiamento: i primers si appaiano alla sequenza complementare. La temperatura utilizzata in questo caso viene scelta in base alla temperatura di melting, cioè la temperatura massima oltre la quale il primer si denatura e perde la capacità di appaiarsi in modo specifico alla sequenza di cDNA;

estensione: la Taq polimerasi sintetizza il filamento complementare al DNA stampo a partire dai due primers.

GENE	PRIMER FORWARD 5'-3'	PRIMER REVERSE 5'-3'	T annealing
<i>NRAS EX 2</i>	GACTGAGTACAACTGGTGG	GGGCCTCCTCTATGGTG	62°
<i>NRAS EX 3</i>	GGTGAAACCTGTTTGTGGA	ATACACAGAGGAAGCCTTCG	56°
<i>HRAS EX 2</i>	CAGGCCCTGAGGAGCGATG	TTCGTCCACAAAATGGTTCT	62°
<i>HRAS EX 3</i>	TCCTGCAGGATTCCTACCGG	GTTACCTGTACTGGTGGA	62°
<i>KRAS EX 2</i>	GACTGAATATAAACTTGTGG	CTGTATCAAAGAATGGTCCT	64°
<i>KRAS EX 3</i>	GACTGTGTTTCTCCCTTCT	TGGCAAATACACAAAGAAAG	60°

Tabella 1: Sequenze primer utilizzate nell'analisi genetica del gene RAS

GENE	PRIMER FORWARD 5'-3'	PRIMER REVERSE 5'-3'	T annealing
<i>RET EX 10</i>	GGCTGAGTGGGCTACGTCTG	CAGCCCCACAGAGGTCTCAA	60°
<i>RET EX 11</i>	CCTCTGGCGGTGCCAAGCCTC	CAACGCTGGGCAGACGAGG	69°
<i>RET EX 13</i>	AAGCCTCAAGCAGCATCGTC	TGTTCTCCCTTTTCTCCCT	57°
<i>RET EX 14</i>	GGAAGACCCAAGCTGCCTGA	TCTGCACCCAGCCAGCCCCG	62°
<i>RET EX 15</i>	AGGTCTACCAGGCCGCTAC	GCAGGCAGTGCCCTTGGGAAG	64°
<i>RET EX 16</i>	AGGGATAGGGCCTGGCCTTCT	CCCGTCTGTGCAGCTTGGC	64°

Tabella 2: Sequenze primer utilizzate nell'analisi genetica del gene RET

5.5 Elettroforesi di acidi nucleici

L'elettroforesi di acidi nucleici è un processo nel quale molecole e particelle cariche, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo che ha carica opposta. Grazie alla presenza dei gruppi fosfato, (PO_4^{3-}), le molecole di DNA ad alta carica negativa migrano verso l'anodo se sottoposte all'azione di un opportuno campo elettrico. Per eseguire la separazione elettroforetica di acidi nucleici è necessario preparare un gel sospendendo 2,2g di agarosio in 110 ml di tampone TAE 1X (Tris-Acetic acid-EDTA), addizionato poi con 10 μl di red gel, agente intercalante utile per evidenziare il DNA durante la corsa elettroforetica. E' quindi possibile osservando il gel (Figura 10) ad un trans illuminatore e quindi individuare i diversi campioni caricati. Il gel d'agarosio agisce da separatore molecolare: le maglie reticolate del gel, di determinate dimensioni, permettono il passaggio di molecole di ugual dimensione o più piccole, ma ostacolano quello di molecole di dimensione maggiori, rallentandone il cammino. La misura delle maglie è funzione della concentrazione iniziale d'agarosio: si ottengono maglie larghe usando basse concentrazioni di agarosio, mentre maglie più piccole si ottengono con concentrazioni più elevate.

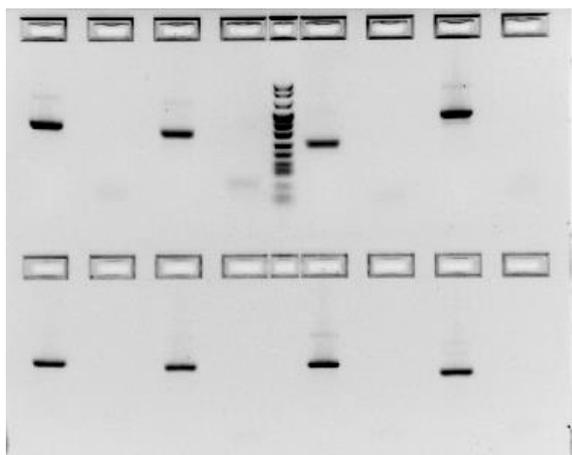


Figura 10: Immagine di un gel di agarosio

5.6 Purificazione dei prodotti di amplificazione

La purificazione dei prodotti di amplificazione è necessaria per eliminare possibili residui di primer e/o nucleotidi. È eseguita mediante le colonnine Amicon Ultra Centrifugal Filter Device (Millipore).

5.7 PCR di sequenza e successiva purificazione

La PCR di sequenza del prodotto purificato viene eseguita seguendo il protocollo Big-Dye Terminator. Al termine del ciclo Big-Dye il prodotto viene purificato dai sali, dNTPs e molecole a basso peso molecolare usando colonnine Illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare). Il purificato così ottenuto è pronto per essere processato al sequenziatore automatico (Applied Biosystem).

5.8 Sequenziamento genico

È stato utilizzato il sequenziatore automatico ABI PRISM (Applied Biosystem). Il sequenziatore utilizza il metodo di Sanger che può essere automatizzato mediante l'utilizzo di dispositivi in grado di valutare la separazione delle specie molecolari durante la corsa elettroforetica. All'interno del sequenziatore automatico il campione passa attraverso un capillare che contiene una matrice con la stessa funzione di separazione dei frammenti normalmente svolta dal gel di poliacrilamide. Vengono utilizzati dideoxynucleotide (ddNTPs) marcati con fluorocromi e l'uso di fluorocromi diversi per le quattro basi permette di separare i prodotti di elongazione mediante una singola elettroforesi capillare. Il rivelatore riconosce i diversi picchi di fluorescenza, ciascuno con emissione a una determinata lunghezza d'onda, generati dai quattro diversi ddNTPs. In questo modo la sequenza nucleotidica del frammento di interesse può essere ricostruita da un computer. Misurazioni successive dell'emissione in fluorescenza producono un elettroferogramma, che può essere interpretato per ottenere la sequenza. La sequenza è

rappresentata da una serie di picchi, uno per ogni posizione del nucleotide di interesse. Nel nostro caso, un picco verde è una adenina (A), il blu è una citosina (C), il nero è una guanina (G), e il rosso è una timidina (T). I sequenziatori automatici possono lavorare su frammenti di 200-1000 nucleotidi ed il sequenziamento di un frammento di DNA con 500 basi azotate dura poco più di 30 minuti.

5.9 Colture cellulari di linee stabilizzate (TT e MZ-CRC-1)

Sono state utilizzate due linee cellulari stabilizzate di carcinoma midollare tiroideo: TT e MZ-CRC-1. Entrambe derivano dalla European Collection of Cell Cultures (ECACC, Sigma-Aldrich, Milano, Italy). Le due linee, TT e MZ-CRC-1, vengono coltivate in RPMI 1640 (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplementato rispettivamente con l'8 % e il 10% di siero bovino fetale (FBS; Gibco), L-glutammina (2 mM) e penicillina streptomina (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.

5.10 Colture cellulari primarie derivate da tumori midollari di tiroide

Il tessuto derivante da pazienti con MTC è stato trasferito nel terreno DMEM-F12 completo immediatamente dopo l'operazione chirurgica. In seguito ad un lavaggio con PBS addizionato con penicillina streptomina 2X, si procede sminuzzando il tessuto servendosi di bisturi, aghi e eventualmente forbici. Al pezzo intraoperatorio di MTC viene quindi aggiunta collagenasi (2mg/ml) e si procede incubando per circa 45-50' nel terreno di coltura nel bagnetto a 37°C in agitazione massima. Le cellule disgregate vengono pipettate in modo da rompere gli ultimi aggregati, piastrate in terreno al 10% FBS e lasciate incubare a 37°C, 5% CO₂ per almeno 48 ore. I reagenti per le colture cellulari sono

tutti prodotti dalla ditta Invitrogen.

5.11 Composti chimici analizzati

ZSTK474 e XL184 sono stato acquistati da Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). EF-24 è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Le polveri sono state sciolte in una soluzione madre 10 mM in dimetilsolfossido (DMSO), seguendo le istruzioni del produttore.

5.12 Saggio di vitalità cellulare-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 i sali di tetrazolio non saranno metabolizzati ed intrappolati nell'ambiente citoplasmatico, ma 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 (Wallac Victor PerkinElmer -Milano) alla lunghezza d'onda di 550 nm, sottraendo il valore di background ottenuto leggendo contemporaneamente alla lunghezza d'onda di 620 nm. I risultati, infine, sono elaborati con il software GraphPad Prism per calcolare il valore di IC50 o concentrazione inibente ossia la concentrazione di farmaco necessaria per ottenere il 50% di effetto inibitorio nelle cellule trattate.

5.13 IC50 e Combination Index (CI)

È stato calcolato il valore di IC50 per ogni linea cellulare, stabilizzata e primaria, trattata con i diversi farmaci. Questo tipo di misura quantitativa indica quanto farmaco è necessario al fine di inibire la metà del processo biologico in esame. Il valore di IC50 viene determinato servendosi di una curva dose-risposta e analizzando l'effetto del farmaco a diverse concentrazioni. Nel mio progetto di ricerca il valore di IC50 è stato calcolato in relazione ai dati del saggio MTT.

I dati ottenuti tramite MTT sono stati analizzati utilizzando Compusyn, un programma che permette di identificare il sinergismo, l'attività additiva o l'antagonismo tra farmaci diversi o tra farmaci e modulatori degli stessi. Esso si basa sul calcolo del Combination Index (CI), una misura quantitativa dell'interazione tra composti. La relazione dose-effetto è stata dapprima calcolata per una diluizione seriali dei farmaci singoli e successivamente è stato calcolato il CI per ogni combinazione. Il CI è una rappresentazione quantitativa del grado di interazione dei composti. Questo metodo di analisi generalmente fissa i valori di $CI < 1$ come sinergismo, $CI = 1$ come effetto additivo mentre valori di $CI > 1$ sono utilizzati per indicare antagonismo.

5.14 Saggio di vitalità cellulare - Trypan blue

Gli effetti citotossici dei vari farmaci, da soli e in combinazione sono stati confermati con la colorazione Trypan blue. Il dosaggio è stato effettuato a 72 ore dopo il trattamento,

utilizzando la singola dose IC50 determinata mediante saggio MTT. Il saggio è stato eseguito lavorando in piastre da 24 well. Al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte mediante tripsinizzazione (100µl), e bloccate con FBS (100µl) per un volume finale noto di 200µl. Successivamente, 50 µl di sospensione cellulare risultante sono stati mescolati con 50 µl di Trypan blue (0,4 % in PBS). Il numero di cellule non colorate, non-stained viable cells (NSt) e di cellule morte colorate, stained dead cells (St) è stato determinato con un emocitometro. La vitalità cellulare è stata poi calcolata con la seguente formula:

$$\text{Vitalità (\%)} = \left[\frac{\text{NSt cell}}{\text{NSt cell} + \text{St cell}} \right] \times 100$$

I risultati sono stati interpretati come rapporto tra cellule vitali dopo trattamenti farmacologici e quelle del controllo non trattato.

5.15 Estrazione proteica da cellule

Al termine del trattamento, viene eliminato il terreno di coltura ed effettuata l'estrazione delle proteine. È stato aggiunto il buffer di lisi completo al pellet di cellule ottenuto dopo tripsinazione, a cui è stato addizionato prima dell'uso un cocktail di inibitori delle proteasi e fosfatasi (Sigma- Aldrich) e l'1% di TRITON X-100. Le proteine sono state agitate a bassa temperatura (4°C) per circa 1 ora e successivamente centrifugate a 8000 rpm per 10' a 4°C. Il sovrantante è stato trasferito in una nuova provetta ed è stata analizzata la concentrazione proteica. Infine le aliquote sono congelate a -80°C.

5.16 Quantificazione della concentrazione proteica

Per la rivelazione e la quantificazione colorimetrica delle proteine totali viene utilizzato il

saggio BCA Protein Assay Thermo Scientific™ Pierce™, una formulazione compatibile con diversi detergenti, a base di acido bicineonico (BCA). Questo metodo combina la riduzione del Cu^{2+} a Cu^{1+} in ambiente alcalino con il rilevamento colorimetrico altamente sensibile e selettivo del catione rameoso (Cu^{1+}). Il prodotto di reazione color porpora di questo saggio è formato dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rameoso. Questo complesso presenta una forte assorbanza idrosolubile a 562nm che è quasi lineare con concentrazioni crescenti di proteine in un ampio campo di lavoro (20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tale evento determina la formazione di un intenso colore violetto con un massimo di assorbimento a 562 nm. Le concentrazioni di proteine in generale sono determinate e riportate in riferimento a una retta di taratura costruita utilizzando una scala di concentrazioni note di BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma).

5.17 Western Blot

Tramite Western Blot è stato analizzato il coinvolgimento di importanti pathway di segnalazione interessate nella proliferazione e nella morte cellulare tra cui le vie di PI3K/Akt/mTOR e di Raf/MEK/ERK.

Tale tecnica sfrutta prima una elettroforesi denaturante (SDS-PAGE), grazie alla quale le proteine migrano nel gel di poliacrilamide in base alle loro dimensioni ed alla carica elettrica. Le proteine vengono quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (blotting) e successivamente incubate con un anticorpo specifico (anticorpo primario), a cui segue un anticorpo secondario marcato con sonde fluorescenti. Infine l'immunoreattività viene evidenziata attraverso la lettura delle bande a 700 nm e 800 nm mediante il sistema Odyssey CLX (LI-COR BioSciences-Milano), strumento che sfrutta i raggi infrarossi per la rivelazione del segnale. Gli anticorpi primari testati su una aliquota proteica di 40 μg sono: anti-Erk1/2, antiphospho- Erk1/2 (Thr202/Tyr204), anti-Akt, antiphospho-Akt (Ser473), anti-VEGFR-2, anti-phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) e anti-GAPDH (Cell Signaling Technology) tutti diluiti 1:1000 in TTBS e BSA 5%. Gli anticorpi secondari, IRDye sono anti-mouse e anti-rabbit diluiti entrambi 1:10000 in TTBS. I dati sono stati elaborati con il software Image Studio™ for Odyssey CLx.

5.17.1 Soluzioni utilizzate per l'analisi di Western Blot

Running gel

H₂O 3,3 ml; Tris/HCl 2,5 ml (pH 8,8; 1,5 M); 40% Acrilamide 2,425 ml; Bis-acrilamide 1,675 ml; 20% SDS 0,1 ml; APS 10% 0,050 ml; TEMED 0,012 ml.

Stacking gel

H₂O 2,3 ml; Tris/HCl 1 ml (pH 6,8; 0,5 M); 40% Acrilamide 0,390 ml; Bis-acrilamide 0,210 ml; 20% SDS 0,05 ml; 10% APS 0,025 ml; TEMED 0,010 ml.

Sample Buffer 4X

10% SDS 3,2 ml; Tris-HCl 2 ml (pH 6,8; 0,5 M); β-mercaptoetanol 10 mM 0,8 ml; 20% v/v, Glicerolo 3,2 ml; 0,05% Blu di bromofenolo 0,8 ml; H₂O sterile 6 ml.

Running buffer 10X 1L

30,3 g Trizma base; 144 g Glicina; 10 g SDS 1%. Portare a volume con H₂O sterile.

Blotting buffer 10X 1L

30,3 g Trizma base; 144 g Glicina. Portare a volume con H₂O sterile, dopo aver aggiunto 20% metanolo.

5.18 In-Cell Western Assay (ICW)

Questo metodo sviluppato da LI-COR consiste in un saggio di immunocitofluorescenza per quantificare le proteine direttamente in cellule in coltura. Determinare la quantità di proteine direttamente nel loro contesto cellulare incrementa ulteriormente la precisione della quantificazione. Le proteine vengono determinate nelle cellule fissate direttamente nelle micropiastre nelle quali vengono fatte crescere.

Sono stati analizzati i segnali di Akt e di ERK nelle colture cellulari primarie. Le cellule sono

state piastrate in piastra da 96 pozzetti, 5000 cellule per pozzetto in terreno DMEM F12 10% FBS. Le cellule sono state trattate con i farmaci per 4 ore, in seguito sono state fissate con metanolo freddo 10 minuti in agitazione moderata. Sono stati successivamente eseguiti dei lavaggi con PBS prima di procedere con il bloccaggio per 90 minuti con 5% di latte in TTBS (TBS1X + 0,1% Tween 20). Si incubano poi le cellule con 50µl per pozzetto di anticorpo primario a 4 °C overnight. Gli anticorpi primari testati sono: anti-Erk1/2, antiphospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), anti-Akt, anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-GAPDH (Cell Signaling Technology). Le forme totali degli anticorpi così come il GAPDH sono stati diluiti 1:100 con latte al 5% in TTBS, le forme fosforilate sono state diluite sempre in latte al 5% in TTBS 1:200. I pozzetti sono poi stati lavati 5 volte con PBS prima di procedere all'incubazione con 20µl di anticorpo secondario per 60 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi secondari, IRDye, sono anti-mouse e anti-rabbit diluiti entrambi 1:800 in latte 5% TTBS (Figura 11). Al termine dell'incubazione si effettuano ulteriori 5 lavaggi in PBS e rimosso tutto il liquido di lavaggio si esegue la scansione allo strumento Odyssey CLX. I dati sono stati elaborati con il software Image Studio™.

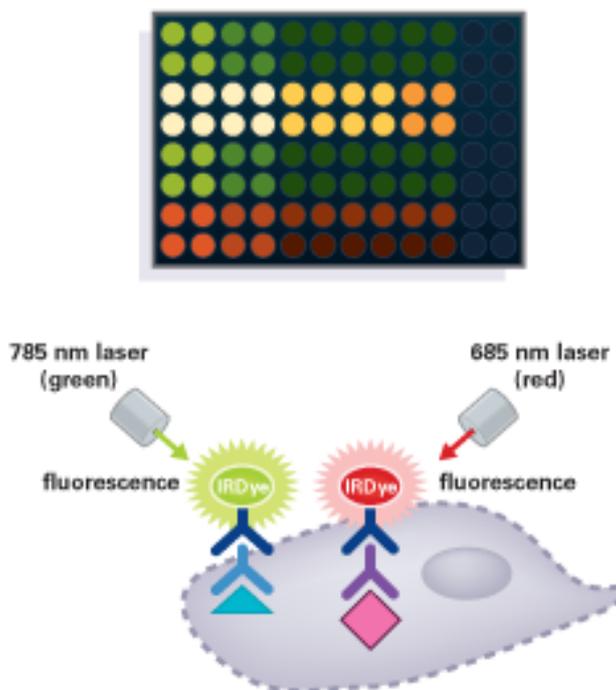


Figura 11: In-Cell Western™ Assay, rappresentazione schematica del sistema antigene-anticorpo e rivelazione del segnale all'interno della cellula.

5.19 Analisi del ciclo cellulare attraverso la tecnica citofluorimetrica

Il ciclo cellulare è analizzato attraverso la colorazione con lo ioduro di propidio (PI). Le cellule TT e MZ-CRC-1 sono state piastrate all'80% di confluenza e trattate per 72 ore con i farmaci singoli e con le combinazioni diluiti in terreno RPMI. Le cellule sono state raccolte dopo tripsinizzazione e risospese in PBS freddo. Successivamente sono state fissate in etanolo 70% freddo ed incubate overnight -20°C. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state colorate con una soluzione di ioduro di propidio 50 µg/ml e RNaseA 10 µg/ml (Sigma) ed incubate al buio per 1 ora 37°C in agitazione per permettere l'azione di digestione dell'RNA da parte dell'enzima. L'analisi è eseguita in triplicato, utilizzando il citofluorimetro FC500 Beckman Coulter.

5.20 Valutazione della morte cellulare programmata per apoptosi in citofluorimetria

L'apoptosi è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica utilizzando il kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Bender MedSystems). Il kit si basa sulla capacità dell'Annessina V, coniugata alla molecola fluorescente FITC, di legarsi alla fosfatidilserina (PS) e sulla capacità intercalante nel DNA dello ioduro di propidio (IP).

Durante l'apoptosi le cellule subiscono specifiche modificazioni morfologiche, che portano alla perdita dell'integrità di membrana, alla formazione di corpi apoptotici ed alla successiva morte cellulare. Un cambiamento che avviene nella membrana cellulare durante le prime fasi del processo apoptotico è la traslocazione della fosfatidilserina dal lato interno della membrana a quello esterno. È possibile rilevare la PS utilizzando l'Annessina V marcata, una proteina di 35kD che in presenza di specifiche concentrazioni di calcio è in grado di legarsi con alta affinità alla PS. La colorazione dell'Annessina V utilizzata in combinazione con lo ioduro di propidio che lega gli acidi nucleici, è in grado di discriminare le cellule vive dalle morte in quanto lo ioduro di propidio è impermeabile alla membrana delle cellule vive. Grazie a questa combinazione possiamo ottenere un profilo

dove le cellule vitali risultano negative ad entrambi i marker; quelle nelle prime fasi dell'apoptosi sono positive per l'Anessina e negative per lo ioduro di propidio, mentre quelle in apoptosi più tardiva sono positive per entrambi i marker.

5.21 Saggio di motilità Wound Healing Assay

Le cellule sono state piastrate in RPMI 10% FBS in multiwell da 6 ad una concentrazione di cellule tale da formare un monostrato di cellule quasi confluenti. Il giorno seguente si rimuove il terreno e si eseguono quindi degli "scratch" sul monostrato con una punta sterile P200 basandosi come riferimento su delle croci disegnate sul retro della piastra ancor prima di seminare le cellule al fine di rendere l'esperimento il più uniforme e più riproducibile. Si effettua un lavaggio in PBS e si aggiunge quindi il farmaco o le combinazioni di farmaci diluiti in terreno. Le cellule riempiono nel tempo lo spazio creato con lo scratch e la crescita viene monitorata nel tempo mediante fotografie scattate sempre nello stesso campo, a partire dal tempo zero che corrisponde all'inizio del trattamento. Terminato il test si analizzano le immagini per misurare di quanto sono avanzati nel tempo i fronti cellulari. I dati vengono elaborati con il programma ImagJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda USA) al fine di ottenere le percentuali relative alla motilità cellulare rispetto al controllo non trattato.

5.22 Quantificazione della calcitonina

Le cellule TT, MZ-CRC-1 e le due colture primarie sono state trattate per 72 ore con i farmaci, singolarmente e in combinazione. La secrezione di calcitonina è stata quantificata nel soprannatante cellulare dopo il trattamento con i farmaci. In breve, le cellule sono state seminate in piastre di coltura e trattate per 72 ore. Al termine del trattamento il soprannatante è stato raccolto ed i livelli di calcitonina sono stati quantificati utilizzando il metodo analitico LIAISON Calcitonin_II-Gen (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA), che impiega un immunodosaggio di tipo chemiluminescente.

5.23 Livelli intracellulari dei ROS (test DCFH-DA)

Le cellule MZCRC1 e TT (3×10^5 /pozzetto in piastre da 6 pozzetti) sono state incubate con EF24, XL184, ZSTK474 singolarmente e in combinazione, per 2 ore a concentrazioni IC50. Trenta minuti prima della fine del trattamento, sono stati aggiunti a ciascun campione 2', 7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, Milano, Italia), ad una concentrazione finale di 5 μ M. Le cellule sono state quindi raccolte e metà di esse sono state analizzate mediante citometria a flusso (CytoFLEX Analyzer, Beckman Coulter, CA, USA), mentre per le rimanenti, la fluorescenza è stata quantificata mediante lettore di piastre (Victor-X3 multilabel counter, Perkin Elmer, Finlandia). I dati ottenuti dalla citometria a flusso sono stati acquisiti e analizzati utilizzando il software CytExpert (Beckman Coulter, CA, USA). Per l'induzione dello stress ossidativo come controllo interno, le cellule sono state trattate con 10 μ M di H₂O₂ per 2 ore in terreno completo e sono stati raccolti almeno 10.000 eventi per ciascun campione. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

5.24 Analisi statistica

Nel presente lavoro sono state eseguite le seguenti analisi statistiche: regressione non lineare applicata alle curve dose-risposta per calcolare i valori di IC50; test t di Student con soglia di significatività $p < 0,05$ per confrontare il controllo non trattato con i diversi trattamenti farmacologici nella colorazione con Trypan blue ,nella quantificazione del segnale di banda del Western Blot e nel saggio di motilità .Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il Software GraphPad Prism 5.03 per Windows (GraphPad , San Diego,CA, USA).

6. RISULTATI

6.1 Saggi di vitalità MTT e determinazione dei valori di Combination Index (C.I.) per XL184, ZSTK474 ed EF24 nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT

Sono stati valutati gli effetti in vitro di XL184, ZSTK474 e EF-24 nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT (Figura 12A e 12B). I valori di IC50 (Inhibitory Concentration 50, definito come il 50% dell'effetto massimo osservato) sono stati misurati dopo 72 ore di trattamento. Dapprima è stato eseguito test di vitalità MTT in un ampio intervallo di dosi comprese tra 50 e 0,1 μM . Successivamente è stato rifatto l'esperimento centrando il range in un intorno dell'IC50. I dati sono stati elaborati con il software GraphPad Prism.

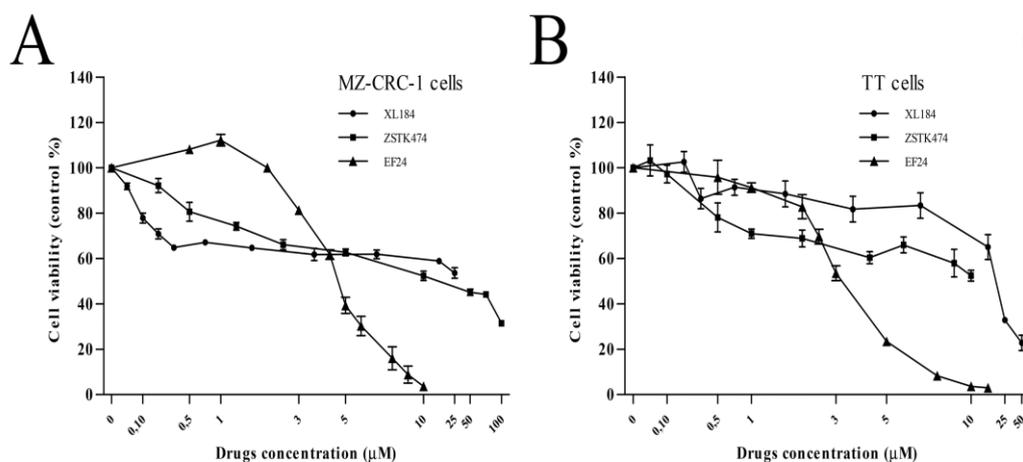


Figura 12: Curve dose-risposta per le linee cellulari MZ-CRC-1 (A) e TT (B) trattate per 72 ore con i diversi farmaci a differenti concentrazioni.

XL184 è risultato essere il farmaco più efficace sulle cellule MZ-CRC-1, con un $\text{IC}_{50} = 0,28 \mu\text{M}$, mentre per le cellule TT il farmaco più efficace era ZSTK474 ($\text{IC}_{50} = 0,6 \mu\text{M}$). Il trattamento con EF24 ha dato una risposta simile in entrambe le due linee cellulari ($\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{M}$ per TT; $\text{I.C.}_{50} = 4,4 \mu\text{M}$ per MZ-CRC-1). La tabella 3 mostra tutti i valori IC_{50} misurati.

FARMACI	Valore IC50 per le TT	Valore IC50 per le MZ-CRC-1
XL184	14 μ M	0,28 μ M
ZSTK474	0,6 μ M	3,3 μ M
EF-24	3,3 μ M	4,4 μ M

Tabella 3: Tabella riassuntiva con i valori di IC50 per le linee cellulari TT e MZ-CRC-1 trattate con i vari farmaci.

Mediante il programma Compusyn è stato calcolato il valore di Combination Index (C.I.) dove per C.I.<1 significa effetto sinergico, per C.I.=1 effetto additivo mentre per C.I.>1 antagonismo tra farmaci.

Per la combinazione XL184 + ZSTK474 abbiamo trovato un C.I. = 0,14 nelle cellule TT e un C.I. = 0,07 nelle MZ-CRC-1. Per la combinazione XL184 + EF24 abbiamo trovato un C.I. = 0,56 nelle cellule TT e un C.I. = 0,27 nelle cellule MZ-CRC-1. Mentre per la combinazione EF24 + ZSTK474 abbiamo riscontrato un effetto quasi additivo in entrambe le linee cellulari (C.I. = 0,84 e C.I. = 0,79 rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1) (Tabella 4).

Cell line	Genotype	C.I.		
		EF24 + ZSTK474	XL184 + ZSTK474	XL184 + EF24
TT	<i>RET</i> ^{C634W}	0.84	0.14	0.56
MZ-CRC-1	<i>RET</i> ^{M918T}	0.79	0.07	0.27

Tabella 4: Valori di Combination Index (C.I.) sulle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT.

Mediante saggio di vitalità eseguito con la colorazione Trypan blue abbiamo confermato gli effetti sulla vitalità cellulare individuati mediante saggio MTT, usando le dosi IC50 (Figura 13).

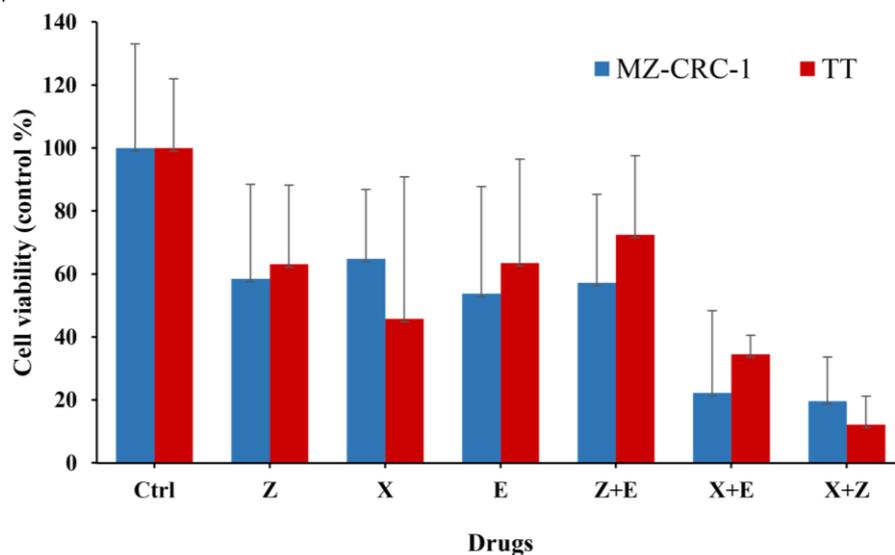


Figura 13: Istogramma della colorazione Trypan Blue per le cellule TT e MZ-CRC-1

Dopo 72 ore, le cellule trattate con XL184 hanno mostrato una vitalità media del 46% e del 65%, rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1. Le cellule trattate con l'analogo della curcumina, EF24, hanno mostrato una vitalità media del 63% e del 54%, rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1. Il solo trattamento con ZSTK474 ha determinato un calo del 63% e del 58% della vitalità, rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1 rispetto ai controlli. La combinazione sinergica data da XL184 + ZSTK474 ha mostrato una riduzione di vitalità del 12% e 20%, rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1, mentre per la combinazione XL184 + EF24 era del 35% e del 22%, per TT e MZ-CRC-1 rispettivamente. Abbiamo anche confermato l'effetto quasi additivo di EF24 + ZSTK474, con una riduzione della vitalità del 73% e del 57%, rispettivamente per le cellule TT e MZ-CRC-1.

6.2 Effetti dei farmaci sulle vie di segnale nelle linee cellulari TT e MZ-CRC-1

Per studiare gli effetti inibitori dei farmaci sui target molecolari abbiamo utilizzato la tecnica del Western Blot analizzando i farmaci singolarmente e in combinazione, sulla fosforilazione di VEGFR2, ERK e Akt nelle cellule TT e MZ-CRC-1 (Figura 14A). Dapprima è stata valutata l'espressione del gene housekeeping, GAPDH, per verificare l'omogeneità dei campioni proteici. Di seguito sono stati analizzati separatamente i risultati ottenuti nelle due linee cellulari.

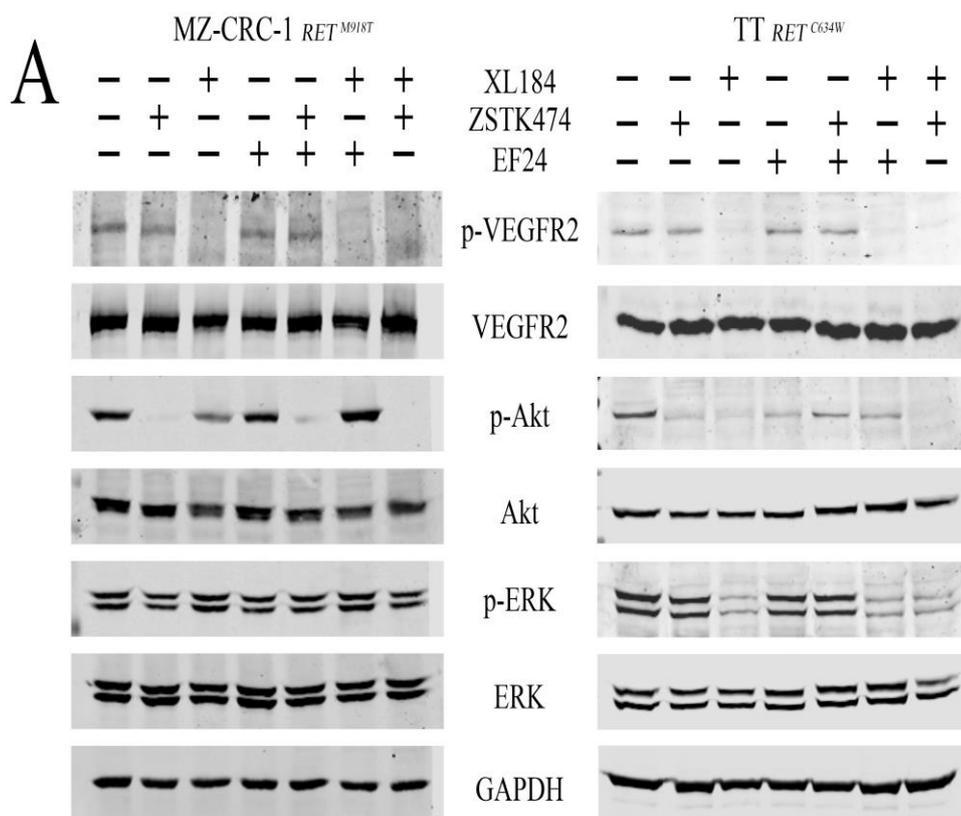


Figura 14A: Analisi Western Blot. Immagine rappresentativa con analisi dell'espressione di GAPDH, ERK, p-ERK, Akt, p-Akt, VEGFR2, p-VEGFR2 in cellule MZ-CRC-1 e TT trattate per 4 ore con dosi di IC50.

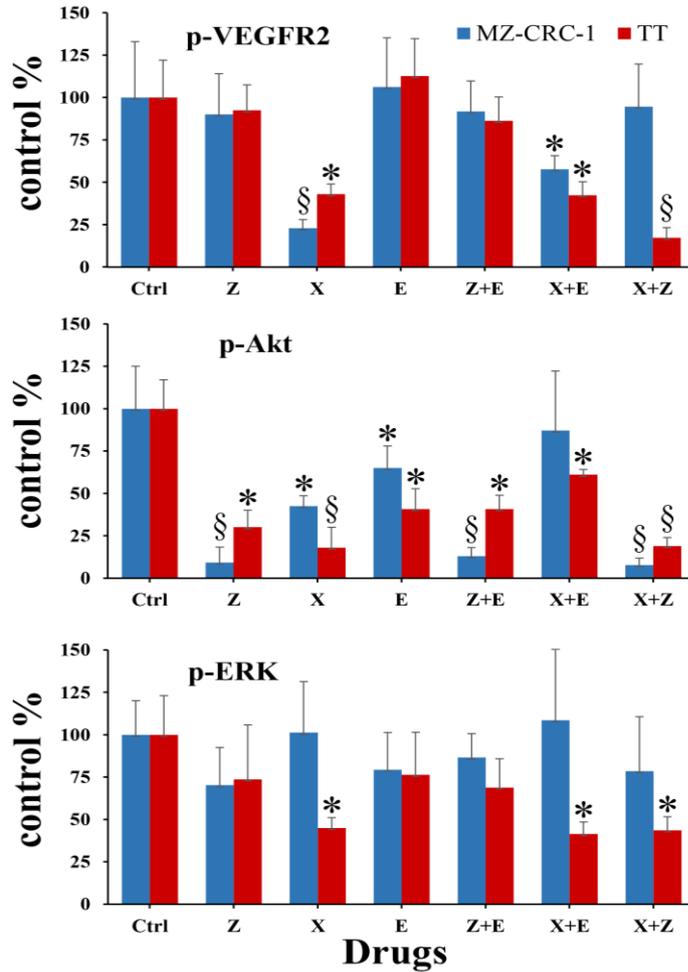
B

Figura 14B: Istogrammi a barre raffiguranti le intensità dei segnali di p-VEGFR, p-Akt e p-ERK nel Western Blot di MZ-CRC-1 e TT trattate con i farmaci rispetto ai livelli di controllo non trattati. ANOVA: *, $p < 0,05$; §, $p < 0,01$.

L' intensità dei segnali delle proteine fosforilate sono stati quantificati come mostrato nella Figura 14B. A livello basale, entrambe le linee cellulari esprimevano intensità simili di VEGFR2 totale, Akt totale e ERK totale. Abbiamo trovato VEGFR2 fosforilato espresso in entrambe le linee cellulari non trattate, mentre una significativa diminuzione del segnale era evidente sul recettore fosforilato dopo il trattamento con XL184, da solo (43% per TT, 23% per MZ-CRC-1) o in combinazione con EF24 (42 % per TT e 58% per MZ-CRC-1), mentre la combinazione XL184 + ZSTK474 ha indotto solo una significativa riduzione del segnale p-VEGFR2 nelle cellule TT (vitalità del 17% rispetto al controllo). Solo XL184 ha

inibito la fosforilazione di Akt in entrambe le linee cellulari (18% per TT, 43% per MZ-CRC-1), così come ZSTK474 (30% per TT, 9% per MZ-CRC-1). EF24 è stato particolarmente efficace nel ridurre il segnale p-Akt nelle cellule TT (41% di vitalità rispetto al controllo). La combinazione XL184 + ZSTK474 ha indotto una significativa riduzione della fosforilazione di Akt in entrambe le linee cellulari (19% per TT, 8% per MZ-CRC-1), così come la combinazione ZSTK474 + EF24 (41% per TT, 13% per MZ -CRC-1), mentre la combinazione XL184 + EF24 era efficace solo nelle cellule TT (61% della vitalità rispetto al controllo). Il segnale p-ERK è stato inibito solo nelle cellule TT trattate con XL184 (45% di vitalità rispetto al controllo), mentre la combinazione di cabozantinib con EF24 o ZSTK474 non ha modificato gli effetti di questi ultimi due farmaci quando sono utilizzati singolarmente (41% e 44%, rispettivamente).

6.3 Valutazione del ciclo cellulare attraverso analisi di citofluorimetria

È stato valutato l'effetto dei farmaci sul ciclo cellulare alle dosi IC50 sia nelle cellule MZ-CRC-1 (Figura 15A) sia nelle TT (Figura 15B). Usato singolarmente, XL184 è stato il farmaco più efficace: ha indotto un sostanziale aumento della fase sub-G1, dall'1% nelle cellule non trattate al 27% per MZ-CRC-1 e il 10% per le cellule TT, con una concomitante riduzione della fase G0/G1. Mentre, ZSTK474 o EF24 singolarmente non hanno provocato alcun aumento significativo della fase sub-G1 in entrambe le linee cellulari. La sinergia, XL184 + ZSTK474, è stata altamente efficace nell'indurre un notevole aumento della fase sub-G1, dall'1% in cellule non trattate al 38% per le MZ-CRC-1 e 16% per le cellule TT, con una concomitante diminuzione della fase G0/G1. La combinazione XL184 + EF24 ha portato ad un aumento della fase G2/M, dal 15% nelle cellule non trattate al 32% nel caso delle cellule MZ-CRC-1, e dal 48% nelle cellule non trattate al 71% nel caso del TT cellule, con una concomitante riduzione della fase G0/G1. La combinazione ZSTK474 + EF24 non ha provocato nessun cambiamento rilevante.

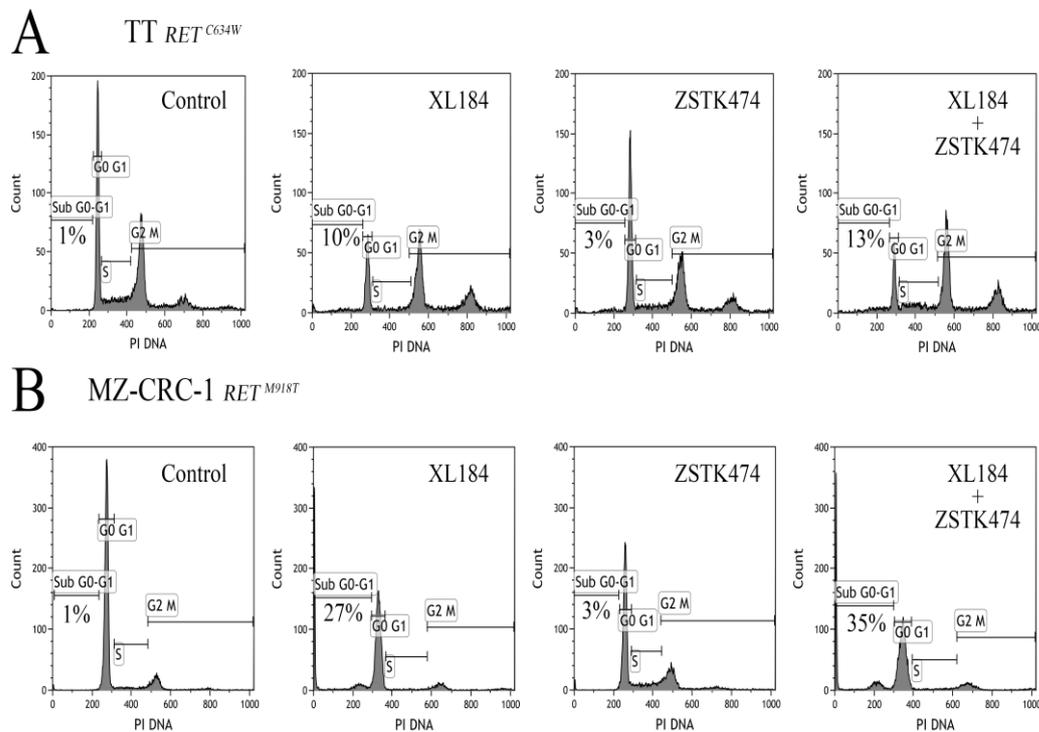


Figure 15: Analisi rappresentativa della distribuzione del ciclo cellulare a 72 ore per le cellule MZ-CRC-1 (A) e TT (B), non trattate o trattate con farmaci con dosi di IC50. In ciascuna barra sono indicate le quattro fasi cellulari (G2/M, S, G0/G1, sub-G1) con le loro percentuali più significative. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

6.4 Valutazione dell'apoptosi per mezzo della colorazione con Annessina V-FITC e ioduro di propidio (PI)

Per determinare il modo in cui i farmaci studiati inducono morte cellulare, si utilizzano due diversi reattivi: Annessina V-FITC e ioduro di propidio (PI). Le cellule sono state valutate dopo 72 ore di trattamento.

La citometria a flusso dopo la colorazione di Annexin V-FITC / propidio ioduro è stata eseguita nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT per discriminare tra apoptosi e necrosi (Tabella 5).

	Control	XL184	ZSTK474	EF24	XL184 + ZSTK474	XL184 + EF24	ZSTK474 + EF24
MZ-CRC-1 cell line							
I-3 (live cells)	97% ± 8	86% ± 5	95% ± 3	94% ± 5	80% ± 7	88% ± 6	92% ± 5
I-4 (early apoptosis)	0% ± 1	0% ± 4	0% ± 5	1% ± 1	0% ± 3	1% ± 5	2% ± 1
I-2 (necrosis)	1% ± 1	1% ± 1	0% ± 2	2% ± 1	0% ± 1	2% ± 1	1% ± 1
I-1 (dead cells)	2% ± 3	13% ± 3	5% ± 3	3% ± 1	20% ± 4	9% ± 3	5% ± 3
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
TT cell line							
I-3 (live cells)	94% ± 8	27% ± 5	81% ± 7	70% ± 5	13% ± 7	35% ± 2	56% ± 5
I-4 (early apoptosis)	1% ± 1	1% ± 1	7% ± 2	5% ± 3	9% ± 3	5% ± 5	11% ± 5
I-2 (necrosis)	1% ± 1	40% ± 5	6% ± 2	8% ± 1	50% ± 6	38% ± 4	13% ± 1
I-1 (dead cells)	4% ± 3	32% ± 3	6% ± 3	17% ± 4	28% ± 2	22% ± 3	20% ± 3
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 5: Analisi dell'apoptosi in seguito al trattamento con i farmaci. Citometria a flusso con colorazione annessina V - FITC/ioduro di propidio in cellule MZ-CRC-1 e TT a 48 h. Le cellule sono state trattate usando le dosi IC50. Sono riportate le percentuali di I-1 (cellule morte), I-2 (necrosi/apoptosi tardiva), I-3 (cellule vive) e I-4 (apoptosi precoce). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti separati.

I risultati più rilevanti sono mostrati nella Figura 16, dove il riquadro I-3 individua le cellule vive, in I-4 le cellule in apoptosi precoce, in I-2 quelle in necrosi/apoptosi tardiva mentre nel I-1 le cellule morte. Un aumento consistente della percentuale di cellule MZ-CRC-1 morte era evidente dopo il trattamento con XL184, usato sia singolarmente che in combinazione con ZSTK474 (dal 2% in cellule non trattate al 13% in cellule trattate con XL184 e il 20% in quelle trattate con entrambi XL184 e ZSTK474, Figura 16A). Un aumento

del grado di necrosi/apoptosi tardiva è stato osservato nelle cellule TT trattate con XL184 da solo (dall'1% nelle cellule di controllo al 40%) o in combinazione con ZSTK474 (dall'1% nelle cellule di controllo a 50%), Figura 16B.

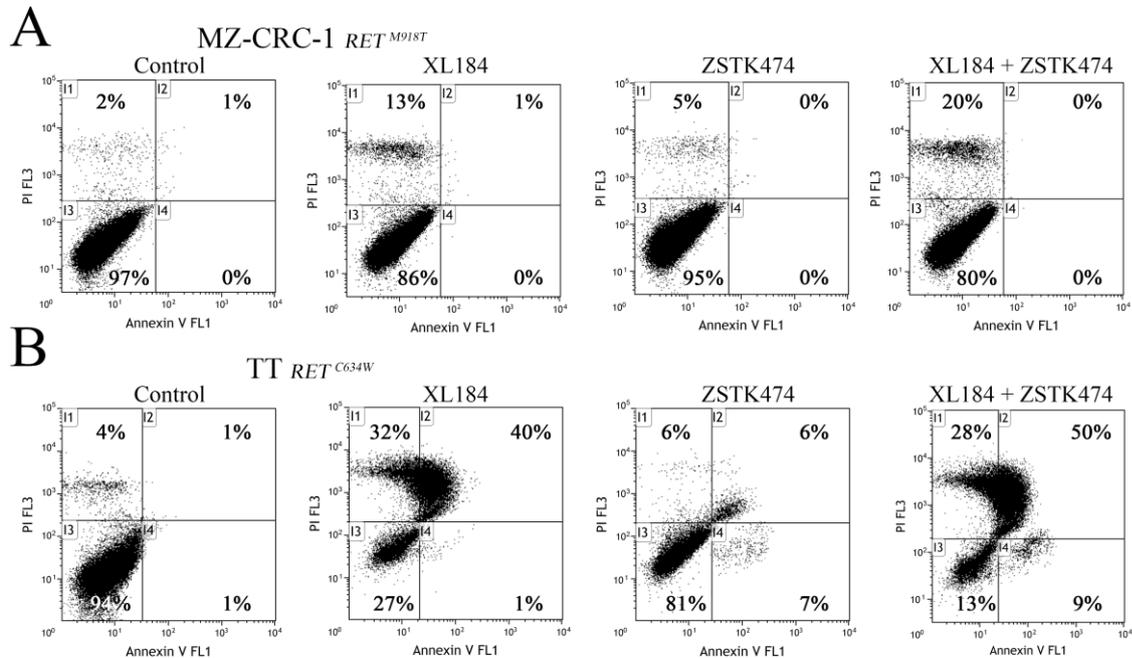


Figura 16: Apoptosi in seguito ai trattamenti farmacologici. Citometria a flusso rappresentativa con colorazione di Annexin V-FITC / propidio ioduro in cellule MZ-CRC-1 (A) e TT (B) a 72 ore. Le cellule sono state trattate con farmaci, singolarmente o in combinazione, usando dosi di IC50. I riquadri mostra le percentuali di I1 (cellule morte), I2 (necrosi), I3 (cellule vive) e I4 (apoptosi precoce). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti separati.

6.5 Effetti dei composti sulla secrezione di CT nelle linee cellulari stabilizzate di MTC

Per esaminare gli effetti dei farmaci sui livelli di secrezione di CT nel terreno di coltura è stato utilizzato un test immunologico chemiluminescente. Come mostrato nella Figura 17, per entrambe le linee cellulari i livelli di CT erano significativamente più bassi rispetto al controllo dopo 72 ore con solo XL184 o EF24 o con le combinazioni ZSTK474 + EF24 o XL184 + ZSTK474. La combinazione XL184 + EF24 è stata efficace solo nel ridurre la secrezione di CT nelle cellule TT. Il trattamento con ZSTK474 da solo non ha avuto alcun effetto sulla secrezione di CT (rispetto al controllo) in entrambe le linee cellulari.

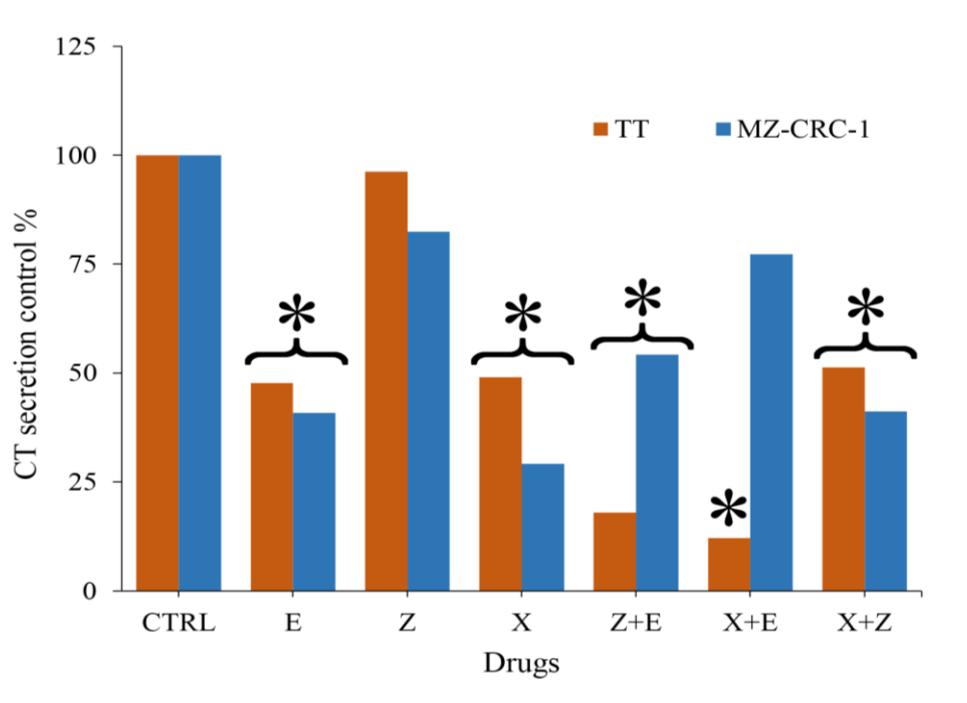


Figura 17: Effetti dei composti sulla secrezione di CT. Effetto dei composti XL184, EF24 e ZSTK474, singolarmente e in combinazione, sulla secrezione di calcitonina nelle cellule TT e MZ-CRC-1 nel mezzo di coltura, rispetto al controllo, a 72 ore. Le analisi sono state eseguite utilizzando LIAISON® Calcitonin_II-Gen. ANOVA: *, $p < 0,05$.

6.6 Saggio di mobilità cellulare di TT e MZ-CRC-1

Abbiamo eseguito un test di Wound Healing Assay per poter esaminare l'effetto di XL184, ZSTK474 ed EF24 sulla migrazione delle cellule TT e MZ-CRC-1, un processo fondamentale nella crescita del tumore. Dopo 120 ore di trattamento, la migrazione di entrambe le linee cellulari è stata trovata significativamente (* $p < 0,05$) inibita da XL184, da solo o in combinazione con EF24, e con ZSTK474, rispetto alle cellule non trattate (Figura 18A e 18B).

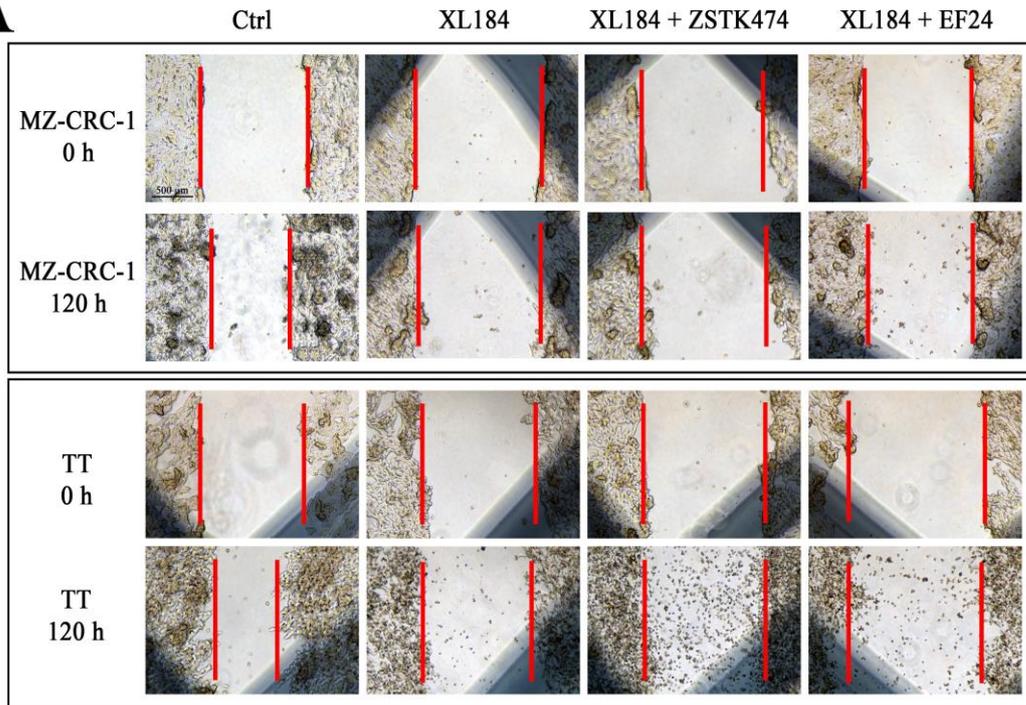
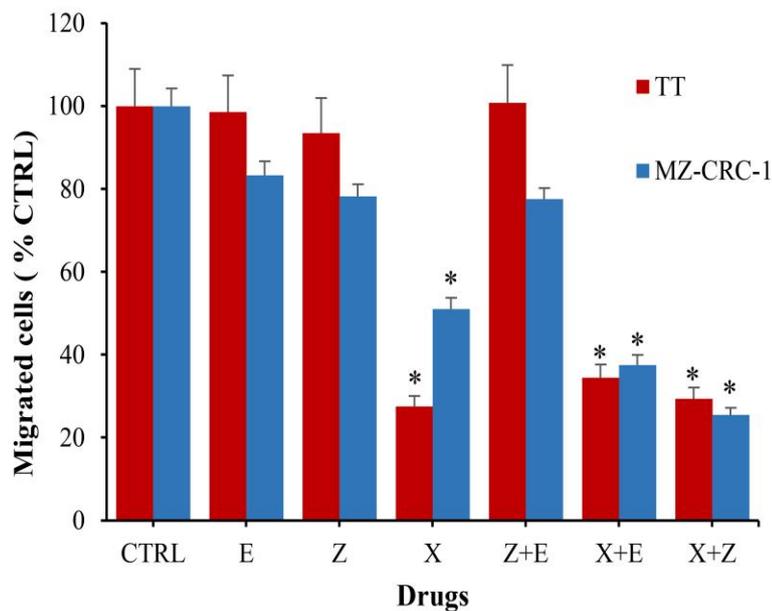
A**B**

Figura 18: (A) Immagine rappresentativa del test wound healing assay per le cellule trattate MZ-CRC-1 e TT con e senza trattamenti, al tempo 0 e dopo 120 h (40X). Le linee rosse indicano l'area del contorno dello scratch. L'area della ferita è stata misurata dopo 120 ore in ciascun gruppo. (B) Valutazioni quantitative della migrazione cellulare indotta dal trattamento con i composti singolarmente che in combinazione. I risultati sono stati espressi come la riduzione in percentuale dello scratch iniziale rispetto alle corrispondenti cellule non trattate. I dati sono la media di nove misurazioni e gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. Le barre rappresentano SD della media. One-way ANOVA: *, $p < 0,05$.

6.7 EF24 aumenta i livelli di ROS intracellulari

Abbiamo studiato se i livelli intracellulari dei ROS nelle linee cellulari TT e MZ-CRC-1 possono essere modificati da EF24, XL184 o ZSTK474. Il trattamento con EF24 o ZSTK474, singolarmente, ha determinato un aumento in modo significativo ($p < 0,05$) dei livelli intracellulari dei ROS (rispetto ai controlli non trattati, impostati come 100%), rispettivamente del 65% e del 32%, nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e del 29% e il 38%, rispettivamente, nelle linee cellulari TT. Al contrario, XL184 da solo ha provocato una diminuzione del 22% e del 32% nelle celle MZ-CRC-1 e TT, rispettivamente, Figura 19A e 19B). Il trattamento con ZSTK474 combinato con EF24 ha aumentato significativamente i livelli intracellulari dei ROS in entrambe le linee cellulari (rispettivamente del 91% e del 35% per le cellule MZ-CRC-1 e TT). Quando XL184 veniva usato in combinazione con EF24, tuttavia, i livelli di ROS intracellulari sono diminuiti in entrambe le linee cellulari (rispettivamente del 34% e del 32% per le cellule MZ-CRC-1 e TT).

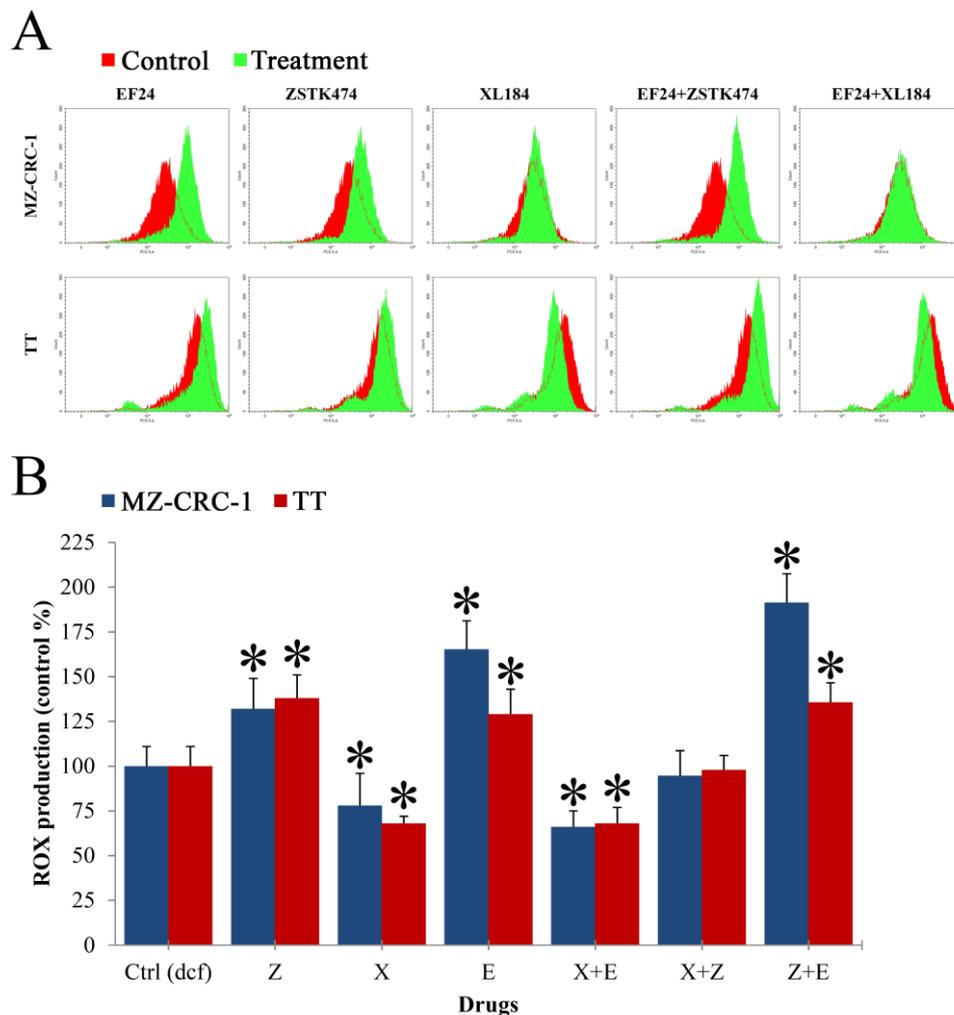


Figura 19: Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dopo trattamento (A) Istogramma rappresentativo dell'analisi citofluorimetrica dei livelli di ROS nelle cellule MZ-CRC-1 e TT dopo il trattamento con EF24, ZSTK474 e XL184. (B) Produzione ROS. Le cellule MZ-CRC-1 e TT sono state trattate con i farmaci, singolarmente e in combinazione, per 2 ore. Le cellule sono state colorate con DCFH-DA per 30 minuti e analizzate mediante citofluorimetria. I dati rappresentano media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test t di Student. * $P < 0.05$.

6.8 Effetti dei composti nelle colture primarie ottenute da pazienti con MTC

Una mutazione somatica RET è stata trovata in un solo caso (paziente B.R.), localizzata nell'esone 16 nel codone 918 (*M918T*). Non sono state trovate mutazioni somatiche per i geni N, H e K-RAS in nessuno dei sei pazienti analizzati. Gli effetti di XL184, ZSTK474 ed EF24, singolarmente e in combinazione, sono stati esaminati su colture primarie ottenute

dai sei pazienti dopo che erano state sottoposte a tiroidectomia totale per MTC. Tutti i valori di CI sono presentati nella Tabella 6.

Combination Index (CI)				
Patient	Genotype	XL184 + ZSTK474	XL184 + EF24	ZSTK474 + EF24
P.D.	RET ^{wt}	0.44	0.28	0.88
G.A.	RET ^{wt}	0.36	0.64	0.72
B.R.	RET ^{M918T}	0.22	0.14	1.09
P.F.	RET ^{wt}	0.34	0.65	1.17
C.C.	RET ^{wt}	0.53	0.60	1.15
M.I.	RET ^{wt}	0.25	0.32	0.76

Tabella 6: Valori di CI per le colture primarie (ottenute da campioni chirurgici di MTC dopo che i pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia) trattate con le combinazioni di XL184, ZSTK474 ed EF24.

L'analisi ha mostrato un effetto sinergico per le combinazioni XL184+ZSTK474 e XL184 +EF24 in tutti i pazienti, e in particolare per il paziente che presenta la mutazione RET *M918T*. È stato osservato solo un effetto di tipo additivo per la combinazione ZSTK474 +EF24. Come mostrato nella Figura 20, i livelli di CT di tutti i pazienti erano significativamente più bassi (rispetto ai controlli) dopo 72 ore di trattamento con XL184 o EF24 usati singolarmente o nelle combinazioni ZSTK474 EF24 e XL184+EF24.

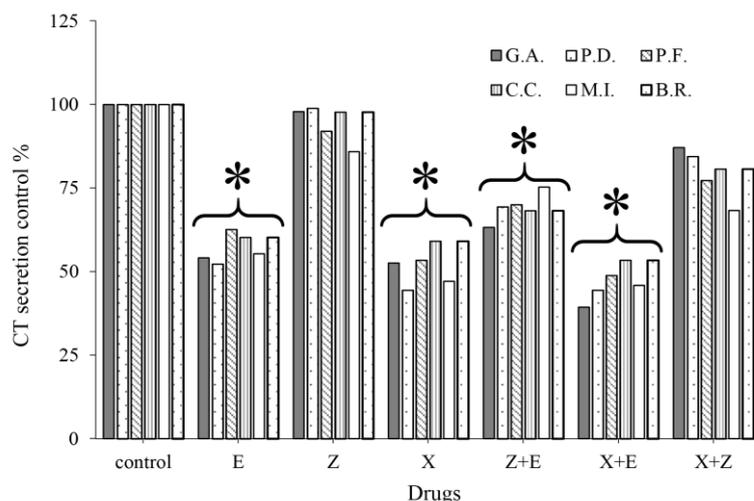


Figura 20: Dosaggio della Calcitonina. Effetto di XL184, EF24 e ZSTK474, singolarmente e in combinazione, sulla secrezione di calcitonina. Secrezione di calcitonina nel surnatante delle colture primarie rispetto al controllo, alle 72 ore. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando LIAISON® Calcitonin_II-Gen. One-way ANOVA: *, $p < 0.05$.

L'analisi ICW è stata utilizzata per testare gli effetti dei composti, singolarmente e in combinazione, sulla fosforilazione di VEGFR2, ERK e Akt (Figura 21). A livello basale, tutti i pazienti hanno espresso quantità simili di VEGFR2 totale, Akt totale e ERK totale. VEGFR2 fosforilato era espresso in tutti i campioni, mentre si è verificata una riduzione del segnale dopo il trattamento con XL184, in particolare per il paziente che presentava la mutazione *RET M918T* ($p < 0,001$). Le combinazioni XL184+EF24 e XL184+ZSTK474 hanno determinato la stessa riduzione del segnale di p-VEGFR2 prodotta usando XL184 da solo, mentre la combinazione ZSTK474+EF24 è risultata efficace solo nel paziente M.I. (Figura 21B). Il segnale p-ERK è stato inibito in modo significativo ($p < 0,05$) in tutti i campioni trattati con XL184, da solo o in combinazione con EF24 o ZSTK474, in particolare nel paziente B.R. ($p < 0,001$, Figura 21C). ZSTK474 ed EF24, singolarmente e in combinazione, hanno indotto una riduzione significativa del segnale p-ERK (rispettivamente in 2/6, 4/6 e 4/6 pazienti. Figura 20C). ZSTK474 da solo ha fortemente inibito la fosforilazione di Akt in tutti i campioni ($p < 0,05$), ma se usato in combinazione con EF24 o XL184, l'effetto era presente in 5/6 campioni (Figura 21D). XL184 ed EF24 usati singolarmente sono risultati essere efficaci in 2/6 e 1/6 pazienti, rispettivamente, mentre la loro combinazione ha portato a una riduzione significativa della fosforilazione di Akt in 4/6 campioni (Figura 21D).

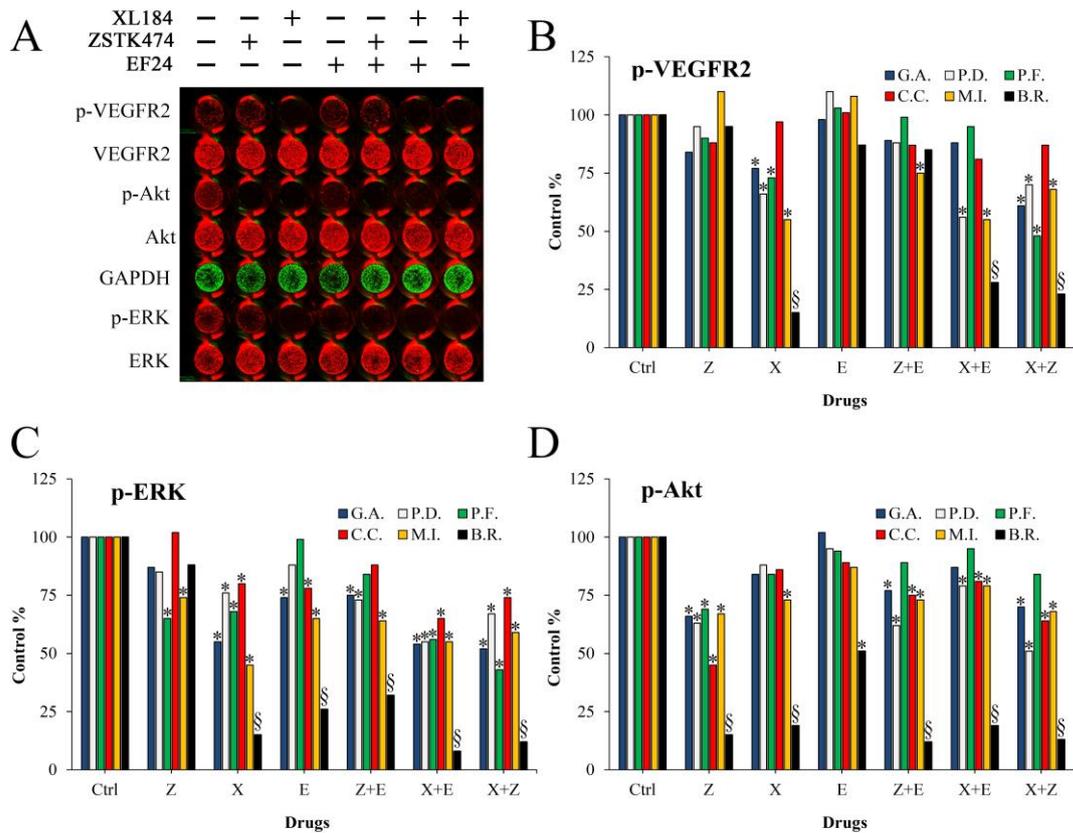


Figura 21: Analisi mediante In-Cell Western. Immagine rappresentativa di una piastra di ICW (A). Gli anticorpi valutati erano: GAPDH, ERK, fosfo-ERK, Akt, fosfo-Akt, VEGFR2, fosfo-VEGFR2 nel paziente che presentava la mutazione *RET M918T* (B.R.) trattato con dosi di 10 μ M per 4 ore. Quantificazione dell'intensità del segnale di fluorescenza rispetto al controllo non trattato per fosfo-VEGFR2 (B), fosfo-ERK (C), e fosfo-Akt (D), in tutti e sei i pazienti dopo il trattamento per 4 ore con dosi di 10 μ M. One-way ANOVA: *, $p < 0.05$; §, $p < 0.01$.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Considerando che attualmente non esistono trattamenti sistemici efficaci per i pazienti che presentano un MTC metastatico, nel presente lavoro di tesi abbiamo valutato nuovi target terapeutici nel carcinoma midollare tiroideo, poiché anche la chemioterapia e/o radioterapia convenzionale hanno dimostrato solo un'efficacia limitata nell'indurre remissione del tumore o stabilizzazione [22].

Al momento non ci sono opzioni terapeutiche per tali pazienti, i quali vengono seguiti mediante dosaggi periodici di CT/CEA e imaging nel tentativo di identificare i siti patologici potenzialmente suscettibili di chirurgia. Tuttavia, alcuni pazienti presentano una malattia progressiva e in questi casi la terapia sistemica di prima linea si basa attualmente sull'uso di TKI [23]. Recentemente sono stati introdotti nuovi approcci terapeutici utilizzando inibitori delle tirosin-chinasi per poter prolungare la sopravvivenza in pazienti con MTC, ma che purtroppo richiedono trattamenti a lungo termine portando ad effetti negativi non trascurabili [24].

Due di questi farmaci, vandetanib e cabozantinib (noto anche come XL184), sono stati recentemente approvati per l'uso in pazienti con MTC in stadio avanzato [25]. Uno studio di fase 3 ha mostrato che XL184 ha fornito il massimo beneficio clinico per i pazienti con MTC che presentavano le mutazioni a carico di *RET*, in particolare la *M918T*, o in *RAS* [26]. Agendo sull'oncogene *RET*, XL184 può anche inibire le vie di segnale necessarie per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali in modo molto simile ad altri inibitori chinasi noti per colpire gli oncogeni responsabili di specifici tumori [27]. Oltre a tali effetti positivi, XL184 è stato anche visto essere in grado di attivare la via HIF nelle cellule ipossiche di MTC, il quale può contribuire alla resistenza ai farmaci aumentando l'espressione dei fattori a valle del segnale [28]. La necessità di protocolli di trattamento di lunga durata e a causa dell'effetto citostatico del farmaco, gli effetti collaterali risultano essere tutt'altro che trascurabili. Inoltre l'insorgenza dei meccanismi di resistenza ai farmaci rimangono tuttora dei problemi irrisolti. Da questo scenario, è nata quindi la necessità di studiare nuove modalità terapeutiche in grado di superare tali problemi.

Il presente studio ha dimostrato, per la prima volta, che ZSTK474 (un inibitore della via PI3K/Akt) e EF24 (un analogo della curcumina) migliorano l'efficacia antitumorali di XL184, sia nelle linee cellulari stabilizzate di MTC che nelle colture primarie. Le combinazioni dei vari farmaci sono risultate essere più efficaci dei singoli composti, come emerso dai saggi di vitalità cellulare MTT e Trypan blu. La loro maggiore efficacia è attribuibile non solo alla loro azione sinergica su specifici obiettivi molecolari, ma anche a particolari effetti esercitati da alcuni farmaci, come un aumento dello stress ossidativo cellulare - come mostrato qui (per la prima volta) in modelli *in vitro* di MTC. L'analogo della curcumina, EF24 è già stato testato su vari tipi di tumore [29] [30] [31] [32], e uno dei suoi principali meccanismi di azione è l'induzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come confermato nel nostro modello MTC. Il trattamento con EF24 ha determinato un aumento dei livelli intracellulari dei ROS, già presenti elevati nelle cellule tumorali di MTC, intensificando così il loro stress ossidativo. Un aumento dei livelli di ROS risulta essere dannoso per la sopravvivenza delle cellule tumorali perché causano uno stress ossidativo che comporta dei cambiamenti a livello del DNA, dei lipidi e delle proteine [33]. Anche il trattamento con ZSTK474 ha determinato un aumentato significativo dei livelli intracellulari dei ROS, specialmente se combinato con EF24. Questi risultati suggeriscono che EF24 (da solo o in combinazione con ZSTK474) ha come effetto predominante quello di aumentare i livelli intracellulari dei ROS in entrambe le linee cellulari, sottolineando la sua forte efficacia quasi indipendentemente da ZSTK474.

L'analisi Western blot e l'ICW ha messo in evidenza importanti differenze tra i patterns di fosforilazione delle linee cellulari stabilizzate e le colture primarie dopo il loro trattamento. Un comportamento così diverso può essere dovuto semplicemente dal fatto che entrambe le linee cellulari stabilizzate presentavano una mutazione in *RET*, mentre le nostre colture primarie sono state ottenute da pazienti che, con una sola eccezione, presentavano *RET* wild type. Sebbene i trattamenti singoli e combinati siano stati particolarmente efficaci nel paziente che presentava la mutazione *RET M918T*, coerentemente con il report di Sherman et al. [26], i nostri dati hanno anche mostrato che i trattamenti in combinazione hanno ottenuto una maggiore riduzione dei segnali di fosforilazione anche nei pazienti *RET* wild type. In particolare, i pazienti che non hanno

risposto a un singolo farmaco hanno risposto al trattamento usando le varie combinazioni.

Per quanto riguarda gli effetti sulla distribuzione del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi, la combinazione XL184 + ZSTK474 ha, anche in questo caso, determinato un aumento significativo della fase Sub-G1, correlato a un aumento significativo della percentuale di cellule morte come dimostrato dal test Annexin V-Fitch/PI.

Samadi et al. hanno usato i Withanolidi, una classe di nuovi composti che inibiscono sia l'attività di RET chinasi sia la via di Akt/mTOR [34]. Poiché la combinazione XL184+ZSTK474 blocca le stesse vie di segnale dei Withanolidi, dovremmo aspettarci risultati simili a quelli riportati da Samadi et al. In realtà il diverso comportamento osservato nel nostro studio potrebbe essere dovuto dal fatto che XL184 è attivo non solo su RET, ma anche su altre tirosin-chinasi (cMET, VEGFR2), determinando così effetti diversi sulla vitalità cellulare.

La combinazione XL184+EF24 ha inoltre arrestato le cellule TT e MZ-CRC-1 nella fase G2/M, senza però indurre l'apoptosi - un risultato che è simile con un precedente studio di Zhao et al., in cui solo l'uso di EF24 non ha avuto alcun effetto nell'indurre apoptosi nelle cellule di carcinoma epatocellulare [32]. Gli stessi autori hanno confermato che l'analogo della curcumina è in grado di ridurre la migrazione delle cellule di carcinoma epatocellulare, cosa che anche noi abbiamo visto sulle cellule TT e MZ-CRC-1 nell'arrestare il ciclo cellulare, anche se da solo EF24 non ha avuto alcun effetto sulla migrazione.

In un precedente lavoro del nostro gruppo [35] avevamo dimostrato che un inibitore di BRAF, RAF265, da solo o in combinazione con ZSTK474, nelle linee cellulari TT, riduceva i livelli di produzione di CT nel surnatante che corrispondevano anche ad una riduzione dell'espressione dello stesso gene.

Nel presente lavoro, abbiamo confermato che il solo ZSTK474 non ha avuto alcun effetto sulla produzione di CT sia nelle linee cellulari di MTC stabilizzate sia nelle colture primarie, e Faggiano et al. aveva già riportato che everolimus (uno specifico inibitore mTOR) non ha avuto effetti sulla produzione di CT [36]. I risultati più interessanti del nostro studio sono emersi dopo il trattamento con EF24, tuttavia: usato da solo, l'analogo della curcumina è stato in grado di ridurre in modo significativo i livelli di CT nelle cellule TT e MZ-CRC-1 e

nelle colture primarie. La combinazione di EF24 con XL184, ha dimostrato di mantenere questa capacità inibitoria in tutte e sei le colture primarie, addirittura anche nei surnatanti dei pazienti risultati essere *RET wild-type*. Questo risultato può essere dovuto agli effetti pleiotropici della combinazione XL184 + EF24, che dovrà essere ulteriormente chiarita.

Riassumendo, i nostri dati confermano che XL184 è il farmaco di riferimento per l'MTC che presenta *RET* mutato, ma l'assenza di una risposta completa dopo le monoterapie evidenzia la necessità di sperimentare singoli composti più attivi o nuove combinazioni terapeutiche. Per la prima volta, abbiamo analizzato EF24 - un analogo della curcuma (*Curcuma longa*) - in un modello in vitro di MTC, scoprendo che, anche usato singolarmente, è efficace nell'inibire la vitalità delle cellule di MTC. Abbiamo anche per la prima volta, testato le nuove combinazioni XL184+ZSTK474 e XL184+EF24 scoprendo che possono agire in modo sinergico sulle cellule di MTC, indipendentemente dallo stato mutazionale dei pazienti. Riteniamo che tali combinazioni rappresentino un approccio terapeutico potenzialmente nuovo all'MTC per i pazienti con *RET wild-type* o come trattamento farmacologico di seconda linea per tutti i pazienti con MTC.

Riteniamo che tali combinazioni possono rappresentare un nuovo approccio terapeutico nel trattamento dell'MTC per i pazienti con *RET wild-type* o potrebbe essere usato come trattamento farmacologico di seconda linea per tutti i pazienti che presentano un MTC.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Gertner, M.E. and E. Kebebew, *Multiple endocrine neoplasia type 2*. *Curr Treat Options Oncol*, 2004. **5**(4): p. 315-25.
2. Boikos, S.A. and C.A. Stratakis, *Molecular mechanisms of medullary thyroid carcinoma: current approaches in diagnosis and treatment*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(1): p. 109-16.
3. Mian, C., et al., *Combined RET and Ki-67 assessment in sporadic medullary thyroid carcinoma: a useful tool for patient risk stratification*. *Eur J Endocrinol*, 2011. **164**(6): p. 971-6.
4. Eng, C., et al., *The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis*. *JAMA*, 1996. **276**(19): p. 1575-9.
5. Tamburrino, A., et al., *Activation of the mTOR pathway in primary medullary thyroid carcinoma and lymph node metastases*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(13): p. 3532-40.
6. Pasini, B., et al., *The physical map of the human RET proto-oncogene*. *Oncogene*, 1995. **11**(9): p. 1737-43.
7. Manie, S., et al., *The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation*. *Trends Genet*, 2001. **17**(10): p. 580-9.
8. Frisk, T., et al., *Expression of RET and its ligand complexes, GDNF/GFRalpha-1 and NTN/GFRalpha-2, in medullary thyroid carcinomas*. *Eur J Endocrinol*, 2000. **142**(6): p. 643-9.
9. Santoro, M., et al., *Minireview: RET: normal and abnormal functions*. *Endocrinology*, 2004. **145**(12): p. 5448-51.
10. Jimenez, C., M.I. Hu, and R.F. Gagel, *Management of medullary thyroid carcinoma*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008. **37**(2): p. 481-96, x-xi.
11. Menko, F.H., et al., *Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(1): p. 393-7.
12. Yip, L., et al., *Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship*. *Arch Surg*, 2003. **138**(4): p. 409-16; discussion 416.

13. Scheffzek, K., et al., *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants*. Science, 1997. **277**(5324): p. 333-8.
14. Capdevila, J. and J. Tabernero, *A shining light in the darkness for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. Cancer Discov, 2011. **1**(3): p. 213-21.
15. Kong, D., S. Yaguchi, and T. Yamori, *Effect of ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on DNA-dependent protein kinase*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(2): p. 297-300.
16. Peyssonnaud, C. and A. Eychene, *The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation*. Biol Cell, 2001. **93**(1-2): p. 53-62.
17. Yakes, F.M., et al., *Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(12): p. 2298-308.
18. Kurzrock, R., et al., *Activity of XL184 (Cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(19): p. 2660-6.
19. Roy, S., et al., *A novel multiple tyrosine-kinase targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple solid tumors: cabozantinib*. Anticancer Agents Med Chem, 2015. **15**(1): p. 37-47.
20. Sikora, E., G. Scapagnini, and M. Barbagallo, *Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases*. Immun Ageing, 2010. **7**(1): p. 1.
21. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Mol Pharm, 2007. **4**(6): p. 807-18.
22. Brierley, J.D., *Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2289-95.
23. Wells, S.A., Jr., et al., *Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma*. Thyroid, 2015. **25**(6): p. 567-610.
24. Almeida, M.Q. and A.O. Hoff, *Recent advances in the molecular pathogenesis and targeted therapies of medullary thyroid carcinoma*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(3): p. 229-34.
25. Kim, B.H. and I.J. Kim, *Recent Updates on the Management of Medullary Thyroid Carcinoma*. Endocrinol Metab (Seoul), 2016. **31**(3): p. 392-399.
26. Sherman, S.I., et al., *Correlative analyses of RET and RAS mutations in a phase 3 trial of cabozantinib in patients with progressive, metastatic medullary thyroid cancer*. Cancer, 2016. **122**(24): p. 3856-3864.

27. Haber, D.A., et al., *Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005. **70**: p. 419-26.
28. Lin, H., et al., *2ME2 inhibits the activated hypoxia-inducible pathways by cabozantinib and enhances its efficacy against medullary thyroid carcinoma*. Tumour Biol, 2016. **37**(1): p. 381-91.
29. He, G., et al., *Curcumin analog EF24 induces apoptosis via ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2016. **78**(6): p. 1151-1161.
30. Wu, J., et al., *Design, synthesis, and evaluation of asymmetric EF24 analogues as potential anti-cancer agents for lung cancer*. Eur J Med Chem, 2017. **125**: p. 1321-1331.
31. Yin, D.L., et al., *EF24 inhibits tumor growth and metastasis via suppressing NF-kappaB dependent pathways in human cholangiocarcinoma*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32167.
32. Zhao, R., et al., *EF24 Suppresses Invasion and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro via Inhibiting the Phosphorylation of Src*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8569684.
33. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(12): p. 931-47.
34. Samadi, A.K., et al., *Novel withanolides target medullary thyroid cancer through inhibition of both RET phosphorylation and the mammalian target of rapamycin pathway*. Surgery, 2012. **152**(6): p. 1238-47.
35. Bertazza, L., et al., *Synergistic antitumour activity of RAF265 and ZSTK474 on human TT medullary thyroid cancer cells*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(9): p. 2244-52.
36. Faggiano, A., et al., *Everolimus is an active agent in medullary thyroid cancer: a clinical and in vitro study*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(7): p. 1563-72.