



Università degli Studi di Roma “Sapienza”

**“LE CHINASI AURORA COME TARGET TERAPEUTICO NEI
CARCINOMI TIROIDEI”**

Relatore

Prof. Massimino D’Armiento

Dip. di Medicina Sperimentale

Coordinatore

Prof. Andrea Lenzi

Dip. di Medicina Sperimentale

Dottoranda

Dott.ssa Agnese Di Fiore

Dottorato di Ricerca in

Scienze Endocrinologiche, Metaboliche e Andrologiche, XXVI Ciclo

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

CAPITOLO 1: IL SISTEMA DELLE AURORA CHINASI

- 1.1** Il ciclo cellulare
- 1.2** Regolazione della mitosi
- 1.3** La mitosi
- 1.4** Le chinasi Aurora
- 1.5** Aurora-A
- 1.6** Aurora-B
- 1.7** Aurora-C
- 1.8** Ruolo delle Aurora chinasi nella cancerogenesi
- 1.9** Le chinasi Aurora nei tumori tiroidei

CAPITOLO 2: I CARCINOMI TIROIDEI

- 2.1** Epidemiologia
- 2.2** Fattori di rischio
- 2.3** Anatomia patologica
- 2.4** Cenni su diagnosi e stadiazione
- 2.5** Cenni sulla terapia chirurgica e radiometabolica

CAPITOLO 3: IL CARCINOMA TIROIDEO ANAPLASTICO

CAPITOLO 4: TERAPIE A BERSAGLIO MOLECOLARE

CAPITOLO 5: SCOPO DELLA TESI

CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI

CAPITOLO 7: RISULTATI

CAPITOLO 8: DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1

IL SISTEMA DELLE AURORA CHINASI

Le Aurora Chinasi appartengono ad una famiglia di serin-treonin proteinchinasi che svolge un ruolo essenziale nella maturazione dei centrosomi, nell'assemblaggio del fuso mitotico e nella divisione cellulare.

Si tratta di importanti proteine mitotiche la cui disregolazione è responsabile dell'instabilità genomica, un aspetto fondamentale nella genesi dei tumori. In particolare una loro alterazione può portare a difetti della duplicazione e della separazione dei centrosomi e dell'orientamento dei cromosomi (1).

Dato il ruolo fondamentale delle Aurora Chinasi nella regolazione della divisione delle cellule, si descrivono di seguito le fasi principali del ciclo cellulare.

1.1 Il ciclo cellulare

La divisione cellulare per mitosi ha luogo mediante una successione continua di stadi che vengono chiamati ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare mitotico si alterna tra l'interfase e la mitosi. Ciascuno di questi due stadi principali è ulteriormente suddivisibile in sottostadi che possono essere definiti sulla base di importanti modificazioni biochimiche e strutturali che hanno luogo nella cellula.

L'interfase inizia quando una cellula proveniente da una precedente divisione cellulare, entra in un periodo di accrescimento in cui sintetizza proteine ed altre molecole cellulari, ma durante il quale non duplica il proprio DNA. Questo intervallo è stato denominato *stadio G1*. Ad un certo punto, se la cellula è destinata a dividersi, ha inizio la duplicazione

del DNA. Questo pone fine alla fase G1 e dà inizio al *periodo S* dell'interfase. Durante tale fase, l'intero contenuto in DNA del nucleo viene fedelmente duplicato. Al termine della replicazione, finisce la fase S e la cellula entra nello stadio finale dell'interfase G2. La maggior parte delle cellule resta in fase G2 solo per un breve periodo di tempo: al termine della fase G2, che segna il termine dell'interfase, ha inizio la *mitosi*. Al termine della divisione mitotica, le due cellule figlie entrano nello stadio G1 dell'interfase successiva.

Durante la mitosi le molecole di DNA nucleare completamente duplicate, complessate con le proteine istoniche e non-istoniche, si condensano e formano strutture bastoncellari ispessite, i cromosomi. Ciascun cromosoma è in realtà duplice, in conseguenza della replicazione del DNA e della duplicazione delle proteine cromosomiche durante l'interfase precedente; man mano che la mitosi procede, i cromosomi subiscono un processo di condensazione progressiva e risulta sempre più evidente la loro struttura raddoppiata longitudinalmente.

Le due parti duplicate di ciascun cromosoma, chiamate *cromatidi*, sono di norma l'uno la copia esatta dell'altro e contengono esattamente la stessa informazione genetica.

La mitosi porta alla separazione dei due cromatidi di ciascun cromosoma e alla loro distribuzione alle due estremità opposte della cellula in divisione, dove essi verranno racchiusi in due nuclei figli distinti (2).

1.2 Regolazione della mitosi

L'ingresso in fase M è garantito dall'azione del *fattore di promozione della maturazione (MPF)*, una proteina eterodimerica composta da una subunità regolatoria, la *ciclina B*, e da una subunità catalitica, detta *chinasi ciclina-dipendente (Cdk)*, responsabile del

trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP a specifici residui di Serina (Ser) e di Treonina (Thr) di proteine substrato (3) (figura 1).

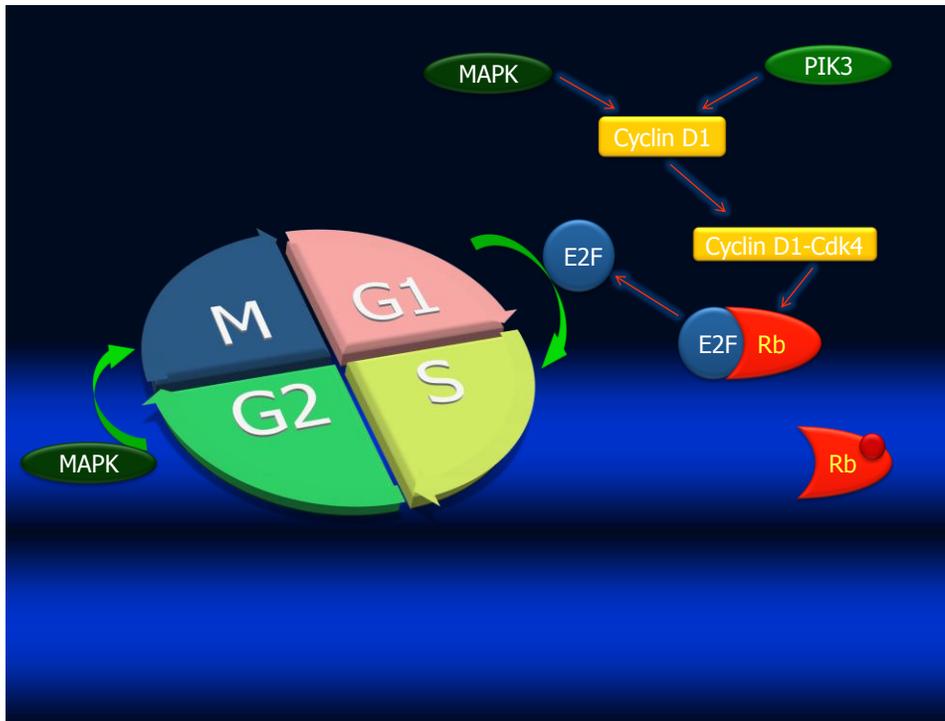


Figura 1: Regolazione del ciclo cellulare

La concentrazione della ciclina B aumenta o diminuisce col procedere del ciclo cellulare: quando è bassa, durante l'interfase, l'MPF resta inattivo, mentre se raggiunge un livello sufficiente esso entra in azione, col conseguente ingresso della cellula nella fase mitotica.

In generale, tutti i passaggi di fase del ciclo cellulare sono guidati da complessi ciclina-Cdk. Nei mammiferi, durante la fase G1, i complessi Cdk 4 e Cdk 6 con le cicline di tipo D (D1, D2 e D3) agiscono su vari bersagli, che, a loro volta, inducono la trascrizione di diversi geni compresi quelli codificanti per le cicline E ed A, la Cdk1 e per proteine coinvolte nella replicazione (4).

Ogni transizione di fase è sottoposta a sistemi di controllo (*checkpoints*), in grado di rilevare alterazioni a carico del DNA o dei processi utili alla corretta segregazione cromosomica e ad arrestare temporaneamente il ciclo cellulare, permettendo l'intervento di meccanismi di riparazione. Qualora, pur rallentando la progressione del ciclo cellulare, il danno non sia riparabile la cellula attiva il programma di apoptosi.

La presenza dei punti di controllo è fondamentale, perché nel corso delle generazioni l'alterazione progressiva del patrimonio genetico aumenterebbe le probabilità di innesco del processo di trasformazione neoplastica (4).

1.3 Mitosi

La fase mitotica vera e propria è un evento continuo, che si può schematizzare in cinque fasi: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase.

Con l'ingresso in *profase*, i cromosomi duplicati si preparano a segregare attraverso un processo di *compattazione* o *condensazione cromosomica*, e contemporaneamente si assembla il macchinario mitotico. Un ruolo chiave in questo processo è giocato dall'*istone H3* in forma fosforilata e da un complesso proteico noto come *condensina*.

I cromosomi mitotici mostrano una costrizione primaria, detta *centromero*, a livello della quale i cromatidi sono a stretto contatto. In profase, sul lato esterno della superficie centromerica si legano proteine specifiche a formare una struttura appiattita detta *cinetocore*, che serve come punto di attacco dei microtubuli e di numerose proteine motrici e contiene componenti di un importante checkpoint mitotico, il SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*).

Durante la condensazione cromosomica i microtubuli subiscono un disassemblaggio generale in vista della formazione di una nuova e complessa struttura: il *fuso mitotico*.

La formazione del fuso è strettamente associata al *ciclo del centrosoma*, un processo mediante il quale i centrosomi duplicano durante la transizione G1/S, migrano intorno al nucleo da parti opposte e al tempo stesso maturano, richiamando a sé diverse proteine e incrementando la loro attività di nucleazione dei microtubuli. Infine, i centrosomi divengono i poli del fuso mitotico, ognuno dei quali verrà ripartito in una cellula figlia.

La profase termina con la rottura dell'involucro nucleare.

In *prometafase* si completa la formazione del fuso mitotico e i cromosomi vengono spostati verso il centro della cellula. Ciò avviene grazie alla “cattura” da parte dei microtubuli di un cromatide a livello del cinetocore; una volta avvenuto il contatto, il cromosoma inizia a muoversi lungo il microtubulo, trascinato da proteine motrici situate nel cinetocore legato, mentre il cinetocore libero sul cromatide fratello si lega ai microtubuli proveniente dal polo opposto. Quindi il cromosoma viene trasportato verso il centro del fuso per mezzo di un processo detto congressione, in cui i microtubuli più lunghi si accorciano mentre quelli più corti si allungano, rispettivamente, per perdita o aggiunta di unità di tubulina.

La successiva *metafase* incomincia quando tutti i cromosomi sono stati allineati sulla piastra metafasica, cioè all'equatore del fuso. Il fuso mitotico è costituito da microtubuli altamente organizzati, suddivisi dal punto di vista funzionale in tre gruppi:

- *microtubuli dell'aster*, che si irradiano dal centrosoma verso la zona esterna del fuso e la cui funzione è quella di aiutare a disporre nella giusta posizione l'apparato del fuso e determinare il piano della citocinesi;
- *microtubuli cromosomici o del cinetocore*, che si estendono dal centrosoma ai cinetocori ed esercitano su questi una forza trainante;
- *microtubuli polari (o interpolari)*, che si estendono dal centrosoma oltre i cromosomi e la cui funzione è mantenere l'integrità del fuso.

L'anafase inizia quando i cromatidi fratelli si allontanano l'uno dall'altro muovendosi verso i poli opposti. Tutti i cromosomi della piastra metafasica vengono separati nello stesso momento dall'azione del complesso promotore dell'anafase/ciclosoma (APC/C), una *E3-ubiquitina ligasi* che induce la degradazione di svariate proteine regolatrici. La separazione dei cromatidi (ora cromosomi singoli) comporta due movimenti contemporanei: il trascinarsi dei cromosomi, realizzato tramite l'accorciamento progressivo dei microtubuli cromosomici, e l'allontanamento dei due poli del fuso ad opera dei microtubuli interpolari, che si allungano e scivolano gli uni sugli altri, coadiuvati dai microtubuli astrali che interagiscono con proteine motrici attaccate alla membrana plasmatica ancorando ad essa i centrosomi.

Nella *telofase* i cromosomi raggiungono i rispettivi poli, si raggruppano in massa e iniziano a de-condensare, mentre il fuso mitotico si disassembla e si riforma l'involucro nucleare. Il disassemblaggio del fuso mitotico determina la formazione di una struttura transitoria caratteristica di questa fase, il *corpo mediano*. Quest'ultimo contiene i microtubuli derivati

dal fuso mitotico, che si compattano durante le fasi finali della mitosi, e diverse proteine coinvolte nella citocinesi e nella segregazione cromosomica.

Al termine della mitosi avviene la *citocinesi* mediante il cosiddetto “meccanismo dell’anello contrattile”. Tale anello, costituito da filamenti di actina e miosina, si dispone nel *cortex*, appena al di sotto della membrana plasmatica, nella regione del *solco* di una cellula in divisione. I filamenti di actina e miosina, contraendosi, producono una strozzatura via via maggiore che assottiglia progressivamente il corpo mediano. In questa fase le cellule figlie restano unite per un certo tempo attraverso un sottile *ponte citoplasmatico*, che in ultimo si rompe separandole fisicamente (5).

1.4 Le chinasi Aurora

Le chinasi Aurora sono una famiglia di serin-treonin-chinasi implicate in numerosi processi durante la divisione cellulare, quali il corretto assemblaggio e la stabilità del fuso mitotico, la condensazione cromosomica, le interazioni cinetocori-microtubuli e l'orientamento dei cromosomi sul piano metafasico (figura 2).

Nei mammiferi esistono tre chinasi Aurora (6, 7):

- *Aurora-A*, codificata dal gene AURKA, in posizione 20q13.2;
- *Aurora-B*, codificata dal gene AURKB, in posizione 17q13.1;
- *Aurora-C*, codificata dal gene AURKC, in posizione 19q13.43.

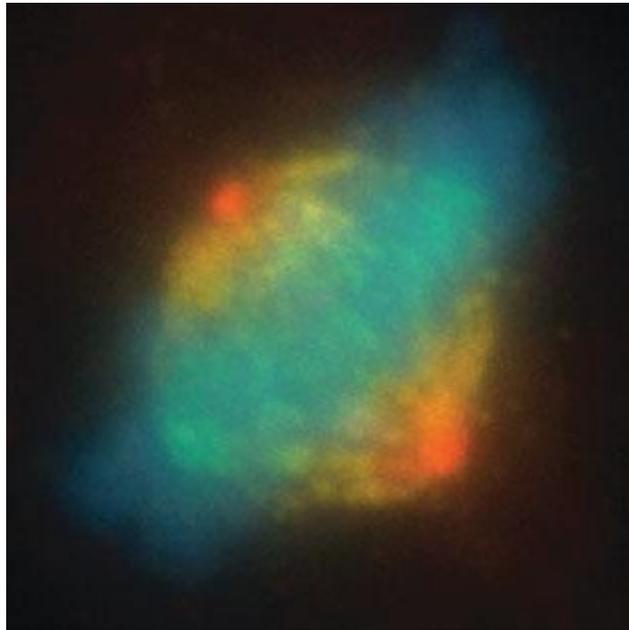


Figura 2 – Localizzazione delle chinasi Aurora all'immunofluorescenza

(immagine tratta da rif. 7)

L'immunofluorescenza, mostrata in figura 2, rivela la localizzazione di Aurora-A e Aurora-B. Non è mostrata Aurora-C, ma è noto che la sua localizzazione è sovrapponibile a quella di Aurora-B. Il nome Aurora è tratto dal fenomeno dell'aurora boreale nelle regioni polari, perché la prima proteina identificata fu l'Aurora-A sui poli del fuso mitotico (7).

Le 3 chinasi formano una famiglia di chinasi filogeneticamente correlate alle *proteine chinasi AGC (Protein Chinasi A/Protein Chinasi G/Protein Chinasi C)*.

Mentre Aurora-A e Aurora-B risultano essere altamente conservate durante l'evoluzione, Aurora-C compare solo nei mammiferi (8).

Dal punto di vista strutturale (figura 3) le tre Chinasi Aurora presentano un'organizzazione simile dei domini (6):

- Il dominio N-terminale, di lunghezza pari a 39-129 aminoacidi, è coinvolto sia nella localizzazione cellulare sia nel legame con il substrato. Il basso grado di conservazione di questo dominio tra le proteine della famiglia è responsabile delle differenze riscontrate nella localizzazione e nelle interazioni proteina-proteina. Viene considerato un dominio regolatorio poiché contiene un motivo KEN (KENXXXN) e un motivo detto A-box (RxLxPS). Il primo agisce come sito di riconoscimento per il su citato complesso APC/C, il secondo partecipa invece alla regolazione della degradazione delle chinasi Aurora, attivando il D-box (destruction box). Questi due motivi sono presenti solo in Aurora-A e in -B.
- Il dominio chinasicco mostra più del 70% di omologia fra le 3 chinasi e contiene un sito di legame per l'ATP ed un residuo di Treonina all'interno del loop di attivazione della proteina, che deve essere fosforilato perché la chinasi si attivi.

- Il dominio C-terminale, di 15-20 aminoacidi, comprende il motivo D-box (RxxLxxG) la cui sequenza è riconosciuta dal complesso APC/C, che induce la degradazione della proteina attraverso il proteosoma.

I geni codificanti le chinasi Aurora vengono trascritti in modo dipendente dal ciclo cellulare poiché i loro promotori contengono specifiche sequenze (CDE/CHR- Cell Cycle-Dependent Element/Cell Cycle Genes homology Region) a cui si legano proteine espresse in fase G2 (8).

Le proteine Aurora giocano un ruolo cruciale in molteplici passaggi della divisione cellulare, in quanto partecipano al ciclo del centrosoma, al corretto assemblaggio e alla stabilità del fuso mitotico, alla condensazione cromosomica, alle interazioni cinetocore-microtubuli, all'orientamento dei cromosomi sul piano metafasico, alla segregazione dei cromatidi e alla citocinesi.

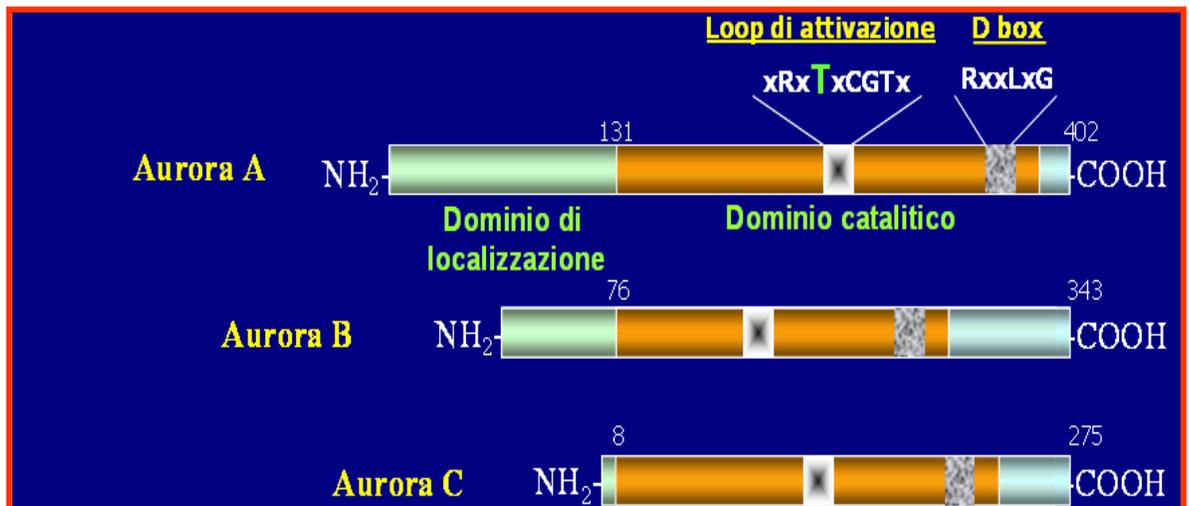


Figura 3 – Struttura dei geni codificanti le 3 Aurora Chinasi

1.5 Aurora-A

Dalla fine della fase S sino alla telofase Aurora-A è localizzata sul centrosoma, dove svolge funzioni diverse in relazione alla fase mitotica in atto (figura 4).

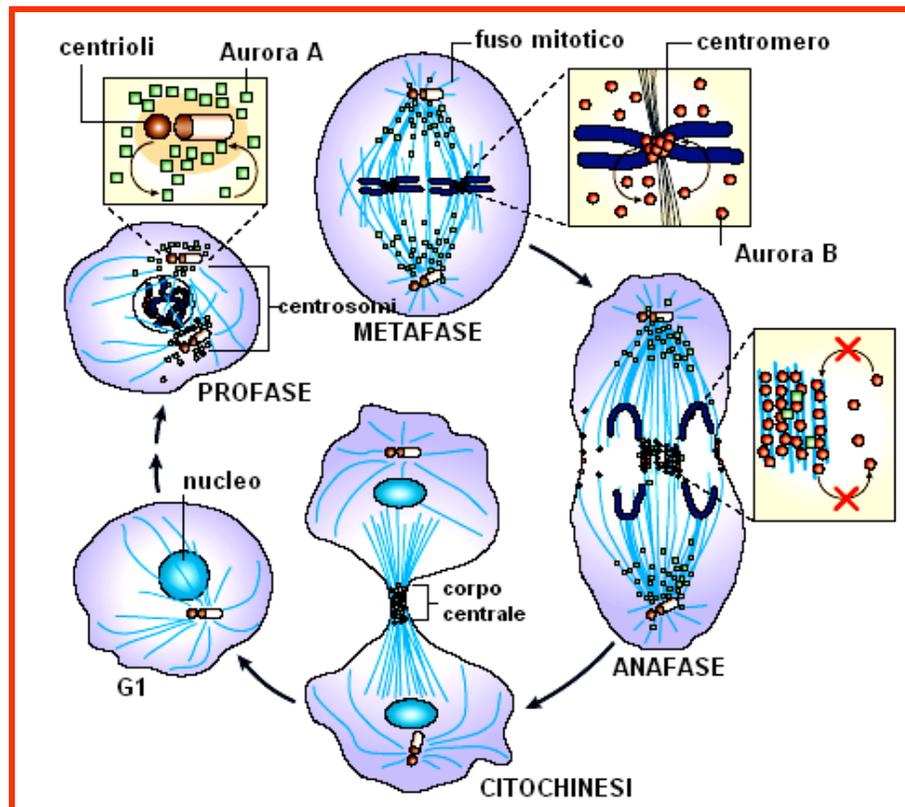


Figura 4 – Localizzazione di Aurora-A nel ciclo cellulare

Durante la fase S Aurora-A regola la duplicazione dei centrioli e nella successiva profase prende parte alla maturazione e alla separazione dei centrosomi. Inoltre è coinvolta nell'assemblaggio e nella stabilizzazione del fuso bipolare; durante la telofase e al citocinesi è stata descritta nel corpo mediano. Il picco di espressione dell'mRNA di Aurora-A si ha tipicamente durante la transizione G2/M, mentre la proteina è espressa

principalmente in fase M. La sua attivazione funzionale avviene per auto-fosforilazione sulla Thr 288, presente nel loop di attivazione e necessaria all'attività catalitica.

Alcuni studi hanno inoltre indicato il coinvolgimento della chinasi A (PKA) e di vari co-attivatori di Aurora-A che coincidono di frequente con i suoi bersagli molecolari.

E' possibile che siano richieste proteine co-attivatrici diverse in relazione al momento del ciclo cellulare e alla localizzazione della chinasi. Tra queste, i co-attivatori che rappresentano anche un bersaglio di Aurora-A sono Bora, TPX2 (microtubulo-associated, homolog, *Xenopus laevis*), Atrina, Ajuba, HEF1 (Enhancer of Filamentation 1, anche noto come NEDD9), gADD45 α (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 α) e TACC3 (Transforming Acidic Coiled-Coil containing protein 3) (8,9,10).

Il cofattore meglio caratterizzato è TPX2, una proteina associata ai microtubuli necessaria per l'assemblaggio del fuso bipolare. Essa lega Aurora-A, la direziona sul fuso e ne induce un cambiamento conformazionale tale che il dominio di attivazione assume una forma più compatta e difficilmente raggiungibile dalla proteina fosfatasi-1 (PP1), la quale de-fosforilerebbe Aurora-A sulla Thr288, rendendola inattiva (9,10).

L'attivazione di Aurora-A in tarda G2 determina il reclutamento del complesso Cdk1-ciclina B1 sul centrosoma, necessario affinché la cellula possa entrare in mitosi.

Questo prevede la fosforilazione da parte di Aurora-A della fosfatasi CDC25B, attivatore di Cdk.

Il complesso Cdk1-ciclina B1, a sua volta, favorisce la piena attivazione di Aurora-A.

Il meccanismo appena descritto può avvenire anche per via indiretta, attraverso l'attivazione della Polo-Like Kinase 1 (Plk1) da parte di Aurora-A, la quale poi fosforila CDC25B (8,10).

L'attività chinasi di Aurora-A correlata con la maturazione del centrosoma e con l'assemblaggio del fuso mitotico si concentra su proteine quali TACC, Eg5, LATS, NDEL1 e centrosomina. L'interazione con le proteine TACC ne facilita il reclutamento sul centrosoma nelle prime fasi della mitosi, dove regolano le dinamiche dei microtubuli; in prometafase, la fosforilazione della proteina motrice Eg5 induce la separazione delle coppie di centrioli, mentre la fosforilazione di LATS, NDEL1 e centrosomina le rende operative nella maturazione centrosomica e nel promuovere la nucleazione dei microtubuli (10,11,12).

Oltre alle funzioni appena descritte, Aurora-A è stata identificata come uno dei modulatori funzionali della proteina p53. Quando è iperespressa, Aurora-A fosforila p53 sulla Ser315 inducendone una maggiore degradazione attraverso l'azione di MDM2 (ubiquitina E3-ligasi), oppure sulla Ser215 inibendone l'attività trascrizionale (processi che facilitano la trasformazione tumorale) (8,11).

1.6 Aurora-B

L'Aurora-B fa parte di un gruppo di proteine eterogenee dette "passeggeri cromosomici"; si associa ad altre proteine, Survivina e Borealina, per formare un complesso più grande comprendente INCENP (INner CENTromere Protein) (13).

L'attivazione dell'Aurora-B è dovuta all'autofosforilazione in seguito all'associazione con il suo substrato INCENP. Inoltre, INCENP è necessaria per la localizzazione di Aurora-B sui cinetocori. Sebbene la Survivina non sia un substrato di Aurora-B, essa si associa alla

chinasi e ne stimola l'attività. La Borealina, invece, è un substrato della chinasi ma non un suo attivatore (figura 5) (13).

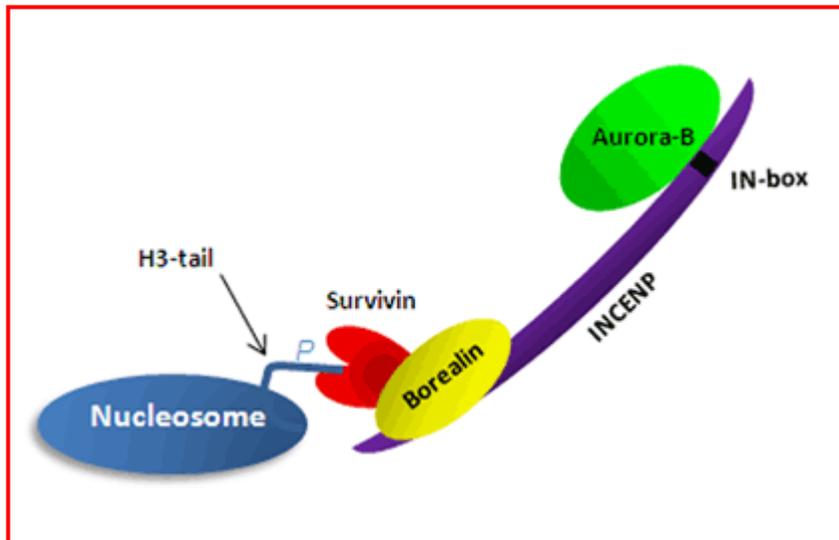


Figura 5 – Struttura dell'INCENP (immagine tratta da *Cell Biology International*, 2011; 35, 575–578)

Questo complesso di proteine è responsabile di una modificazione peculiare, ovvero la fosforilazione dell'istone H3 sulla Ser10 (14).

L'Aurora-B è responsabile anche della fosforilazione, sempre sull'istone H3, della Ser28 dalla profase alla metafase. Inoltre, probabili substrati dell'Aurora-B sono anche alcune componenti cromosomiali non istoniche, come la topoisomerasi II α (13).

Tuttavia il ruolo di tali eventi nella condensazione è ancora controverso, in quanto la mancanza di Aurora-B non sembra influenzare il grado di compattamento della cromatina.

La localizzazione del complesso della chinasi Aurora-B sui centromeri richiede

l'interazione con altri passeggeri cromosomici, quali la TD-60 e la fosforilazione di almeno una proteina del cinetocore, la CENP-A (kinetochore-specific H3 histone variant CENtromer Protein) sulla Ser7 (15,16).

La funzione centromerica del complesso dell'Aurora-B consiste nella correzione degli appaiamenti errati che si formano durante l'attacco dei microtubuli.

Dopo la rottura della membrana nucleare in prometafase, i cromosomi stabiliscono rapidamente i contatti con i microtubuli del fuso creando inizialmente un attacco monotelico, ovvero il legame di uno dei due cinetocori ad un singolo microtubulo. Successivamente, il cinetocore libero cattura un microtubulo del polo opposto creando un attacco bipolare, detto anfitelico, che porta al posizionamento del cromosoma tra i poli del fuso, sulla piastra metafasica. Tuttavia è possibile che si formino connessioni anomale, se entrambi i cromatidi fratelli si legano a microtubuli derivanti dallo stesso polo (attacco sintelico) oppure se un cinetocore si connette a fibre derivanti da poli opposti (attacco merotelico).

L'Aurora-B è ritenuta responsabile della rottura degli appaiamenti sintelici; il meccanismo di regolazione non è ben chiaro, ma si presume che la sua attività sia influenzata dallo stato di tensione tra i centromeri omologhi (16). E' stato ipotizzato che quando un cromosoma assume un corretto orientamento anfitelico, la trazione esercitata dai microtubuli sui centromeri determini la separazione fisica dell'Aurora-B dai suoi substrati o la disgregazione del complesso dei passeggeri cromosomici.

Nel caso di appaiamento merotelico, è stato invece proposto un meccanismo che prevede l'intervento delle proteine ICIS (Inner Centromere kinesin I Stimulator) e MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin): ICIS è un fattore centromerico coinvolto nella rimozione

dei microtubuli che si attaccano lateralmente e MCAK una chinesina che promuove il disassemblaggio dei microtubuli, la cui attività viene stimolata da ICIS.

MCAK è un substrato dell'Aurora-B e la sua fosforilazione determina l'inibizione dell'attività depolimerizzante, mentre ICIS è stata isolata sotto forma di complessi con INCENP e Aurora-B. Pertanto, la regolazione di entrambe le proteine da parte di Aurora-B potrebbe rappresentare un fattore importante nel processo di rottura degli appaiamenti merotelici (16).

Il complesso dell'Aurora-B è recentemente emerso come importante fattore per il superamento del check-point di assemblaggio del fuso, un circuito biochimico che permette la progressione mitotica solo dopo che tutti i cromosomi abbiano assunto un adatto orientamento bipolare sul fuso mitotico. Il check-point è attivato dai cinetocori che mancano di legami ai microtubuli e anche dalla mancanza di tensione nel fuso, sebbene il meccanismo di attivazione non sia ancora chiaro.

Le chinasi Aurora sono richieste per l'attivazione stabile del check-point come risultato della perdita di tensione del fuso. Nel lievito, durante l'anafase, si ha la separazione dei cromatidi fratelli grazie all'azione della separasi, un enzima che sembra avere una seconda funzione, ovvero l'attivazione della protein-fosfatasi Cdc14. Uno dei bersagli di questa fosfatasi è INCENP, la cui defosforilazione è un evento necessario e sufficiente affinché abbia luogo la rilocalizzazione del complesso dell'Aurora-B dai cinetocori alla zona mediana del fuso. E' verosimile che una proteina analoga alla Cdc14 sia responsabile della rilocalizzazione del complesso nelle cellule umane.

Aurora-B è essenziale anche per la citocinesi, ed infatti è stato osservato che l'iperespressione di una sua forma cataliticamente inattiva nel ratto previene l'ultima fase

della citocinesi. Un fenomeno simile è prodotto dall'espressione esogena di un mutante dominante di INCENP mancante del dominio di legame con l'Aurora-B, che determina la delocalizzazione di quest'ultima. Tali evidenze possono spiegare il fenomeno dell'aumento della ploidia nelle cellule che esprimono bassi livelli di Aurora-B (17).

Altri bersagli specifici di Aurora-B sono stati individuati nel solco di divisione tramite l'utilizzo di anticorpi specifici. Questi comprendono le subunità costituenti i filamenti intermedi e i microfilamenti, come la vimentina, la desmina, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) e la catena leggera regolatoria della miosina II.

Durante l'anafase e la telofase, l'Aurora-B fosforila la Ser72 della vimentina, proteina importante per la formazione del solco divisorio (18); la mancanza di questa fosforilazione porta le due cellule figlie a restare legate attraverso i lunghi ponti citoplasmatici. Anche la fosforilazione della desmina da parte dell'Aurora-B contribuisce a destabilizzare i filamenti intermedi, evento essenziale negli ultimi stadi della citocinesi per permettere la destrutturazione del citoscheletro e l'introflessione della membrana plasmatica.

Inoltre, l'Aurora-B fosforila la proteina MgcRacGAP (Rac GTPase Activating Protein 1) modificandone la specificità di substrato, da attivatore della Rac GTPasi ad attivatore della chinasi Rho A, la quale regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina che compongono l'anello contrattile.

L'Aurora-B risulta necessaria anche per la localizzazione nell'area centrale della MKLP/ZEN4 (Mitotic Kinesin-Like Protein/Zygotoc epidermal ENclosure defective), una proteina implicata nell'assemblaggio e nella funzionalità delle fibre centrali del fuso (18, 19, 20).

Aurora-C

L'Aurora C è la meno conosciuta della famiglia delle Chinasi Aurora. La sua struttura primaria mostra un'elevata omologia con quella dell'Aurora-B (83%), mentre l'identità di sequenza con l'Aurora-A è minore (71%) (13).

L'Aurora-C è stata individuata unicamente nei mammiferi, in cui viene espressa ad elevati livelli nel testicolo, mentre in altri tipi cellulari, come i fibroblasti, la sua espressione è di gran lunga inferiore rispetto quella di Aurora-B. Risulta, invece, iperespressa in alcuni tumori umani (19).

Il livello delle proteine Aurora-B e -C ha un picco durante il passaggio G2/M, ma i loro profili di espressione rivelano una regolazione differenziata nel tempo. Aurora-C, come Aurora-B, interagisce con la proteina INCENP all'estremità carbossi-terminale contenente il dominio conservato "IN box". Saggi di competizione di legame ed esperimenti di transfezione hanno rivelato che, rispetto ad Aurora-B, Aurora-C ha un'affinità di legame più bassa nei confronti di INCENP. Studi recenti hanno indicato la capacità dell'Aurora-C di associarsi con l'Aurora-B, la INCENP e la survivina a formare dei complessi in grado di fosforilare l'istone H3, contribuendo quindi alla regolazione della segregazione cromosomica e alla citocinesi. In esperimenti di RNA con silenziamento di entrambe le Aurora-B e -C è stato osservato un effetto additivo nel generare il fenotipo multinucleato. E' stato inoltre dimostrato che l'Aurora-C funzionante è in grado di revertire tale fenotipo multinucleato: tale capacità indica che la sua funzione si sovrappone e completa quella di Aurora-B durante la mitosi (20,21, 22).

1.8 Ruolo delle Aurora Chinasi nella cancerogenesi

La tumorigenesi è innescata da eventi mutazionali che insorgono nelle cellule normali, tali da determinare l'assunzione di un fenotipo trasformato. In particolare, la trasformazione maligna si compie tramite l'acquisizione di alcune capacità fondamentali, quali un potenziale replicativo illimitato, l'indipendenza dai segnali proliferativi o anti-proliferativi, l'insensibilità agli stimoli apoptotici, l'induzione della neoangiogenesi e l'invasività (22).

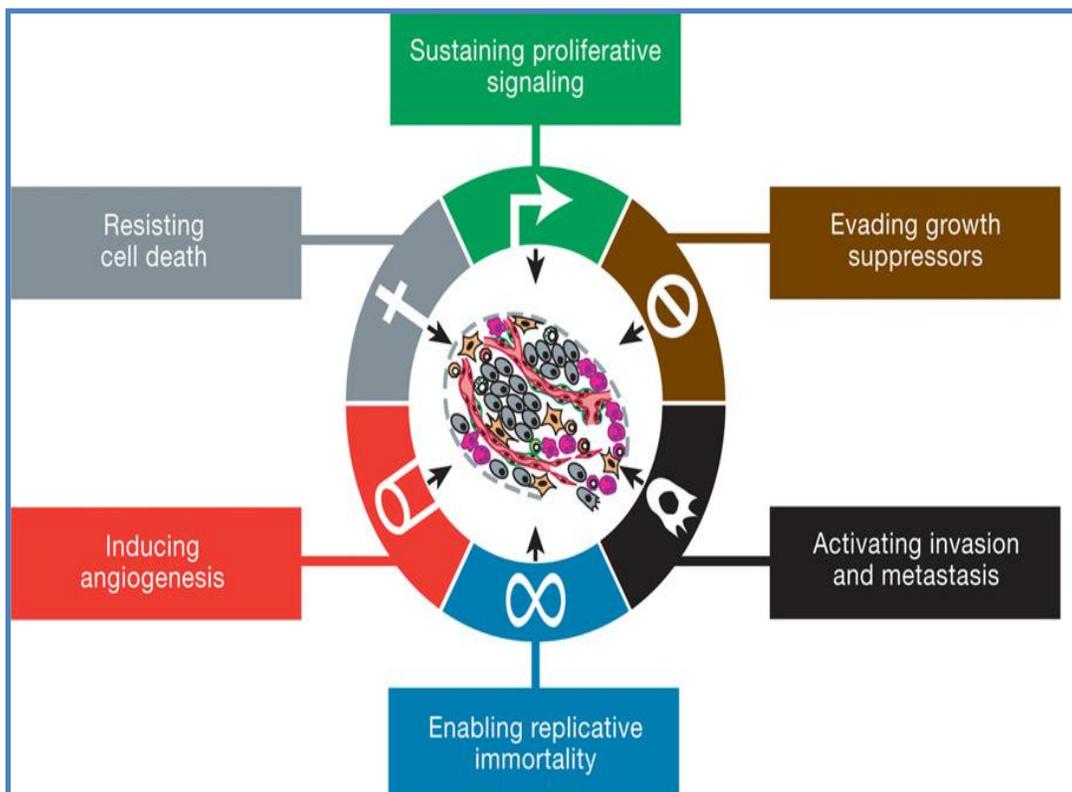


Figura 6 – Schema delle capacità acquisite dalle cellule trasformate (da rif. 22)

Tali cambiamenti derivano da eventi mutazionali a carico di geni importanti per il controllo di processi biochimici implicati nella divisione e nella sopravvivenza cellulare. In generale, il fenotipo canceroso si manifesta solo quando un numero sufficiente di proto-oncogeni è mutato in oncogeni ed è stato disattivato un numero minimo di geni oncosoppressori. L'accumulo di mutazioni non è un fenomeno casuale in quanto è grandemente accelerato dall'instaurarsi di un'instabilità cromosomica (CIN), ovvero un'aumentata propensione della cellula a subire alterazioni genomiche. L'instabilità cromosomica è riscontrabile un più del 70% dei tumori solidi ed è spesso associata ad un assetto aneuploide del genoma, che a sua volta correla con l'aggressività e lo stadio del tumore (23).

Le cause di CIN sono ancora poco conosciute, ma verosimilmente includono la de regolazione di geni implicati nel SAC, nel checkpoint della replicazione del DNA, nella progressione del ciclo cellulare, nell'attività dei telomeri e nel controllo numerico e funzionale dei centrosomi.

Le chinasi Aurora si ritrovano spesso iperespresse in diversi tipi di cancro ed in particolare l'Aurora-A è stata direttamente associata all'instabilità genomica (24, 25).

Aurora-A

L'eccesso di Aurora-A nei tessuti tumorali può essere dovuto a iperespressione e/o amplificazione genica o anche alla diminuita degradazione della proteina (11).

La chinasi Aurora-A fu inizialmente chiamata BTAK (Breast Tumor Activated Kinase) perché identificata come una proteina iperespressa nel carcinoma mammario, laddove il suo aumento di espressione costituiva un indicatore di prognosi sfavorevole (26). In seguito,

numerosi studi hanno riportato l'iperespressione di Aurora-A in diversi tipi di tumori umani, associata a difetti nella mitosi e aneuploidia. AURKA, il gene codificante per l'Aurora-A, è localizzato sulla regione cromosomica 20q13.2-13.3 che risulta amplificata in diversi tipi di neoplasie, come il cancro della mammella (94%), del colon (50%), dello stomaco, della vescica e dell'ovaio.

Recentemente è stato evidenziato che l'attività della proteina BRCA1 (BRCA1, Breast Cancer 1), soppressore tumorale specifico del carcinoma mammario ed ovarico, è regolata da Aurora-A tramite fosforilazione. BRCA1 è una ubiquitino-ligasi presente nei centrosomi, implicata nel controllo numerico degli stessi e nella regolazione della nucleazione dei microtubuli. L'inibizione della funzione centrosomica richiede l'attività ubiquitino-ligasica di BRCA1, in quanto mutazioni geniche che compromettono tale funzione danno origine a un fenotipo dominante negativo di amplificazione e iperattività dei centrosomi. BRCA1 localizza sui centrosomi in tutte le fasi del ciclo cellulare, durante cui la sua attività è regolata mediante fosforilazione/defosforilazione; è stato dimostrato che l'Aurora-A modula l'inibizione della funzione centrosomica da parte di BRCA1 fosforilando la proteina sulla Ser308 e riducendone l'attività ligasica, mentre invece la sua defosforilazione ad opera di PP1a (Protein Phosphatase 1) produce l'effetto contrario. Pertanto, *un eccesso di Aurora-A potrebbe portare alla replicazione incontrollata dei centrosomi e ad anomalie della nucleazione dei microtubuli in conseguenza dell'inibizione di BRCA1, compromettendo l'integrità del fuso mitotico (26).*

Sebbene studi in vivo condotti sui topi ne abbiano evidenziato un'attività tumorigenica abbastanza limitata, il contributo alla trasformazione maligna da parte di Aurora-A risulta

potenziato da altri eventi mutazionali a carico di oncogeni, ad esempio il *RAS* (8, 10, 22). E' inoltre possibile che la tumorigenesi venga promossa non solo mediante la fosforilazione eccessiva dei substrati di Aurora-A, ma anche a causa della fosforilazione aberrante di altre proteine; questo perché *in diverse cellule tumorali è stata osservata sia l'espressione costitutiva di Aurora-A nelle varie fasi del ciclo cellulare sia la sua delocalizzazione diffusa nel citoplasma (11).*

Inoltre, l'iperespressione di Aurora-A aumenta la degradazione dell'oncosoppressore p53, definito il "guardiano del genoma", causando alterazioni a livello dei meccanismi di risposta al danno del DNA (DNA damage checkpoint) dipendenti da p53 e la mancata attivazione dei segnali pro-apoptotici.

Nelle cellule normali di mammifero l'innescamento del DNA damage checkpoint inibisce l'attività di Aurora-A e induce l'arresto del ciclo in G2, mentre quando Aurora-A è iperespressa tale checkpoint è neutralizzato. Il DNA damage checkpoint non è però l'unico ad essere silenziato dall'eccesso di Aurora-A: le cellule di mammifero non trasformate, infatti, possiedono il "*checkpoint G1 post-mitotico*" dipendente da *p53* e da *Rb*, il quale induce l'arresto in G1 se la cellula è divenuta tetraploide a causa di una mitosi incompiuta. Se Aurora-A è iperespressa la cellula tetraploide non si arresta in G1, proseguendo il ciclo cellulare con un assetto genetico aberrante (11).

L'iperespressione di Aurora-A contribuisce all'instabilità genetica anche distruggendo l'assemblaggio del complesso del checkpoint mitotico (SAC) tramite l'inibizione del legame tra Cdc20 e BubR1 (6, 8).

Inoltre, sia in vitro sia in vivo, è stato dimostrato che l'eccesso di Aurora-A indipendentemente dalla sua attività chinasi causa amplificazione del centrosoma in

cellule normali e tumorali, che conduce allo sviluppo di fusi mitotici multipolari e conseguentemente ad una segregazione cromosomica sbilanciata (8).

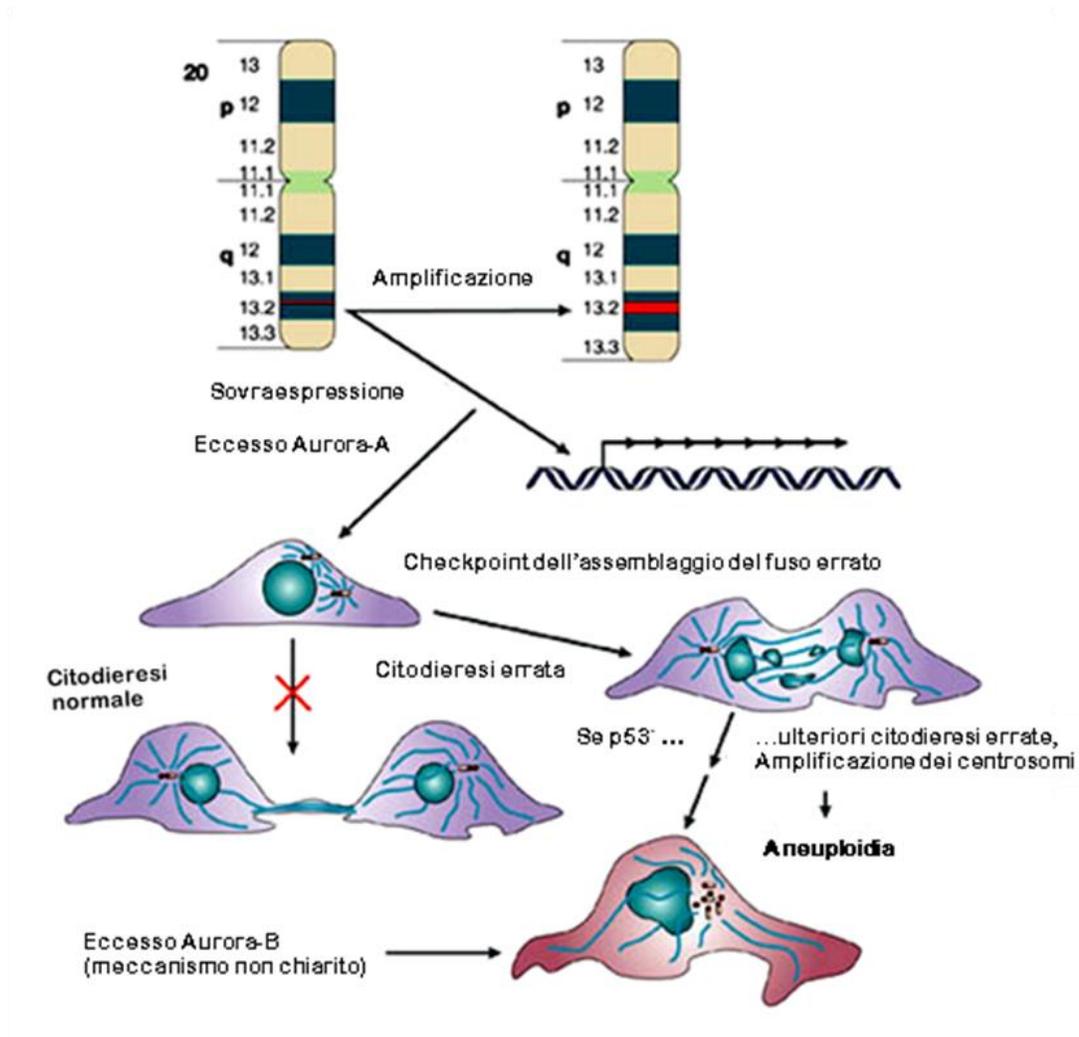


Figura 7 - Effetti dell'iperespressione di Aurora-A sul corretto svolgimento del ciclo cellulare

Aurora-B

Contrariamente ad Aurora-B, il ruolo tumorigenico di Aurora-B è meno evidente. In molti tipi di cancro sia il mRNA che la proteina risultano aumentati rispetto al tessuto normale ed i livelli di espressione spesso correlano con il grado di malignità e la prognosi tumorale.

Tuttavia, il gene AURKB mappa in una regione (17q13.1) non frequentemente amplificata nei tumori umani. L'aumento osservato della proteina sarebbe quindi dovuto ad una deregolazione della sua produzione e/o degradazione o potrebbe semplicemente riflettere l'elevato indice proliferativo delle cellule cancerose. Alcuni studi hanno mostrato che l'espressione esogena di Aurora-B in cellule normali può favorire la trasformazione maligna, in special modo nelle cellule esprimenti l'oncogene Ras-V12 (24). E' stato inoltre osservato che l'espressione di Aurora-B in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) ne promuove l'aneuploidia e l'invasività in esperimenti di xenotrapianto (23).

In generale, la sovraespressione di questa serin-treonin-chinasi è stata collegata a condizioni di alta instabilità genomica, tipica della progressione tumorale: tale evidenza suggerisce l'ipotesi che l'Aurora-B contribuisca all'acquisizione, da parte della cellula, di gravi alterazioni critiche nella progressione tumorale.

Aurora-C

Il gene codificante per Aurora-C mappa in una regione cromosomica (19q13.43) che spesso risulta traslocata o assente nei tessuti cancerosi, mentre invece alcune linee cellulari maligne presentano un'iperespressione di tale proteina.

L'aumento di Aurora-C indotto in cellule NIH3T3 (fibroblasti embrionali murini) produce anomalie nella divisione cellulare quali l'amplificazione centrosomica e la multinucleazione

e conferisce a tali cellule una capacità di crescere in modo ancoraggio-indipendente, nonchè di generare tumori se iniettate in topi nudi (25).

Un recente studio condotto di 409 casi di cancro cervicale e 163 casi di cancro del colon retto, ha rivelato una correlazione tra l'espressione di Aurora-C e lo stadio di sviluppo dei tumori esaminati, suggerendo che Aurora-C potrebbe rappresentare un nuovo target diagnostico e terapeutico in queste tipologie di cancro (26) (tabella 1).

<i>T</i>	Ruolo delle Aurora Chinasi nei Tumori
<i>a</i>	a) La Chinasi Aurora-A è frequentemente iperespressa in diversi tipi di tumori
<i>b</i>	maligni come quelli della mammella (BTAK), del colon-retto, della vescica e dello
<i>e</i>	stomaco
<i>l</i>	b) La Chinasi Aurora-B è iperespressa nel cancro del colon-retto e dell'ovaio .
<i>l</i>	c) La Chinasi Aurora-C è iperespressa principalmente nel tumore del testicolo e del
<i>a</i>	colon-retto

Tabella 1 – Ruolo delle 3 chinasi Aurora nei tumori

1.10 Le chinasi Aurora nei tumori tiroidei

Diversi studi hanno dimostrato l'iperespressione delle Aurora chinasi anche nei carcinomi tiroidei.

Un lavoro (27) eseguito su colture primarie di tireociti umani normali e linee cellulari di carcinomi tiroidei papilliferi, follicolari, scarsamente differenziati e anaplastici ha riferito un aumento dell'espressione di Aurora-B nelle cellule tumorali, e maggiormente nelle linee anaplastiche, rispetto ai tireociti normali. Gli Autori hanno inoltre dimostrato che l'inibizione di tale chinasi mediante "RNA interference" determinava una sensibile diminuzione della proliferazione delle cellule anaplastiche in vitro e una crescita più lenta del tumore prodotto dalle stesse cellule inoculate in topi immunodeficienti.

Successivamente un lavoro di microarray e immunoistochimica realizzato su 32 casi di carcinoma tiroideo anaplastico identificò l'Aurora-A tra le proteine più frequentemente e più fortemente iperesprese in tali tumori (28).

Alla luce del potenziale oncogenico delle chinasi Aurora e delle succitate evidenze sperimentali, è ragionevole ipotizzarne un coinvolgimento nello sviluppo del fenotipo maligno del tireocita e dunque considerarle un potenziale bersaglio per la terapia antitumorale, in modo particolare per i carcinomi tiroidei scarsamente differenziati o indifferenziati, resistenti alla maggior parte degli agenti chemioterapici attualmente in uso.

CAPITOLO 2

I CARCINOMI TIROIDEI

2.1 Epidemiologia

Il cancro della tiroide è il tumore endocrino più frequente (92% dei casi delle neoplasie endocrine), tuttavia è relativamente raro (1-2%) se si considera l'insieme dei tumori maligni (29).

I tassi d'incidenza e di mortalità riportati dall'epidemiologia sono in funzione di differenti parametri, quali la natura del tumore, il sesso, l'area geografica e l'anno di osservazione.

Negli Stati Uniti i dati del Surveillance Epidemiology and End-Results Cancer Registries Program (SEER) relativi al periodo 2000-2007 indicano una incidenza annuale media di 8,5/100.000 (4,3 e 12,5/100.000 rispettivamente negli uomini e nelle donne). Sempre secondo i dati del SEER, l'incidenza del carcinoma tiroideo è aumentata da 3,6/100.000 nel 1973 a 8,5/100.000 nel 2007 (30). Non si è registrata alcuna modifica degli istotipi meno frequenti (follicolare, midollare, carcinoma scarsamente differenziato ed anaplastico), ma l'incremento è attribuibile interamente all'aumentata incidenza del carcinoma capillifero. Inoltre tra il 1988 e il 2002, il 49% dell'incremento di incidenza riguarda i tumori ≤ 1 cm (microcarcinomi) e nell'87% i tumori ≤ 2 cm. L'incidenza microcarcinoma capillifero (figura 8) è infatti aumentata dal 7.3% (1985-1994) al 36.4 % (1995-2004) (31-35).

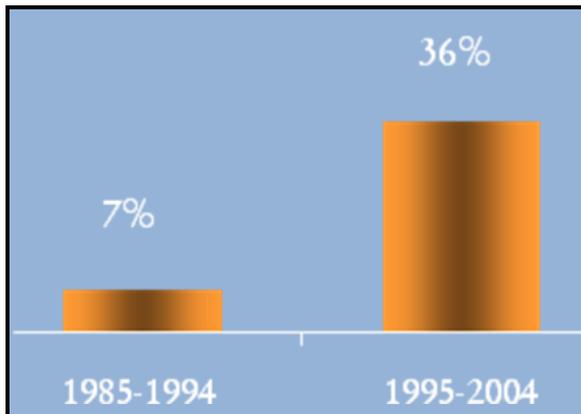


Figura 8- Aumento dell'incidenza dei microcarcinomi papilliferi

(modificata da rif.31)

Tale aumento va di pari passo con il diminuire delle dimensioni medie dei tumori tiroidei, della frequenza delle linfadenopatie cervicali palpabili e delle metastasi a distanza. L'aumento di incidenza è verosimilmente più apparente che reale ed è dovuto ad un'accuratezza diagnostica più efficace e più precoce di forme tumorali (diminuzione dell'età alla diagnosi) che, per la loro indolenza clinica, possono restare misconosciute per anni (figura 9).

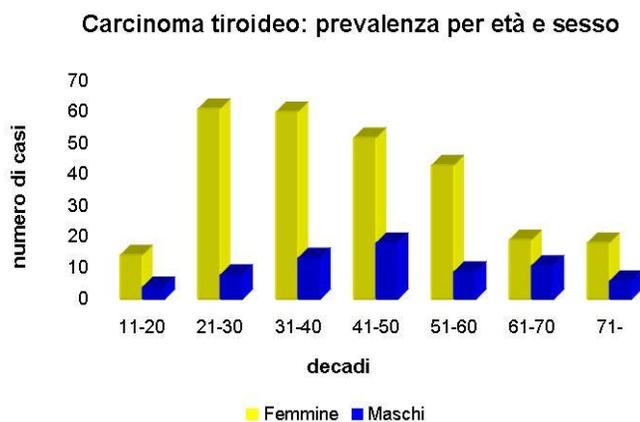


Figura 9– Prevalenza del carcinoma tiroideo per età e per sesso in una casistica di 500 casi diagnosticati presso il Centro Malattie della Tiroide tra il 1985 ed il 2004.

Dai dati riportati si evince, inoltre, che il tumore della tiroide colpisce più frequentemente le donna, con un rapporto di 2-4:1 rispetto agli uomini. L'American Cancer Society ha recentemente stimato che il cancro della tiroide è il 5° in ordine di frequenza nelle femmine (figura 10). In figura 11 sono riportati i dati in Italia.

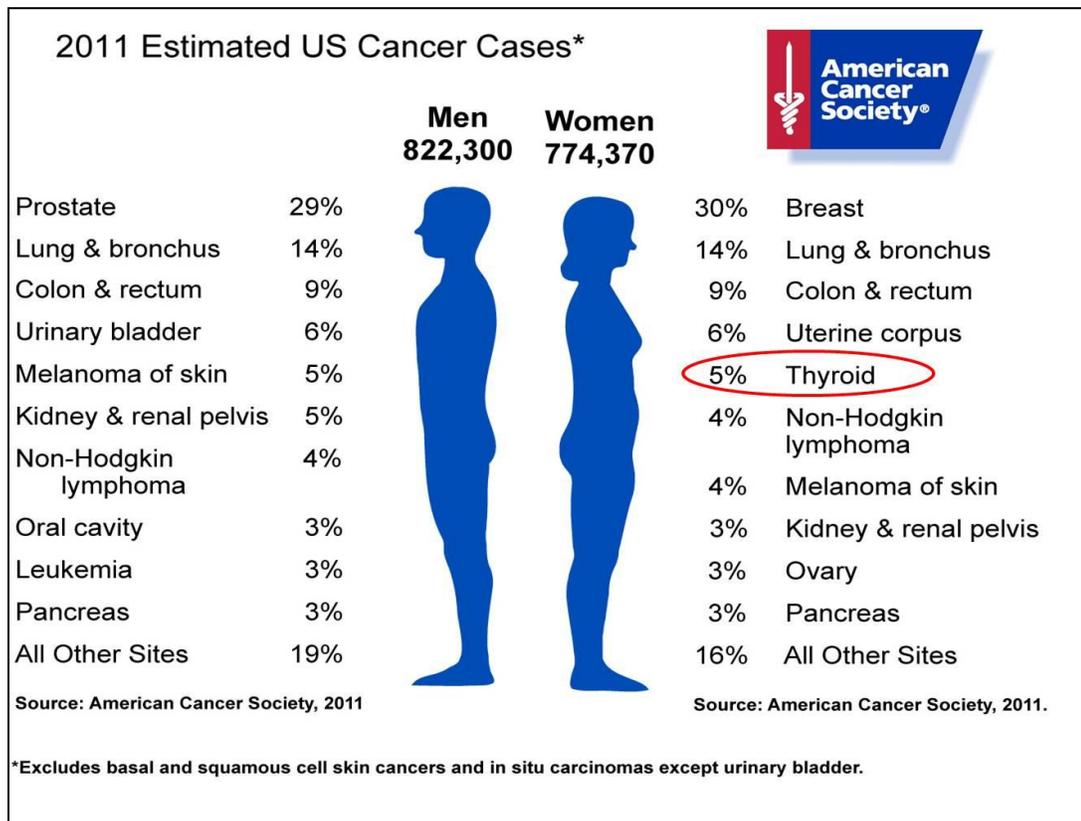


Figura 10- Dati American Cancer Society

Rango	Maschi	Femmine
1°	Prostata (20%)	Mammella (29%)
2°	Polmone (15%)	Colon-retto (14%)
3°	Colon-retto (14%)	Polmone (6%)
4°	Vescica* (10%)	Utero corpo (5%)
5°	Stomaco (5%)	Tiroide (5%)

Figura 11- Ordine di frequenza dei tumori in Italia

L'incidenza del carcinoma tiroideo varia anche in rapporto alle fasce d'età: il picco d'incidenza è intorno a 40-45 anni nelle donne e a 55-60 anni negli uomini ed è raro al di sotto dei 16 anni (incidenza annuale tra 0,02 e 0,3 casi per 100.000).

L'incidenza relativa dei carcinomi differenziati, *papilliferi* e *follicolari*, è in funzione dell'apporto alimentare di iodio: nelle regioni a carenza iodica prevale il carcinoma follicolare, mentre nelle zone con sufficiente apporto iodico c'è maggiore prevalenza dei cacinomi papilliferi.

Se da un lato, l'incidenza aumenta nel tempo, la mortalità resta bassa. La mortalità annua per carcinoma tiroideo è compresa tra 0,2 e 1,2/100.000 negli uomini e tra 0,4 e 2,8 nelle donne, quindi nettamente inferiore all'incidenza. Questo perché le neoplasie della tiroide sono generalmente poco aggressive, presentano un'evoluzione lenta ed una prognosi globalmente favorevole con una sopravvivenza a cinque anni superiore all'85% (figura 12).

Inoltre, grazie ad una migliore educazione sanitaria, aumentando l'apporto alimentare di iodio, si assiste ad una diminuzione dei casi di carcinomi follicolari e ad un relativo aumento delle forme di papillifero, caratterizzate da una prognosi più favorevole.

Infine, un ruolo fondamentale è ricoperto dal miglioramento delle metodiche di trattamento e di follow-up.

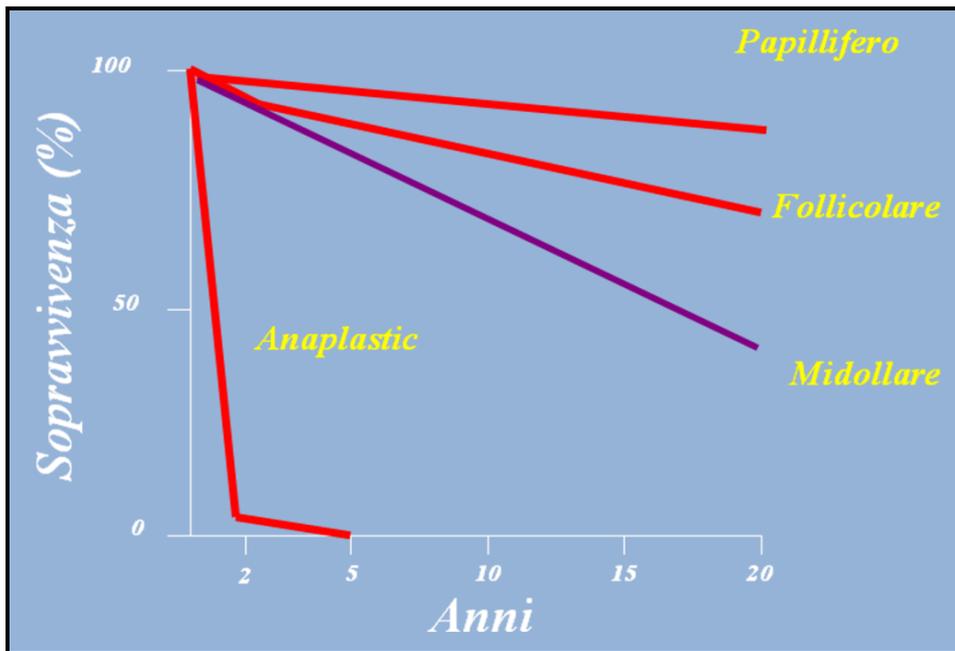


Figura 12- Sopravvivenza nei diversi istotipi di carcinoma tiroideo

2.2 Fattori di rischio

Come per la maggior parte delle neoplasie anche per il tumori tiroidei l'eziologia sembra essere multifattoriale e il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali nei soggetti a rischio (36). Tra questi i principali sono:

- *Fattori genetici*
- *Radiazioni ionizzanti*
- *Area geografica di residenza*
- *Sesso e fattori ormonali*

- **Fattori genetici**

Nell'ultimo decennio sono stati proposti diversi modelli di carcinogenesi per spiegare l'origine cellulare dei tumori tiroidei. Il *modello multifasico* (37) (figura 13), o *paradigma di Vogelstein*, prevede che il tessuto tiroideo normale, in seguito ad una serie di alterazioni geniche e cromosomiche, dia origine inizialmente ad un *adenoma follicolare* o a un *microcarcinoma capillifero*, i quali evolverebbero, rispettivamente, in *carcinoma follicolare* ed in *carcinoma capillifero*; questi ultimi per accumulo di mutazioni ulteriori si dedifferenzierebbero in *carcinoma anaplastico*.

Il modello di carcinogenesi fetale postula, invece, che il carcinoma tiroideo derivi da blasti o da cellule staminali normali di origine fetale. In particolare, tale modello assume l'esistenza nella ghiandola adulta di tre diversi tipi di precursori cellulari:

- 1) Cellule esprimenti la fibronectina oncofetale ma nessuno dei marcatori caratteristici dei

tireociti differenziati, da cui avrebbero origine i cacinomi anaplastici;

- 2) Tireoblasti esprimenti la fibronectina oncofetale e la tireoglobulina, che produrrebbero i carcinomi papilliferi;
- 3) Protireociti, più differenziati ed esprimenti la tireoglobulina ma non la fibronectina oncofetale, che si trasformerebbero in adenomi e carcinomi follicolari.

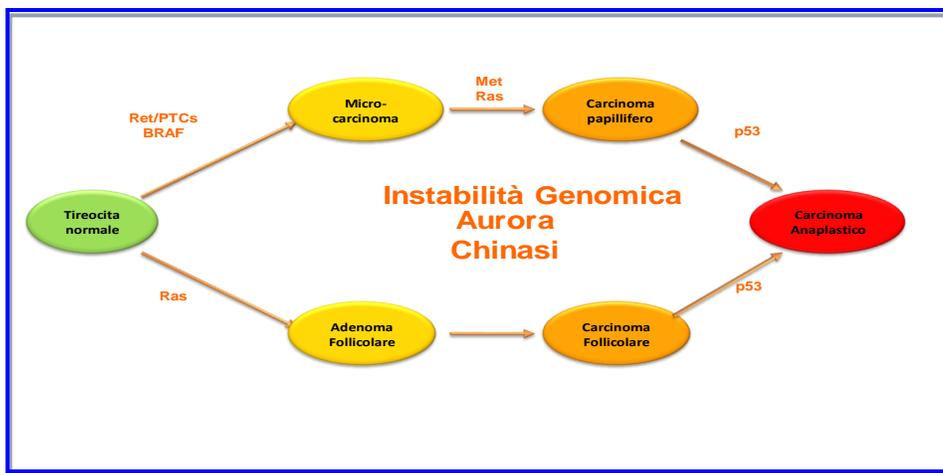


Figura 13 – Modello multifasico nei tumori tiroidei

(modificato da Xing M, *Endocrinology*, 2007 e da Fagin JA, *Mol Endocrinol*, 2002)

Il riscontro nei tumori tiroidei di popolazioni cellulari disomogenee ha portato alla formulazione di una terza ipotesi di carcinogenesi: il modello delle cellule staminali cancerose. Questo presume che solo un sottogruppo di cellule maligne, in grado di dividersi simmetricamente e asimmetricamente e di dare origine a diverse progenie cellulari, sia responsabile del rinnovamento e della crescita della popolazioni tumorale.

Tali cellule potrebbero derivare da blasti, da tireociti maturi geneticamente mutati, da cellule staminali normali in cui avvengono cambiamenti epigenetici o dal dedifferenziamento aberrante di cellule neoplastiche, in particolare una transizione epitelio-mesenchimale, che si compirebbe in una fase avanzata della malattia.

Quale che sia l'origine cellulare del carcinoma tiroideo, la sua eziologia è tutt'ora ignota. L'unico fattore di rischio ad oggi riconosciuto per i carcinomi tiroidei differenziati è l'esposizione alle radiazioni, in particolar modo nell'età infantile.

Ad ogni modo, verosimilmente i carcinomi tiroidei si sviluppano in conseguenza di una complessa interazione tra fattori ambientali e genetici.

La crescita tumorale è, infatti, legata ad uno squilibrio irreversibile di questi meccanismi di regolazione che può essere dovuto sia ad un'esaltata attività stimolatoria che ad una ridotta attività del controllo inibitorio. Il carattere monoclonale della maggior parte dei tumori benigni e maligni della tiroide suggerisce che la loro genesi sia dovuta ad anomalie genetiche. Molte di queste sono state descritte per i geni *ras*, *gsp*, *p53*, *ret*, *trk* e per il gene del recettore del TSH (38).

- **RAS**

La proteina RAS attivata stimola la divisione cellulare e inibisce la differenziazione delle cellule follicolari. L'attivazione dell'oncogene *ras* causata da mutazioni puntiformi è stata evidenziata in circa il 40% dei tumori tiroidei benigni e maligni. Mentre in altri tumori umani un solo gene *ras* è in genere mutato, nei tumori della tiroide sono state ritrovate

mutazioni dei tre geni *ras* (*H-*, *Ki-*, *N-ras*) con una frequenza simile negli adenomi, nei carcinomi differenziati e nei carcinomi anaplastici.

La frequenza delle mutazioni *ras* nei carcinomi papillari varia, a seconda delle casistiche, dallo 0% al 60%. Questa variabilità non può essere attribuita a differenze metodologiche, ma molto probabilmente dipende da fattori ambientali come l'apporto di iodio. Gli argomenti a favore del ruolo del gene *ras* mutato nella tumorigenesi tiroidea derivano da esperimenti in cui il gene *ras* mutato è stato introdotto *in vitro* in cellule follicolari. In queste condizioni è stimolata la proliferazione cellulare e viene persa o attenuata l'espressione dei marcatori della differenziazione, quali la tireoglobulina, la tireoperossidasi, la captazione dello iodio.

- **Mutazioni del gene del recettore del TSH e della proteina $G_s\alpha$ (oncogene *gsp*)**

Il TSH stimola la proliferazione e la differenziazione delle cellule follicolari della tiroide essenzialmente aumentando la produzione di cAMP e in ultimo attivando i fattori di trascrizione CREB (*cAMP Responsive Element Binding protein*), i quali si legano a determinate sequenze del DNA (*cAMP Responsive Element*) ed aumentano o diminuiscono la trascrizione dei geni a valle. Mutazioni attivanti il gene del TSH-R o della subunità $G_s\alpha$ sono ritenute responsabili della formazione degli adenomi tossici e riscontrate, più raramente, sia negli adenomi che nei carcinomi follicolari ben differenziati.

- **RET/PTC**

Il proto-oncogene *ret*, localizzato sul cromosoma 10, codifica per un recettore di membrana con attività tirosin-chinasica. La proteina RET è composta di un dominio extracellulare contenente una regione distale con quattro sequenze ripetute caderina-simili, una regione ricca in cisteine, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare con attività tirosin-chinasica.

RET è il recettore della famiglia dei fattori di crescita neurotrofici derivanti dalle cellule gliali, comprendente il GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*), la neutrina, l'artemina e la persefina (39). Il gene è espresso in una varietà di cellule neuronali, incluse la midollare del surrene e le cellule C della tiroide, mentre non è espresso nei tireociti.

Esistono diverse forme attivate del proto-oncogene *ret*, tutte risultanti da riarrangiamenti genici che portano alla fusione del dominio tirosin-chinasico del gene *ret* con il dominio 5' di diversi geni costitutivamente attivi, il quale agisce come promotore assicurando l'espressione permanente del gene *ret*. La proteina chimerica risultante dalla fusione è localizzata nel citoplasma e non nella membrana plasmatica. Tra i tumori tiroidei, riarrangiamenti dell'oncogene *ret* sono stati trovati esclusivamente nel carcinoma papillifero, da cui l'acronimo RET/PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*) (38).

Tre forme principali di riarrangiamento sono state descritte fino ad oggi: RET/PTC1, risultato di un'inversione nel cromosoma 10 che porta alla fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con un gene ubiquitario chiamato *H4*, con funzione ancora ignota; RET/PTC2, risultato di una fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con un gene

codificante la subunità regolatoria R1 α della protein-chinasi A, localizzato nel cromosoma 17; RET/PTC3, risultato di un'inversione nel cromosoma 10 con fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con *ELE1*, un gene a funzione ignota (figura 14). Inoltre, alcune varianti di RET/PTC3 sono state osservate in carcinomi papillari post-Chernobyl (40).

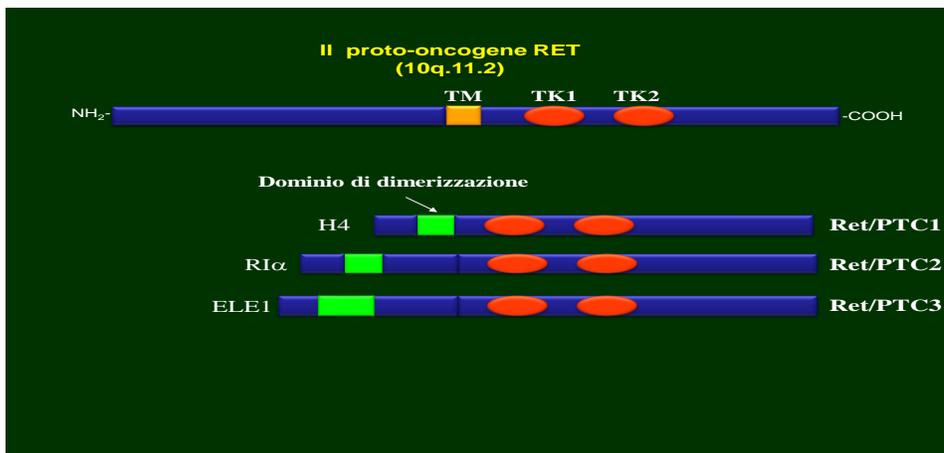


Figura 14 - Protooncogene RET

- **TRK**

Il proto-oncogene *trk* è localizzato sul cromosoma 1 e codifica per una proteina recettoriale transmembrana con un dominio tirosin-chinasico, normalmente espressa solo nei gangli nervosi, il cui ligando è l'NGF (*Nerve Growth Factor*).

L'attivazione di *trk* avviene attraverso un riarrangiamento genico che porta alla fusione del dominio carbossi-terminale di *trk* con la regione 5' di un gene non correlato, ad espressione ubiquitaria. Sono stati descritti vari riarrangiamenti, limitati ai carcinomi tiroidei papillari, con frequenze tra lo 0% e il 10%: TRK-T1 e TRK-T2, generati dalla fusione del dominio

tirosin-chinasico di *trk* con la regione 5' del gene *trp* (*Traslocated Promoter Region*); TRK-T3, risultante dalla fusione del dominio tirosin-chinasico di *trk* con la regione 5' del gene *tag* (*Tumor Antigen Gene*) (38).

- **MET**

Il proto-oncogene *met* codifica per un recettore di membrana con un dominio tirosin-chinasico. Il suo ligando è il fattore di crescita degli epatociti (HGF), un potente mitogeno per le cellule epiteliali capace di promuovere la motilità e l'invasività cellulare. L'iperespressione di *met* è stata riscontrata nel 50% dei carcinomi tiroidei, specialmente nei carcinomi papillari (38).

- **BRAF**

BRAF è l'isoforma B della chinasi RAF, un componente della via di segnale di RAS che gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita, della divisione e della proliferazione cellulare ed è il più forte attivatore del segnale delle chinasi a valle. L'attivazione costitutiva di questa cascata di attivazioni porta alla tumorigenesi. Mutazioni del gene *braf* sono state trovate in una gran varietà di neoplasie umane, soprattutto melanomi.

Studi recenti hanno dimostrato che la mutazione T1799A nell'esone 15 del gene *braf*, che porta alla sostituzione amminoacidica V600E e alla conseguente attivazione costitutiva della chinasi, è presente nei carcinomi papillari della tiroide con una prevalenza dal 29%

all'83%. La mutazione T1799A si riscontra esclusivamente nei PTC e nei tumori anaplastici PTC-derivati, ma non nel tessuto tiroideo normale o nelle neoplasie benigne e nei carcinomi follicolari (41, 42).

- **PAX-8**

Uno dei più importanti fattori trascrizionali specifici della tiroide è Pax-8 (457 aa), che regola il differenziamento durante la vita embrionale, sia della ghiandola tiroidea che del rene e del cervello. Alterazioni del gene *pax-8*, durante l'embriogenesi, dovute sia ad aploinsufficienza che ad overespressione, possono causare rispettivamente ipoplasia tiroidea o tumore di Wilm.

Nella tiroide adulta Pax-8, insieme ai fattori trascrizionali TTF-1 (*Thyroid Transcription Factor 1*) e TTF-2 (*Thyroid Transcription Factor 2*), è responsabile del mantenimento del fenotipo differenziato, caratterizzato dall'espressione della Tg, della TPO, del NIS e del TSH-R. Infatti, mutazioni che colpiscono il gene *pax-8* e ne alterano l'espressione sono state riscontrate nei carcinomi della tiroide e si associano al dedifferenziamento cellulare (43).

In particolare, in più del 50% degli FTC si è trovato il riarrangiamento t(2;3)(q13;p25) che giustappone il gene *pax-8* al gene *PPAR γ 1* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 1*). L'oncogene risultante dalla fusione accelera la crescita cellulare, riduce il tasso di apoptosi e conferisce alla cellula la capacità di replicarsi indipendentemente dall'ancoraggio e dal contatto.

- **GENI ONCOSOPPRESSORI**

I geni oncosoppressori codificano per proteine che normalmente inibiscono o arrestano la divisione delle cellule o ne limitano la sopravvivenza. Essi assumono le caratteristiche di oncogeni per perdita di funzione e agiscono in maniera recessiva. Un allele è in genere perduto tramite delezione di una porzione di materiale cromosomico, mentre l'altro allele è inattivato tramite mutazioni puntiformi.

- **Rb1**

Il gene *Rb1* è situato sul cromosoma 13q14.2 e il suo prodotto è la proteina RB1 (*RetinoBlastoma 1*), che regola la crescita cellulare esercitando un controllo negativo sulla proliferazione. Essa esercita la sua funzione legandosi al DNA e bloccando il passaggio delle cellule dalla fase G0 a quella G1 impedendo quindi la prosecuzione del ciclo replicativo.

Le mutazioni del gene *Rb1*, oltre ad intervenire nell'evoluzione del carcinoma papillare occulto della tiroide in carcinoma clinicamente manifesto, risultano associate a numerose altre neoplasie umane come il retinoblastoma, l'osteosarcoma, il carcinoma della mammella (44).

- **p53**

Il gene *p53* è localizzato sul cromosoma 17 e rappresenta una tra le sedi più frequenti di alterazioni genetiche nei tumori umani. In condizioni fisiologiche, la proteina p53 blocca il ciclo cellulare attivando un gene che codifica per una proteina di 21kDa, la quale è in grado di legarsi ad una protein-chinasi ciclina-dipendente essenziale nel passaggio dalla fase G1

alla fase S, bloccandone l'attività.

La proteina p53 è localizzata nel nucleo ed esercita un controllo trascrizionale su diversi geni implicati nella risposta cellulare ad agenti mutageni, quali radiazioni ionizzanti, luce ultravioletta o sostanze chimiche.

Quando la cellula subisce un danno genetico si verifica un rapido aumento dei livelli di p53, la quale stimola l'espressione di alcuni geni che inducono l'arresto del ciclo cellulare, permettendo alla cellula di riparare il DNA prima della sua replicazione. Se il danno viene riparato con successo, la proteina p53 attiva un gene chiamato *mdm2*, il cui prodotto si lega a sua volta a p53 e la inattiva, sbloccando in questo modo il ciclo cellulare. Se, invece, durante l'arresto del ciclo il genoma non viene riparato in modo soddisfacente la p53 induce l'espressione della proteina BAX (*BCL2-Associated X protein*), che inattiva la proteina anti-apoptotica bcl-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), e della proteina IGF-BP3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*), che si lega al recettore del fattore di crescita insulino-simile (IGF) e induce l'apoptosi. Mutazioni puntiformi inattivanti il gene *p53* sono state descritte con elevata frequenza (22-83%) nei carcinomi anaplastici della tiroide ma non in quelli ben differenziati (44, 45).

➤ *Radiazioni ionizzanti*

Un altro fattore che condiziona notevolmente l'incidenza delle neoplasie tiroidee e, in particolar modo, quella dei carcinomi papilliferi è l'esposizione a radiazioni ionizzanti.

- *Terapia radiante per patologie ematologiche o oncologiche*

L'esposizione a radiazioni esterne nella regione della testa e del collo determina un aumentato rischio di neoplasie tiroidee. Circa i 2/3 delle forme tumorali radio-indotte sono di natura benigna e 1/3 sono di natura maligna, quasi esclusivamente rappresentati dall'istotipo papillifero. L'uso delle radiazioni esterne a scopo terapeutico per affezioni benigne della testa e del collo (tinea capitis, acne, ipertrofia timica) è stato molto frequente in passato, soprattutto in pazienti in età pediatrica. Altresì i soggetti con pregresso tumore ematolinfopoiético e sottoposti a terapia radiante durante l'infanzia presentano un elevato rischio di sviluppare un successivo carcinoma tiroideo. La terapia radiante in tali casi può essere effettuata sia come condizionamento precedente al trapianto di cellule staminali ematopoietiche che come trattamento locale (testa-collo-torace) o total body. In tutti i casi il rischio in insorgenza di tumore tiroideo si è dimostrato elevato (RR 4.8 nel condizionamento; RR 3.44 nel trattamento). Tale rischio incrementa fino a dosi di radiazioni comprese tra 20-29 Gy; mentre per dosi > 30 Gy si osserva un crollo dell'effetto dose-risposta perché a queste alte dosi l'evoluzione tumorale è impedita dalla morte cellulare (effetto cell-killing). Il carcinoma indotto dall'esposizione a radiazioni esterne si manifesta tipicamente con una latenza compresa tra 5 e 40 anni dal momento dell'esposizione e il fattore di rischio più importante per il suo sviluppo è rappresentato dalla giovane età al momento dell'esposizione stessa (età < 10 anni), in quanto l'effetto delle radiazioni è massimo nei periodi di rapida proliferazione cellulare, com'è la tiroide in epoca evolutiva. Per lo sviluppo di carcinomi tiroidei radio-indotti vi è anche il concorso di una certa predisposizione genetica, dimostrata dal fatto che i soggetti che ne sono affetti sono più suscettibili allo sviluppo di un altro tumore radio-indotto (46-47).

- *Contaminazione ambientale di radionuclidi*

L'esplosione accidentale della centrale nucleare di Chernobyl nel 1986 ha determinato il rilascio nell'atmosfera di enormi quantità di particelle radioattive, inclusi molti isotopi radioattivi dello iodio, con notevoli conseguenze per la tiroide. Tale incidente ha portato negli ultimi anni un drammatico aumento dell'incidenza del carcinoma tiroideo è aumentata nelle popolazioni della Bielorussia e dell'Ucraina esposte alla contaminazione radioattiva. Come già precisato, l'azione delle radiazioni ionizzanti sulla tiroide si esplica soprattutto in soggetti di età infantile all'epoca dell'esposizione: di conseguenza, dopo il disastro di Chernobyl, sono aumentati i casi di cancro tiroideo nell'età adolescenziale e nel giovane adulto.

I carcinomi tiroidei radio-indotti sono rappresentati nel 90% dei casi da carcinomi *papilliferi*; questo perché le radiazioni ionizzanti, come già accennato in precedenza, determinano numerosi riarrangiamenti del proto-oncogene *RET/PTC* con altri geni, il più frequente dei quali è il *RET/PTC 3*.

A differenza delle forme non radio-indotte, la variante istologica più frequente non è quella classica, ma la variante solida-follicolare e in minor misura la variante sclerosante.

Anche nelle regioni europee non direttamente interessate dal disastro di Chernobyl si è assistito ad un aumento dell'incidenza dei tumori tiroidei (2.4 volte negli ultimi 30 anni).

Per quanto riguarda la correlazione tra l'esposizione ad isotopi radioattivi dello iodio e l'insorgenza di carcinomi tiroidei, è stato ampiamente dimostrato che la somministrazione

di I^{131} , sia a scopi diagnostici sia a scopi terapeutici, non determina un' aumentata incidenza di neoplasie tiroidee (48).

➤ *Area geografica di residenza*

Come già accennato in precedenza, nelle aree a carenza iodica vi è una più alta prevalenza di carcinomi tiroidei, con prevalenza degli istotipi follicolare e anaplastico.

➤ *Sesso e fattori ormonali*

L'incidenza del carcinoma della tiroide, come già detto, è di 2-4 volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini. Nel periodo pre-pubere e in fase post-menopausale l'incidenza risulta pressochè identica nei due sessi, suggerendo un possibile ruolo degli estrogeni anche se non provato fin'ora. Il recettore per gli estrogeni è espresso nel tessuto tiroideo normale e in quello dei carcinomi papilliferi, mentre il recettore per testosterone è espresso solo nel tessuto tiroideo normale e non in quello neoplastico.

2.3 Anatomia patologica

La tiroide può essere sede di neoplasie maligne che traggono origine o dalle strutture epiteliali che costituiscono il parenchima ghiandolare o dalle cellule C (o parafollicolari). Più raramente la tiroide può essere interessata da neoplasie primitive di derivazione non epiteliale (sarcomi, linfomi, teratomi, carcinomi a cellule squamose) e, in ragione della sua ricca vascolarizzazione, da metastasi provenienti da altri organi (melanoma, carcinoma del polmone, della mammella, dell'esofago).

Nell'ambito della patologia neoplastica di natura epiteliale esistono diversi tipi (49-55):

- ***i tumori benigni***
 - ***i tumori maligni differenziati (carcinomi papillifero e follicolare) che originano dalle cellule follicolari***
 - ***il carcinoma scarsamente differenziato ed anaplastico, derivante da uno degli istotipi differenziati***
 - ***il carcinoma midollare, derivante dalle cellule parafollicolari***
- *Tumori benigni di origine follicolare*

Praticamente tutti gli adenomi tiroidei si presentano come noduli solitari. Poiché, a parte rarissime eccezioni, derivano dalle cellule follicolari, vengono chiamati adenomi follicolari. Essi hanno un aspetto microscopico molto variabile. Possono essere formati da follicoli ben differenziati, più o meno simili a follicoli normali, o al contrario da travate di cellule follicolari formanti follicoli rudimentali. Il solo criterio che permette di classificare un

tumore follicolare come benigno è l'assenza di invasione vascolare e capsulare. In virtù della loro importanza, questi parametri vanno ricercati su numerose sezioni istologiche, specialmente alla periferia del tumore, e pertanto la diagnosi viene effettuata unicamente in fase post-operatoria, mediante l'analisi dei reperti chirurgici.

- *Carcinomi differenziati*

Esistono due forme istologiche di carcinoma differenziato della tiroide: il *carcinoma papillifero* e quello *follicolare*.

Si manifestano in ogni fascia d'età con una prevalenza del papillifero nella terza e quarta decade di vita e del follicolare nella quinta e sesta. Presentano una frequenza significativamente diversa, rappresentando il papillifero il 90% dei casi e il follicolare il 5%. Come precedente accennato, nelle aree a sufficiente apporto iodico si osserva un aumento del rapporto papillifero/follicolare, mentre nelle zone iodocarenti questo rapporto si riduce. Il carcinoma papillifero rappresenta la grande maggioranza dei tumori maligni della tiroide associati a pregressa esposizione a radiazioni ionizzanti. Il loro effetto carcinogeno ha un lungo periodo di latenza e segue una curva dose-risposta lineare. Il carcinoma papillifero è costituito da lesioni solitarie o multifocali della tiroide. La forma istologica classica rappresenta circa il 70% dei casi clinicamente diagnosticati. Si tratta di tumori di consistenza aumentata, non capsulati o solo parzialmente capsulati. A livello microscopico, i carcinomi papilliferi contengono papille la cui distribuzione può essere focale o diffusa. Ogni papilla è formata da un asse fibrovascolare rivestito da strati singoli o multipli di epitelio cubico. L'esistenza di vere papille è un segno patognomonico del

carcinoma papillifero. Spesso si notano i corpi psammomatosi, cioè calcificazioni lamellari nell'ambito della lesione, di solito al centro delle papille. Questi sono caratteristici dei carcinomi papillari non essendo quasi mai riscontrati nei carcinomi follicolari e midollari e risultano quindi diagnostici di carcinoma papillifero.

Queste caratteristiche morfologiche, tuttavia non sono affatto costanti, e la loro assenza non esclude una diagnosi di carcinoma papillifero. Invece, qualunque sia l'architettura tessutale del tumore, la diagnosi di carcinoma papillifero è stabilita sulla base del tipico aspetto dei nuclei. Infatti i nuclei sono più voluminosi di quelli delle cellule tiroidee normali, contengono cromatina finemente dispersa che conferisce un aspetto vitreo al loro centro, da cui la denominazione di “*a vetro smerigliato*” o di “*a occhi dell'orfanelle Annie*”. La membrana nucleare, inoltre, risulta ispessita; il loro contorno è irregolare e alcuni possono apparire come fessurati o a “*chicco di caffè*”; certi nuclei presentano una pseudo-inclusione di grosse dimensioni, ben delimitata, che corrisponde ad una invaginazione intranucleare del citoplasma.

L'invasione linfonodale è frequente e precoce e si estende progressivamente dai linfonodi peri-tiroidei verso quelli più lontani. La propagazione linfatica intratiroidea è in parte ritenuta responsabile della frequente multifocalità del tumore all'interno della tiroide. L'invasione vascolare è più rara, con metastasi a distanza che interessano principalmente il polmone e lo scheletro. Generalmente la prognosi di questi tumori è buona.

Oltre alla *variante classica* appena descritta, esistono diverse *varianti* istologiche del carcinoma papillifero, che devono essere riconosciute in quanto possono in alcuni casi presentare un comportamento biologico e clinico diverso.

La *variante follicolare* è un tumore formato esclusivamente da follicoli ripieni di colloide. Tipiche papille possono essere messe in evidenza nelle metastasi linfonodali. E' tipica dei tumori radio-indotti insorti prevalentemente in soggetti giovani. La prognosi è molto vicina a quella delle forme classiche.

Le *forme diffuse sclerosanti* sono rare e si osservano essenzialmente nei bambini e nei giovani adulti. Si presentano come un ingrandimento globale della tiroide, dove i due lobi sono sostituiti da un tessuto tumorale duro. Le papille sono associate a metaplasia malpighiana, a densa fibrosi ed abbondanti corpi psammomatosi. Le metastasi linfonodali sono precoci e frequenti. La prognosi è lievemente meno favorevole rispetto a quella delle forme classiche, ma la risposta al trattamento è spesso buona.

Le *varianti a cellule alte o cilindriche* sono neoplasie voluminose che invadono i tessuti peri-tiroidei. Sono composte di papille rivestite di cellule la cui altezza è almeno il doppio della larghezza. Il citoplasma è granulare, eosinofilo. E' frequente l'invasione vascolare e locale. Sono tipiche dei soggetti anziani e hanno la prognosi peggiore tra tutte le forme di carcinoma papillifero.

Le *forme capsulate* sono varianti in cui la capsula è simile a quella degli adenomi, tuttavia, risulta spesso invasa per intero e al microscopio presenta lo stesso aspetto del carcinoma papillifero classico. La prognosi è favorevole.

Il carcinoma follicolare si presenta più abitualmente del papillifero come un nodulo tiroideo unico, più o meno capsulato. In funzione del grado di invasione dei vasi e della capsula, l'Organizzazione Mondiale della Sanità distingue due forme di carcinoma follicolare: la forma minimamente invasiva e la forma altamente invasiva. Questa distinzione ha un

notevole valore prognostico, poiché la prognosi peggiora con l'aumentare del grado di angioinvasività, anche se il livello di invasione al di là del quale la prognosi diviene sfavorevole non è chiaramente definito. Viceversa, l'invasione esclusivamente capsulare non sembra avere un'importanza rilevante ai fini della prognosi. I carcinomi minimamente invasivi rappresentano più del 50% dei carcinomi follicolari. La diagnosi di carcinoma follicolare può essere posta solo istologicamente in quanto il quadro citologico di lesione follicolare (categoria THY-3 – Thyroid Cancer Guidelines 2002 of British Thyroid Association) non fornisce elementi in grado di distinguere una lesione benigna da una maligna. La diagnosi di carcinoma follicolare è basata dunque unicamente sul riscontro dell'invasione dei vasi sanguigni e/o di infiltrazione della capsula. Per questo motivo, la diagnosi di malignità risulta difficile per le forme minimamente invasive, mentre nei carcinomi altamente invasivi è facilitata dall'evidente invasione vascolare, tiroidea o extra-tiroidea. La capsula, quando è ancora presente, appare infiltrata e distrutta dal tumore in diversi punti.

Dal punto di vista microscopico, il grado di differenziazione è diverso da un tumore all'altro, e anche all'interno di uno stesso tumore le caratteristiche architettoniche sono spesso variabili. Nella maggior parte dei casi il tumore si presenta ben differenziato e formato da follicoli ripieni di colloide, altrimenti è scarsamente differenziato, costituito da microfollicoli o da aspetti solidi, tutti privi di colloide. Comunque, in nessun caso si ritrova l'aspetto nucleare del carcinoma papillifero. Il carcinoma follicolare invade principalmente i vasi sanguigni e più raramente i linfatici. Le metastasi a distanza si localizzano nei polmoni, nelle ossa e raramente nel cervello.

Come per il carcinoma papillifero anche per quello follicolare esistono *varianti istologiche*: i *carcinomi a cellule chiare*, a *cellule ossifile* (o a *cellule di Hürthle*) e *insulari*.

I *carcinomi a cellule chiare* hanno caratteristiche morfologiche e cliniche identiche a quelle del carcinoma follicolare. Le cellule sono chiare a causa della presenza di vescicole citoplasmatiche o per l'accumulo intracellulare di grasso o di glicogeno. Devono essere differenziati, mediante immunistochemica per la Tg, dalle metastasi intratiroidi di un carcinoma renale o paratiroideo.

I *carcinomi a cellule ossifile* (o a *cellule di Hürthle*) sono formati da cellule con ampio citoplasma intensamente eosinofilo e nuclei rotondeggianti, relativamente uniformi. L'aspetto granuloso del citoplasma è legato all'abbondanza di mitocondri. I carcinomi a cellule ossifile tendono ad invadere i tessuti limitrofi, e le recidive loco-regionali sono frequenti.

I *carcinomi insulari*, anch'essi rari, sono carcinomi follicolari poco differenziati e altamente invasivi. Le cellule sono più dense e più piccole di quelle degli altri carcinomi follicolari. Le metastasi sono frequenti e la prognosi è sfavorevole.

2.4 Cenni su diagnosi e stadiazione

Clinicamente il carcinoma differenziato della tiroide è spesso asintomatico e viene diagnosticato in presenza di una tumefazione o di una formazione nodulare che, all'esame ecografico, presenta caratteristiche indicative di malignità.

L'indagine ecografica risulta a tutt'oggi l'esame di prima istanza nella diagnosi delle lesioni neoplastiche della tiroide, soprattutto nell'individuare i noduli che necessitano di una valutazione citologica previo agoaspirato ecoguidato.

I noduli con caratteristiche di allarme, all'ecografia appaiono ipoecogeni, presentano profili irregolari e mal definiti, spesso sono singoli, possono deformare il profilo ghiandolare e, talvolta, nelle forme di maggiori dimensioni, infiltrano i vasi trombizzandoli.

La lesione neoplastica si presenta nel 63% dei casi come un nodulo ipoecogeno e nel 26% dei casi isoecogeno rispetto al parenchima circostante.

All'eco-color-Doppler, nella maggior parte dei casi, le lesioni maligne appaiono vascolarizzate con un pattern tipo III, questa però non è una caratteristica distintiva dei noduli maligni, in quanto altre lesioni solide, sia benigne che maligne, possono mostrare una vascolarizzazione intralesionale.

Per la diagnosi di carcinoma differenziato della tiroide, molto significativa risulta la presenza di linfo-adenopatie laterocervicali, caratterizzate agli ultrasuoni da modificazioni morfologiche, aumento di volume e sovvertimento strutturale. Nelle adenopatie metastatiche il caratteristico ilo linfonodale, che normalmente appare iperecogeno, non risulta identificabile e all'esame color-Doppler si evidenziano più poli vascolari. Altri

aspetti di adenopatia metastatica sono la fusione dei linfonodi e la presenza di pacchetti o colate tessutali lungo la regione laterocervicale e sovraclaveare.

I carcinomi *papillifero* e *follicolare* presentano alcune caratteristiche ecografiche distintive; il primo si presenta, più spesso, come un nodulo unico solido prevalentemente ipoecogeno con calcificazioni puntiformi intralesionali (*microcalcificazioni*), presenti nell'80-85% dei casi e specifiche di questa forma tumorale. All'esame color-Doppler, dimostra una ricca vascolarizzazione irregolare.

Il carcinoma *follicolare* spesso insorge su una lesione nodulare preesistente e può essere associato a noduli iperplastici adenomatosi. All'ecografia questo tipo istologico si presenta come un nodulo solido omogeneo iso- o iper-ecogeno, è delimitato da una capsula spessa ed irregolare e presenta una vascolarizzazione peri ed intralesionale.

L'esame ecografico, tuttavia, non possiede una significativa sensibilità nel precisare la natura della lesione neoplastica.

La certezza diagnostica viene raggiunta, infatti, tranne che per l'istotipo follicolare, soltanto mediante esame citologico da *agoaspirato (FNA-C) eco guidato* (56) L'FNA presenta una specificità tra il 72 ed il 100% e la sua sensibilità dipende dalle caratteristiche del prelievo; difatti bisogna tener presente che in un 15% dei casi il risultato può essere inadeguato o per il prelievo di materiale notevolmente ematico, come succede per i noduli riccamente vascolarizzati, o per il prelievo di materiale insufficiente quando la componente cistica è predominante. Nei casi in cui il primo prelievo non sia attendibile è indicato eseguire un secondo prelievo soprattutto in presenza di un nodulo fortemente sospetto o che, nel tempo, è aumentato di dimensioni.

Per quanto riguarda l'esame scintigrafico, il suo ruolo è limitato per la scarsa sensibilità nell'individuare noduli di piccole dimensioni; invece tra i noduli di dimensioni superiori ad 1 cm, quelli a maggior rischio di malignità sono ipocaptanti.

La TC e la RMN trovano applicazione nel valutare, nei casi mediamente avanzati (T2, T3, T4), l'interessamento della trachea, dell'esofago e del mediastino superiore.

Infine, bisogna considerare l'importante ruolo della PET, che ha un'elevata sensibilità (fino al 100%) nell'individuare sia il tumore primitivo sia le metastasi linfonodali. E' estremamente utile anche nella valutazione delle sospette recidive, nella differenziazione dei tessuti cicatriziali, spesso difficili da valutare per il vasto sovertimento delle regioni sottoposte ad interventi demolitivi, dai tessuti neoformati. Inoltre, la PET consente di identificare le metastasi da carcinoma differenziato che hanno perso la capacità di captare lo iodio.

- *Stadiazione*

Tutti i pazienti con carcinoma tiroideo differenziato devono essere stadiati con il sistema TNM.

Esso prende in considerazione tre parametri: dimensioni ed estensione del tumore primitivo (T), presenza o assenza di metastasi a carico dei linfonodi regionali (N) e presenza o assenza di metastasi a distanza (M). Nella stadiazione TNM per i carcinomi tiroidei sono stati inseriti fra i criteri di classificazione l'età e le caratteristiche istologiche.

La AJCC (American Joint Committee on Cancer) ha pubblicato nel 2009 la 7° edizione del TNM (Tabella 2) (57).

T1	tumore <2 cm
T2	tumore superiore a 2 cm ma inferiore a 4 cm
T3	tumore superiore a 4 cm limitato alla tiroide o con estensione extratiroidea minima
T4a	tumore di ogni dimensione, esteso oltre la capsula tiroidea che invade una qualsiasi delle seguenti strutture: sottocute, laringe, trachea, esofago, nervo laringeo ricorrente
T4b	tumore che invade la fascia prevertebrale o coinvolge l'arteria carotide o i vasi mediastinici

Nx	linfonodi non valutabili
N0	linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	metastasi ai linfonodi regionali
N1a	metastasi in linfonodo(i) del livello VI
N1b	metastasi in linfonodo(i) latero-cervicale(i), omolaterale(i) o controlaterale(i) o bilaterale (i) o in linfonodo(i) mediastinico(i) superiore(i)

Mx	metastasi a distanza non accertabili
M0	metastasi a distanza assenti
M1	metastasi a distanza presenti

Tabella 2- Classificazione TNM per i CTD -linee guida ATA 2009-

2.5 Cenni sulla terapia chirurgica e radiometabolica

- Tiroidectomia totale

Per individuare il trattamento chirurgico più adeguato, è di fondamentale importanza eseguire, in maniera attenta e scrupolosa, la valutazione pre-operatoria. Essa deve comprendere soprattutto un'accurata ispezione delle stazioni linfonodali del collo mediante esame ecografico per la ricerca di eventuali linfonodi sospetti di metastasi.

L'intervento chirurgico d'elezione è la tiroidectomia totale, mentre nei casi in cui il tumore infiltra le strutture extra-tiroidee sono necessari interventi più estesi.

- Chirurgia dei linfonodi regionali

L'interessamento linfonodale è, in linea di massima, correlato al tipo istologico del tumore. In pazienti con carcinoma papillifero si verifica nel 20-50% dei casi nell'adulto e, con frequenza ancor maggiore, nei bambini e negli adolescenti. Nel carcinoma follicolare l'impegno linfonodale è meno frequente, non più del 10-20% dei casi.

Come già specificato, il compartimento centrale del collo (VI livello) e i compartimenti laterali (III e IV livello) sono quelli più frequentemente sede di metastasi linfonodali. Il coinvolgimento linfonodale è più spesso omolaterale al tumore e nell'ambito di una catena linfonodale sono interessati più linfonodi.

La dissezione del compartimento centrale del collo (VI livello) deve essere eseguita in tutti i casi di carcinoma papillifero con coinvolgimento clinico del compartimento centrale o laterale. Lo svuotamento delle catene latero-cervicali deve essere, invece, eseguito quando vi sia un ovvio coinvolgimento (figura 15).

Quando si rende necessaria l'asportazione delle metastasi linfonodali, è preferibile l'exeresi di tutta la catena piuttosto che l'asportazione mirata dei linfonodi chiaramente metastatici (node picking) (58, 59, 60).

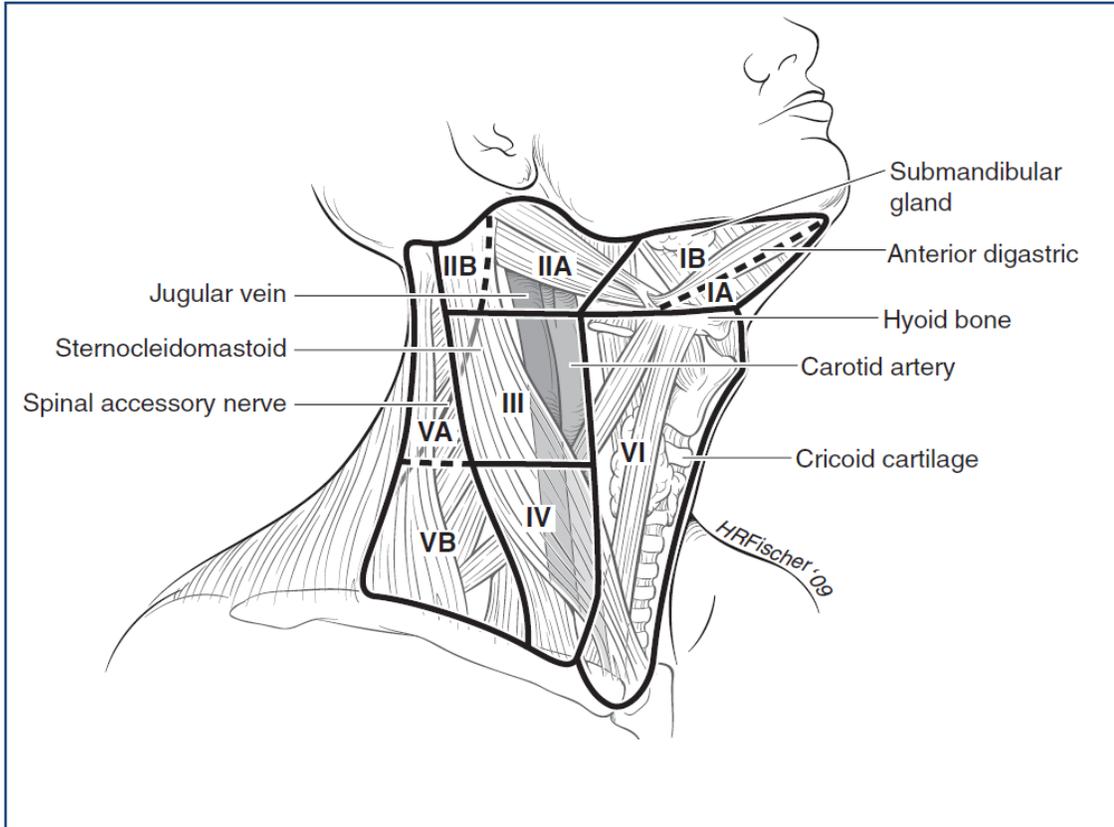


Figura 15- Compartimenti linfonodali del collo (rif. 58)

Terapia radiometabolica

Le cellule follicolari della tiroide hanno la peculiare proprietà di captare ed organificare lo iodio per la sintesi ormonale. Questa proprietà è conservata anche in una significativa proporzione di cellule tiroidee neoplastiche. In base a questo razionale la terapia con I^{131} è divenuta parte integrante del trattamento del carcinoma tiroideo differenziato. Lo schema terapeutico ablativo prevede l'utilizzazione dello iodio radioattivo 4-6 settimane dopo la tiroidectomia, senza che il paziente abbia intrapreso la terapia ormonale. E' importante, infatti, che al momento della terapia i livelli di TSH circolante siano superiori a 30 mU/L. Dal 2005 in Europa (nel 2007 negli Stati Uniti) è stato approvato l'uso del rhTSH per l'ablazione del tessuto tiroideo post-chirurgico.

L'ablazione del tessuto tiroideo residuo si ottiene utilizzando una dose radiante di almeno 300 Gy, per cui si ricorre generalmente a dosi di Iodio131 comprese tra 30 e 100 mCi.

A distanza di 2-10 giorni dalla dose terapeutica si esegue una scintigrafia corporea totale, mentre la terapia soppressiva con L-Tiroxina può essere intrapresa 24 ore dopo la seconda.

L'efficacia della terapia ablativa viene verificata a distanza di 6-12 mesi mediante una scintigrafia total body di controllo.

L'ablazione post-chirurgica del residuo tiroideo con I^{131} presenta numerosi vantaggi, come la diminuzione della frequenza di recidive e di mortalità, l'eradicazione di foci microscopici di tumore all'interno del residuo, la scoperta precoce di recidive e di metastasi locali o a distanza. L'ablazione del residuo, infatti, rende più attendibile il dosaggio della Tg circolante nel follow-up, poiché qualsiasi livello di Tg dosabile dopo ablazione può essere imputato alla presenza di tessuto metastatico, mentre in presenza di residuo non si

può dirimere il dubbio tra produzione da parte di tessuto tiroideo sano o neoplastico. Anche la sensibilità della scintigrafia corporea con I^{131} risulta più elevata dopo ablazione del residuo tiroideo, in quanto la dose di radio-iodio somministrata permette di eseguire una scintigrafia totale corporea post-dose che risulta più informativa di quelle realizzate con le comuni dosi diagnostiche (61, 62, 63).

CAPITOLO 3

IL CARCINOMA TIROIDEO ANAPLASTICO

Nell'ambito dei carcinomi tiroidei, un discorso a parte merita il carcinoma tiroideo anaplastico.

Il carcinoma anaplastico è un tumore indifferenziato dell'epitelio follicolare della tiroide (ATC, anaplastic thyroid cancer); è uno dei tumori solidi più aggressivi, presentando una sopravvivenza mediana di 3-5 mesi dalla diagnosi (64).

La percentuale di sopravvivenza ad 1 anno e a 10 anni dalla diagnosi è stimata sul 10-20% e sul 5% rispettivamente.

Sebbene meno dell' 1-3% di tutti i carcinomi tiroidei siano anaplastici, questa forma contribuisce al 15-50% della mortalità annua associata al tumore tiroideo.

Recenti progressi nella comprensione della patogenesi genetica e molecolare dei carcinomi tiroidei lasciano intravedere speranze per nuove prospettive terapeutiche anche per ATC.

Ci sono diversi trials clinici sugli inibitori delle tirosin-chinasi, su agenti anti-angiogenici ed agenti regolanti la vascolarizzazione che potrebbero rappresentare nuove opzioni terapeutiche per combattere questo tipo di carcinoma.

ATC interessa principalmente pazienti anziani. Secondo il database del SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) l'incidenza di ATC è stimata tra 1 e 2 casi all'anno per milione di abitante; il trend è in diminuzione dato che vengono diagnosticate maggiormente le forme di carcinoma tiroideo differenziato. Risulta inoltre più diffuso nelle zone iodocarenti.

La maggior parte dei pazienti ha una storia pregressa di gozzo multinodulare; nella maggior parte dei casi, infatti, ATC rappresenta lo stadio terminale del processo di dedifferenziamento di un carcinoma follicolare o papillare preesistente.

Le cellule anaplastiche non producono tireoglobulina, non sono in grado di trasportare lo iodio e non esprimono il recettore dell'ormone tireotropo (figura 16).

Il sintomo di presentazione più comune è un rapido ingrandimento di una tumefazione del collo con marcata disfagia e cambiamento del tono della voce.

Al momento della diagnosi, dal 20 al 50% dei pazienti ha già metastasi a distanza, più frequentemente al polmone (80%), poi all'osso (6- 16%), al cervello (5-13%) e al fegato.

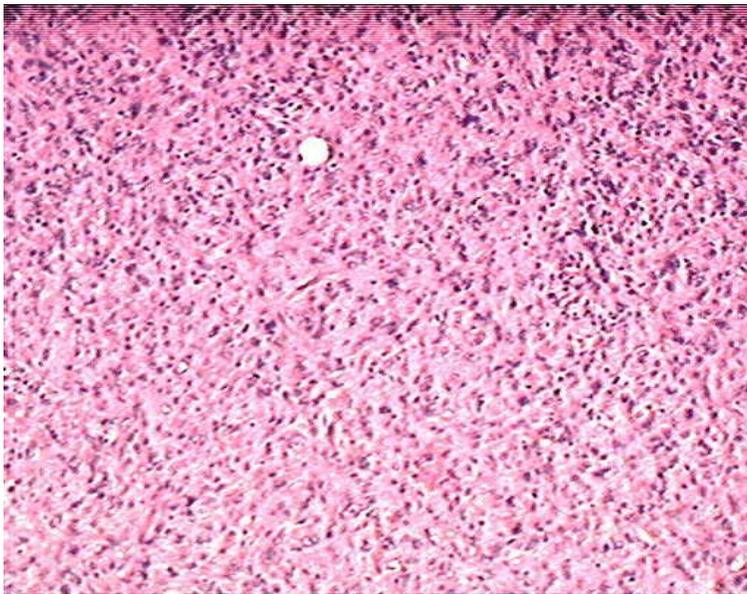


Figura 16- Carcinoma anaplastico (200X)

Approccio terapeutico classico

I pazienti con ATC anche in assenza di metastasi sono considerati affetti da una patologia tumorale sistemica al momento della diagnosi.

Tutti gli ATC sono considerati, infatti, stadio IV dalla UICC (International Union Against Cancer —TNM staging) e dalla AJCC (American Joint Commission on Cancer system).

Generalmente viene raccomandato il trattamento chirurgico, laddove possibile, combinato con la terapia radiante e la chemioterapia.

La causa più comune di morte è l'invasione delle strutture vitali nel collo. Di conseguenza l'obiettivo è quanto meno quello di raggiungere un buon controllo locale della malattia.

La radioterapia da sola o in combinazione con la chirurgia conferisce un effetto palliativo a breve termine.

Non c'è consenso sulla sequenza temporale di chirurgia e radioterapia.

Terapia radiante

La radioterapia non altera il corso di ATC nella maggior parte dei pazienti.

La terapia intensiva modulata (IMRT- Intensity-modulated radiation therapy) è il classico schema utilizzato nelle maggior parte dei casi di ATC; dosi elevate di radiazioni possono essere somministrate con tecniche di iperfrazionamento. Le complicanze più frequenti sono faringo-esofagiti, tracheiti e mielopatia.

Chemioterapia

ATC è in genere resistente ai comuni chemioterapici.

Doxorubicina e Paclitaxel sono i farmaci usati più comunemente.

Il controllo locoregionale è significativamente più alto nei pazienti che vengono sottoposti a resezione chirurgica più chemio- e radioterapia.

In uno studio condotto dal 1997 al 2007, 16 pazienti inoperabili sono stati trattati con radioterapia (60 GY) seguita da Doxorubicina (60mg/m²) e da Cisplatino (40 mg/m²) ogni 3 settimane. La percentuale di risposta è stata del 25%. La sopravvivenza media è risultata di 12.33 mesi (22, 28, 64).

CAPITOLO 4

TERAPIE A BERSAGLIO MOLECOLARE

Le conoscenze attualmente più avanzate sulla patogenesi molecolare dei carcinomi tiroidei differenziati e di ATC permettono la sperimentazione di nuove terapie mirate.

Le terapie a bersaglio molecolare sono basate su farmaci in grado di colpire specificamente una molecola o una classe di molecole coinvolte in vie di segnale o in processi cellulari importanti.

Il maggior limite della chemioterapia classica sta nella non specificità del danno, poiché colpisce indistintamente tutte le cellule in attiva replicazione. Nella terapia a bersaglio molecolare si inserisce, invece, un concetto aggiuntivo: l'inibizione funzionale di singole molecole aventi un ruolo cruciale per la sopravvivenza o la proliferazione delle cellule tumorali.

I potenziali bersagli terapeutici sono molteplici: RNA, cromatina (farmaci epigenetici), proteine coinvolte in diverse vie di segnale e vie effettrici della cellula, modulando in questo modo processi quali il ciclo cellulare, il differenziamento, la senescenza o l'angiogenesi.

Negli ultimi anni un interesse crescente è stato rivolto alle proteine regolatrici del ciclo cellulare, da quelle che determinano l'ingresso della cellula in fase G1 e la transizione G1/S al macchinario proteico che dirige la divisione mitotica.

Ad esempio, sono stati realizzati pan-inibitori per le CdK (chinasi ciclina dipendente), la

cui attività è spesso alterata nella cellule tumorali, poiché Cdk2, Cdk3 e Cdk6 spingono la transizione G1/S e Cdk1 induce l'ingresso in mitosi.

Inibendo le prime si previene al replicazione del DNA, mantenendo diploidi le cellule che, non potendo più proliferare, rimangono vitali ma in stato di arresto permanente del ciclo cellulare (G0).

Interferendo con la funzione di Cdk1 si previene, invece, la divisione cellulare (65).

Nella figura 17 sono rappresentate le tre principali strategie di targeting molecolare applicate al processo mitotico.

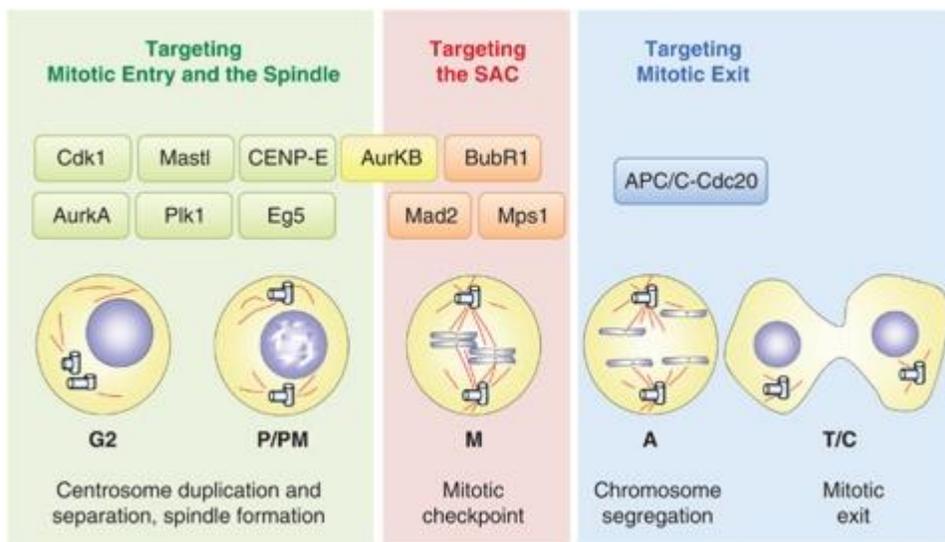


Figura 17- Strategie terapeutiche antineoplastiche basate sul targeting di proteine mitotiche:

- 1) La chinasi Cdk1 è necessaria per l'entrata in fase M e la sua inibizione provoca l'arresto in fase G2. Questo potrebbe richiedere la cooperazione di Mast1, proteina chinasi che inibisce le fosfatasi PP2A, le quali de fosforilano i substrati delle Cdk. L'inibizione di chinasi quali Aurora-A e Plk1 o chinesine (ad esempio eg5), essenziali per la duplicazione e separazione centrosomica e la formazione di un fuso bipolare, causa l'arresto delle cellule in pro metafase;
- 2) L'inibizione di componenti del SAC, quali Mad2, BubR1 o aurora-A, determina un'anomala segregazione cromosomica ed instabilità genomica;

3) *L'inibizione di APC/c e del suo cofattore Cdc20 impedisce lo svolgimento dell'anafase, mentre l'inibizione della E3-ubiquitina ligasi porta ad un blocco in metafase dovuto alla stabilizzazione della ciclina ed infine alla morte delle cellule mitotiche.*

C, citocinesi; P, profase; T, telofase

(Illustrazione tratta da rif. 65)

Per quando riguarda la formazione del fuso mitotico, regolatori fondamentali sono le chinasi mitotiche, come Aurora-A e Plk1, entrambe iperespresse nelle cellule cancerose.

La loro inibizione causa l'arresto della mitosi come conseguenza di un fuso monopolare o aberrante e correla con l'aumento di apoptosi in diverse linee cellulari tumorali (65).

Altre proteine bersaglio hanno un ruolo chiave nelle dinamiche e nella stabilità del fuso mitotico, come ad esempio le proteine motrici chinesine, che svolgono una funzione cruciale nell'assemblaggio del fuso e nella segregazione cromosomica.

Una categoria ulteriore di bersagli molecolari è rappresentata dai componenti del SAC; se la funzionalità del SAC (Spindle Assembly Checkpoint) viene meno si verifica una segregazione cromosomica irregolare e la generazione di cellule aneuploidi.

E' interessante notare che, in paragone a cellule non trasformate, le linee cellulari tumorali sono più suscettibili ad andare incontro ad apoptosi in seguito all'abrogazione del SAC. Si ipotizza che, in conseguenza della presenza di cromosomi extra, le cellule tumorali possano impiegare più tempo per allineare i cromosomi sulla piastra metafisica e ciò potrebbe renderle più prone ad errori nella segregazione cromosomica e dunque più sensibili all'abrogazione del checkpoint.

Fra le componenti del SAC si può annoverare Aurora-B. L'inibizione genetica o chimica di Aurora-B risulta nella generazione di cellule tetraploidi con vitalità ridotta, suggerendo la sua rilevanza come target farmacologico (65).

Indipendentemente dai bersagli e dai meccanismi d'azione, i farmaci antimitotici interferiscono con la proliferazione senza colpire sensibilmente le cellule quiescenti. Tuttavia, pur rappresentando in prospettiva una delle strategie terapeutiche di maggiore impatto clinico, ad oggi tali farmaci risentono ancora di importanti limiti. Tra questi vi è indubbiamente il fatto che una terapia incentrata su un bersaglio specifico potrebbe fallire a causa della natura poligenica della patologia. Nei tumori si riscontrano spesso alterazioni a carico di più proteine appartenenti a classi funzionali diverse che concorrono al fenotipo tumorale attraverso vie biochimiche indipendenti, per cui l'inibizione di una sola proteina potrebbe risultare insufficiente. In alternativa, potrebbe verificarsi nelle cellule cancerose l'attivazione di meccanismi di deviazione dalla via biochimica soppressa tali da bypassare l'azione farmacologica. D'altra parte, quando anche il farmaco fosse efficace nel bloccare la proliferazione cellulare, l'effetto potrebbe essere citostatico ma non citotossico, sicché la progressione tumorale sarebbe arrestata solo temporaneamente e nel tempo l'instabilità genetica delle cellule maligne potrebbe portarle allo sviluppo di una resistenza. Per inibire più proteine contemporaneamente o per contrastare i meccanismi di resistenza si dovrebbe disporre di una combinazione terapeutica di più farmaci, il che però comporterebbe problemi di carattere pratico ed economico. Per realizzare un solo farmaco a bersaglio molecolare occorrono tra i 12 e i 15 anni, con costi molto elevati e un altrettanto elevato rischio di fallimento, soprattutto nel passaggio dalla fase II alla fase III dei trials clinici.

Appare quindi ovvia la necessità di implementare notevolmente le ricerche al fine di approfondire le conoscenze dei meccanismi d'azione dei farmaci antimitotici, nonché di colmare le lacune esistenti tra i promettenti risultati preclinici e le effettive possibilità di applicazione clinica.

Nell'ambito di queste promettenti strategie terapeutiche si collocano (64):

- a) *gli inibitori delle tirosin-chinasi*
- b) *gli inibitori dell'angiogenesi*
- c) *gli inibitori delle Aurora Chinasi*

a) Tra i primi si collocano **Imatinib** (Gleevac ®) e **Sorafenib** (Nexavar ®).

L' Imatinib è un inibitore selettivo della tirosin-chinasi della proteina di fusione Bcr-Abl; tale farmaco trova largo impiego nella leucemia mieloide cronica.

Ha mostrato efficacia in vitro su linee cellulari di carcinoma tiroideo anaplastico.

Sorafenib è un nuovo inibitore di tirosin-chinasi che agisce sulla raf-1 serin/threonin chinasi.

Sorafenib svolge anche un'azione anti-angiogenica, bloccando il recettore tirosin-chinasico del VEGFR2 (tyrosine kinases to the vascular endothelial growth factor receptor 2) e del PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor β) (64).

b) Tra i farmaci regolatori dell'angiogenesi si colloca **Axitinib** (AG-013736), inibitore selettivo del VEGFRs 1, 2, e 3; studi recenti hanno mostrato che blocca l'angiogenesi ed il flusso sanguigno tumorale in modelli preclinici.

Fosbretabulin è un altro agente farmacologico derivante da un arbusto africano, *Combretum caffrum*. E' un nuovo farmaco che lega la tubulina delle cellule endoteliali, agendo nella regolazione della vascolarizzazione; si differenzia dagli altri farmaci perchè mostra un'azione tossica potente e selettiva verso la vascolarizzazione del tessuto tumorale.

Il farmaco si lega alla tubulina, inibendo così l'assemblaggio dei microtubuli e destabilizzando il citoscheletro delle cellule endoteliali. Fosbretabulin ha anche mostrato di agire in sinergia con la terapia radiante e con diversi farmaci chemioterapici. In uno studio in fase II su 26 pazienti con **ATC**, questo farmaco è stato ben tollerato; la sopravvivenza mediana è stata di 4.7 mesi, con il 34% ed il 23% dei pazienti vivi a 6 e a 12 mesi rispettivamente (64).

c) I principali inibitori delle chinasi Aurora utilizzati sono (66):

1. **VX-680**, in grado di inibire tutte e tre le chinasi;
2. AZD1152 e l'*esperandina* che inibiscono selettivamente l'Aurora-B;
3. **MLN8054**, inibitore selettivo di Aurora-A;
4. **ZM447439** attivo su Aurora-A e Aurora-B ed oggetto del presente lavoro di tesi.

Tali farmaci hanno un meccanismo d'azione comune, agendo come inibitori competitivi dell'ATP.

Sono stati descritti diversi effetti degli inibitori di chinasi Aurora su linee cellulari derivanti da molteplici tipi di tumore.

In particolare, l'inibizione selettiva di Aurora-A determina arresto del ciclo cellulare in G2/M, fusi mitotici aberranti, formazione di cellule tetraploidi e apoptosi.

L'inibizione selettiva di Aurora-B provoca inattivazione del checkpoint mitotico, inibizione della citocinesi e generazione di cellule tetraploidi o poliploidi (66) (Figura 18).

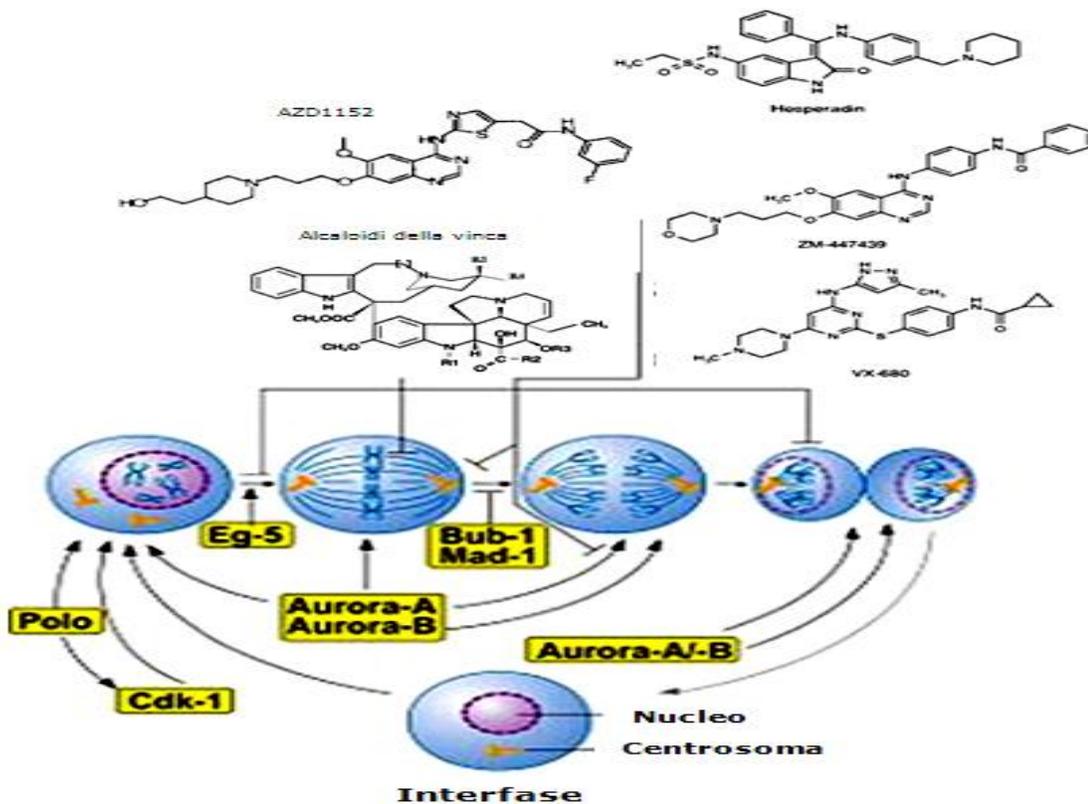


Figura 18- Principali farmaci inibitori delle chinasi Aurora

1) **VX680** (MK0457) è una piccola molecola sintetica capace di inibire tutte e tre le chinasi Aurora con un'elevata potenza di inibizione, che risulta essere maggiore per Aurora-A (KI: 0.6 nM) rispetto ad Aurora-B (KI:18 nM) e ad Aurora-C (KI: 4.6 nM). Questo farmaco ha una struttura a forma di Y composta da un gruppo N-metil-piperazinico che costituisce la base o "gamba" della Y, un gruppo pirimidinico alla biforcazione, un gruppo metilpirazolico che rappresenta un braccio fenilico sostituito che va a formare l'altro braccio. Questo farmaco è capace di agire sulla funzione della chinasi Aurora legandosi al loro sito attivo e occupando il sito di legame dell'ATP.

Nonostante l'elevata omologia tra Aurora-A, -B e -C, i loro siti attivi presentano delle differenze nei residui che li compongono e tale variabilità sta alla base delle diverse efficienze d'inibizione dell'MK0457 per le tre chinasi.

L'inibizione farmacologica di Aurora-A porta alla formazione di fusi anormali che sono chiaramente osservabili in cellule che hanno un check-point del fuso mitotico funzionale e quindi si arrestano in metafase. Tuttavia in presenza di un farmaco in grado di inibire sia Aurora-A che -B, i fusi anormali possono non risultare visibili in quanto, in assenza dell'attività di Aurora-B, non si attiva il check-point mitotico. In tal modo proseguirà la mitosi nonostante la formazione di fusi anormali fino alla citocinesi, che tuttavia non viene completata a causa dell'inattivazione di Aurora-B. Ciò comporta la formazione di un fenotipo poliploide simile a quello osservato dopo trattamento con RNA-interference specifico per Aurora-B (67)

Tale farmaco ha un effetto anti-proliferativo ed induce regressione tumorale anche in modelli animali ed è attualmente in via di sperimentazione nell'uomo.

La fase clinica I, effettuata su pazienti affetti da alcuni tipi di tumori cellulari particolarmente difficili da trattare come la leucemia, linfoma e cancro del colon-retto, ha evidenziato che il trattamento con VX680 era ben tollerato e non mostrava segni importanti di tossicità. Si è dimostrato inoltre che questo inibitore risulta capace non solo di provocare un arresto della proliferazione cellulare, ma anche di attivare il processo di morte programmata in vivo (67).

Lo studio di D'Armiento et al è il **primo** lavoro che correla attività di **VX-680 e carcinoma tiroideo anaplastico**. Questo lavoro ha dimostrato che tale farmaco inibisce in maniera significativa la proliferazione in linee cellulari derivanti da ATC (68).

2) *L'Esperandina* è un inibitore selettivo di Aurora-B; non è stato possibile svilupparlo come farmaco, non avendo superato la prima fase dei trials clinici.

3) *MLN8054*, è un inibitore di Aurora-A.

Uno studio del 2011 (69) ha dimostrato che MLN8054 inibisce la proliferazione cellulare in linee cellulari di ATC; inoltre aumenta il numero di cellule in apoptosi, riduce la fosforilazione dell'istone H3 ed induce l'arresto del ciclo cellulare.

4) Studi effettuati con *l'inibitore ZM447439* (70) su cellule somatiche in coltura hanno evidenziato che il farmaco non impedisce l'entrata delle cellule in mitosi; tuttavia, esso determina la disorganizzazione del fuso, la morfologia aberrante e il non corretto allineamento dei cromosomi ed il *blocco del processo di citocinesi*. Inoltre, malgrado la presenza di cromosomi non allineati, sono state riscontrate la perdita di coesione dei

cromatidi fratelli e la degradazione della ciclina B, indicativa dell'inizio dell'anafase, a dimostrazione del fatto che *ZM447439* è in grado di compromettere il *check-point mitotico*.

E' stato dimostrato l'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico di *ZM447439* sui tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NETs) (71) e sui tumori della cervice uterina (72).

Non vi è ancora nessuno studio sull'effetto di *ZM447439* su linee cellulari derivanti da carcinomi tiroidei.

Attualmente tali inibitori sono anche studiati in combinazione con agenti che interferiscono con la funzionalità del fuso mitotico, come i taxani. I dati preclinici suggeriscono una sinergia tra gli inibitori delle chinasi Aurora e daunorubicina, SN-38, vinorelbina, gemcitabina, docetaxel, oxaliplatino in associazione con 5-fluorouracile.

Restano comunque da chiarire alcuni aspetti collaterali all'inibizione delle Aurora, come ad esempio gli effetti su altre chinasi e la loro efficacia in relazione allo stato del gene p53, spesso mutato nei tumori, anche in considerazione dell'interazione tra la proteina p53 e Aurora-A. D'altro canto, studi recenti hanno indicato che gli inibitori delle chinasi Aurora possono attivare l'apoptosi tramite una via di segnale innescata dalla proteina p73 e quindi indipendentemente dallo stato di p53.

CAPITOLO 5

SCOPO DELLA TESI

Le Aurora chinasi giocano un ruolo cruciale in molteplici passaggi della divisione cellulare, in quanto partecipano al ciclo del centrosoma, alla citocinesi, al corretto assemblaggio e alla stabilità del fuso mitotico.

Alterazioni della loro espressione e/o attività si associano alla progressione di diversi tipi di tumori, fra i quali i carcinomi tiroidei. In particolare, in questi ultimi, la maggiore espressione delle chinasi Aurora è stata riscontrata in cellule derivate dal carcinoma tiroideo anaplastico (ATC).

E'quindi ragionevole ritenere che un approccio terapeutico basato sul targeting molecolare delle chinasi Aurora potrebbe risultare efficace nel contrastare la progressione del carcinoma anaplastico della tiroide (ATC), tumore non responsivo ai chemioterapici attualmente in uso.

La ricerca illustrata in questa tesi si colloca nell'ambito degli studi preclinici sull'efficacia antitumorale degli inibitori funzionali delle Aurora chinasi.

Non vi è ancora alcuno studio sull'effetto del farmaco denominato ZM447439 su linee cellulari derivanti da carcinomi tiroidei; per cui lo scopo della tesi è quello di valutare gli effetti di ZM447439 su linee cellulari derivanti da carcinoma anaplastico della tiroide.

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

1. Linee e colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su quattro linee cellulari umane derivate da carcinoma anaplastico della tiroide: CAL-62, 8305C, 8505C E BHT-101, acquistate presso la DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germania). Le linee 8305C e 8505C sono state coltivate in medium RPMI contenete FBS (fetal bovine serum) al 10%, la linea CAL-62 è stata coltivata in DMEM con FBS al 10% e la linea BHT-101 è stat coltivata in DMEM con FBS al 20%. A tutti i terreni è stata aggiunta L-glutammina 2 mM. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C e 5% Co₂ in atmosfera satura di umidità.

2. Inibitore di Aurora chinasi

Il composto utilizzato nello studio è un inibitore funzionale delle chinasi Aurora, il cui meccanismo d'azione consiste nella competizione con l'ATP per il sito di legame sulla chinasi.

ZM447439 è un inibitore di Aurora-A e di Aurora-B con IC₅₀ = 110 nM e IC₅₀ = 130 nM, rispettivamente. Il composto è stato acquistato dalla Selleck Chemicals (Houston, USA) sotto forma di polvere disciolta in DMSO (dimetilsolfossido) per avere una soluzione stock

alla concentrazione 10 mM, ali quotata e conservata a -20° C.

3. Saggi di proliferazione cellulare

Per testare l'effetto dell'inibitore su ciascuna linea cellulare sono stati allestiti saggi di proliferazione dose-risposta e tempo-risposta.

Gli esperimenti dose-risposta sono stati realizzati in piastre da 96 pozzetti, ponendo 2000 cellule per pozzetto e trattandole con concentrazioni crescenti della sostanza (0.05-50 μ M). Ai controlli è stato aggiunto un volume di diluente (DMSO) pari a quello della concentrazione del farmaco testato. Dopo 2 giorni di incubazione il terreno di coltura è stato sostituito con terreno nuovo preparato a fresco col farmaco e l'incubazione è stata protratta per un tempo complessivo di 4 giorni. Infine, la proliferazione è stata valutata con un saggio immunoenzimatico ELISA che rileva l'incorporazione di 5-bromo-2'-deossiuridina (Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric, Roche Applied Science) tramite la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza del campione.

Analogamente, per gli esperimenti tempo-risposta le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1000 cellule/pozzetto) e trattate con la dose minima di farmaco avente l'effetto inibitorio massimale sulla proliferazione (10 μ M) o con un egual volume di DMSO (tabella 3).

	CAL-62	8505C	8305C	BHT-101
ZM447439	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M

Tabella 3- concentrazione dell'inibitore usato per ciascuna linea cellulare nei saggi di proliferazione tempo-risposta e negli esperimenti di immunofluorescenza, Western Blot, video microscopia in time-lapse, citofluorimetria e crescita in soft-agar.

L'incubazione è stata attuata per un tempo complessivo di 6 giorni; ogni 2 giorni il terreno di coltura è stato sostituito con terreno nuovo preparato a fresco col farmaco e le letture sono state eseguite nei giorni 1,2,4, 6 secondo la metodica sopra descritta.

4. Videomicroscopia in *time-lapse*

Le diverse linee cellulari sono state coltivate in piastre di Petri con diametro di 3.5 cm. Raggiunta una confluenza del 50% le colture sono state trattate con terreno fresco contenente il farmaco alla concentrazione di 10 μ M o con egual volume di DMSO nei controlli e trasferite all'interno di una camera di incubazione in vetro posta su un microscopio Leica DM-IRBE. Le cellule sono state fotografate ad intervalli di 5 minuti per un tempo complessivo di 24 ore con una fotocamera digitale Moticam 2500 applicata all'oculare.

5. Immunofluorescenza

Le cellule sono state piastrate su vetrini copri-oggetto (25000 cellule per vetrino) e trattate per 6 ore con ZM447439 10 μ M o con DMSO in egual volume nei controlli. Al termine dell' incubazione le cellule sono state fissate con metanolo freddo 100% per 10 minuti a -20°C , poi lavate con PBS (phosphate buffered saline). I siti di legame aspecifici per gli anticorpi sono stati saturati mediante incubazione con una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) al 3% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Quindi le cellule sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi primari: anti- Aurora-A (rabbit, polyclonal 1:1000) ed anti-Aurora-B AIM-1 (rabbit, polyclonal 1:1000) (Abcam, Cambridge, UK), anti fosfo-istone H3 (Ser10) (mouse, monoclonal 1:2000) (Millipore, Temecula, CA, USA), anti- β -tubulina (rabbit, polyclonal 1:2000) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), anti-fosfo-Aurora-A(Thr288)/Aurora-B(Thr232)/Aurora-C(Thr198) (rabbit, polyclonal 1:50) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). In seguito i vetrini sono stati lavati in PBS e posti in incubazione per 1 ora con gli opportuni anticorpi secondari coniugati con TRITC (tetrametilrodamina isotiocianato) (1:2000) (Rhodamine TRITC- conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG e Rhodamine TRITC- conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). Dopo i lavaggi finali in PBS, i vetrini sono stati posti su vetrini copri-oggetto con il liquido di montaggio Vectashield® contenente 1 $\mu\text{g/ml}$ di DAPI (4,6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, Vector Laboratoires, Burlingame, CA). Tutti i vetrini sono stati osservati e fotografati con un microscopio Leica-DMRXA equipaggiato con fotocamera digitale CCD Motic 285.

6. Analisi della crescita cellulare ancoraggio-indipendente

In via preliminare, piastre di Petri di diametro 3.5 cm sono state preparate colandovi 3 ml di terreno di coltura contenente agar 0.4%, lasciato poi solidificare in ambiente sterile. Le cellule, coltivate in condizioni standard, sono state staccate con tripsina-EDTA 0.25% in PBS, contate e risospese in terreno fresco alla densità di 75.000 cellule/ml. Tali sospensioni sono state miscelate in rapporto 1:2 vol/vol con terreno di coltura contenente agar 0.4% e le sospensioni risultanti sono state suddivise in due aliquote: ad una è stato aggiunto il farmaco alla concentrazione di 10 μM , all'altra un egual volume di DMSO. Successivamente, 1 ml di ciascuna miscela è stato versato su una piastra di Petri contenente il terreno solido. Le colture sono state osservate al microscopio dopo qualche ora per escludere la presenza di aggregati cellulari, incubate a 37°C e al 5% di CO_2 in atmosfera umidificata e fotografate dopo 2 settimane. La grandezza delle colonie è stata misurata con il software MetaVue (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA) e sono state conteggiate quelle più larghe di 50 μm di diametro.

7. Western blot

Le cellule sono state coltivate in monostrato aderente e trattate per 6 ore con ZM447439 10 μM o con DMSO in egual volume. Dopodichè le cellule sono state lavate con PBS e staccate utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA 0.25% in PBS, centrifugate a 1200 r.p.m. per 5 minuti, lavate in PBS e nuovamente centrifugate. Una volta rimosso il supernatante, le cellule sono state lisate in tampone RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, NP40 1%, pH 7.4), a cui è stato aggiunto un mix di inibitori di proteasi e

fosfatasi. I campioni sono stati posti in ghiaccio per 30 minuti e, successivamente, centrifugati a 15000 g per 15 minuti a 4°C. I surnatanti, contenenti le proteine cellulari, sono stati raccolti e dosati mediante il metodo Bradford, utilizzando come riferimento una curva standard realizzata con concentrazioni note di una soluzione stock di BSA 1 µg/µl.

I campioni sono stati preparati con 50 µg di estratti proteici cellulari a cui è stato aggiunto il tampone Laemmli riducente (soluzione 5x: Tris-HCl 120 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 10%, blu di bromo fenolo 0.01%, β-mercaptoetanololo 5%) e Tris-HCl 50 mM pH 6.8 per uniformare i volumi. Le miscele ottenute sono state riscaldate a 94°C per 5 minuti e poi caricate su un gel al 10% di poliacrilammide, unitamente ad un marker di pesi molecolari (Precision Protein Standard TM Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le proteine sono state separate per elettroforesi in un tampone Tris-glicina contenente SDS 0.1% e poi trasferite su membrane di nitrocellulosa tramite elettroforesi in tampone Tris-glicina privo di SDS e contenente etanolo al 20%.

Le membrane sono state saturate con latte non grasso 5% in tampone TBS-T (Tris buffered Saline-Tween 20) o con BSA 5% in TBS-T per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione costante. Quindi le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari in soluzione di latte non grasso al 2.5% in TBS-T o BSA al 5% in TBS-T, per tutta la notte a 4°C, in agitazione costante. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti- Aurora-A (rabbit, polyclonal 1:500) ed anti-Aurora-B AIM-1 (rabbit, polyclonal 1:1000) (Abcam, Cambridge, UK), anti fosfo-istone H3 (Ser10) (mouse, monoclonal 1:2000) (Millipore, Temecula, CA, USA), anti-fosfo-Aurora-A(Thr288)/Aurora-B(Thr232)/Aurora-C(Thr198) (rabbit, polyclonal 1:50) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) ed anti-β-

tubulina (rabbit, polyclonal 1:5000) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Successivamente le membrane sono state lavate per 3 volte in TBS-T ed incubate con opportuni anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, Pierce Rockford, IL) in latte non grasso al 2.5% in TBS-T per 2 ore a temperatura ambiente ed in agitazione costante.

Dopo ulteriori lavaggi in TBS, l'immunoreattività è stata rilevata tramite una reazione di chemiluminescenza utilizzando i substrati LiteAbLot PLUS e LiteAbLot EXTEND (Euroclone, Milano, Italia). Le intensità relative delle bande sono state misurate mediante analisi densitometrica, utilizzando il software ImageJ.

8. Citofluorometria

Le diverse linee di ATC sono state coltivate in piastre di Petri per 48 ore con ZM447439 10 μ M o con DMSO in egual volume nei controlli. Quindi le cellule sono state lavate con PBS, staccate con una soluzione di tripsina-EDTA 0.25% in PBS, centrifugate per 5 minuti a 1200 r.p.m., nuovamente lavate con PBS e ricentrifugate. Dopo aver rimosso il liquido di lavaggio, si è proceduto con la fissazione in etanolo freddo al 70% per 1 ora a 4°C. Previa centrifugazione a 2000 r.p.m. per 5 minuti a 4°C, e lavaggio con PBS freddo, le cellule sono state incubate in una soluzione di PBS con RNAsi A 0.1 mg/ml e ioduro di propidio 50 μ g/ml, per 1 ora al buio e a temperatura ambiente, al fine di eliminare l'RNA cellulare e marcare il DNA: infine l'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata con un citofluorometro FACScalibur FlowR cytometere con software CellQUESTR (BD

Bioscience, San Jose, CA, USA).

9. Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come valor medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. I valori sono stati confrontati statisticamente mediante lo Student's t-test e le differenze sono state ritenute significative per valori di $p < 0.05$.

CAPITOLO 7

RISULTATI

1. Effetti di ZM447439 sui saggi di proliferazione dose-risposta e tempo-risposta delle linee cellulari derivate da ATC

Al fine di stabilire se il farmaco oggetto di studio fosse in grado di esercitare un effetto anti-proliferativo sulle cellule in esame, sono stati inizialmente effettuati saggi di proliferazione.

Gli esperimenti **dose-risposta** sono stati realizzati trattando CAL-62, BHT-101, 8305C E 8505C con concentrazioni crescenti della sostanza (0.05-50 μM). Ai controlli è stato aggiunto un volume di diluente (DMSO) pari a quello della concentrazione del farmaco testato. L'incubazione è stata protratta per un tempo complessivo di 4 giorni.

I risultati di questi esperimenti, illustrati nella figura 1, mostrano che ZM447439 è in grado di inibire la proliferazione di tutte le linee cellulari derivate da ATC in modo dose-dipendente con una IC_{50} compresa tra 0.5 μM e 5 μM (figura 18).

Le IC₅₀ calcolate per le singole linee sono illustrate nella seguente tabella:

Linea cellulare	IC ₅₀
CAL-62	0.7 μ M
BHT-101	2.5 μ M
8305C	2.3 μ M
8505C	0.9 μ M

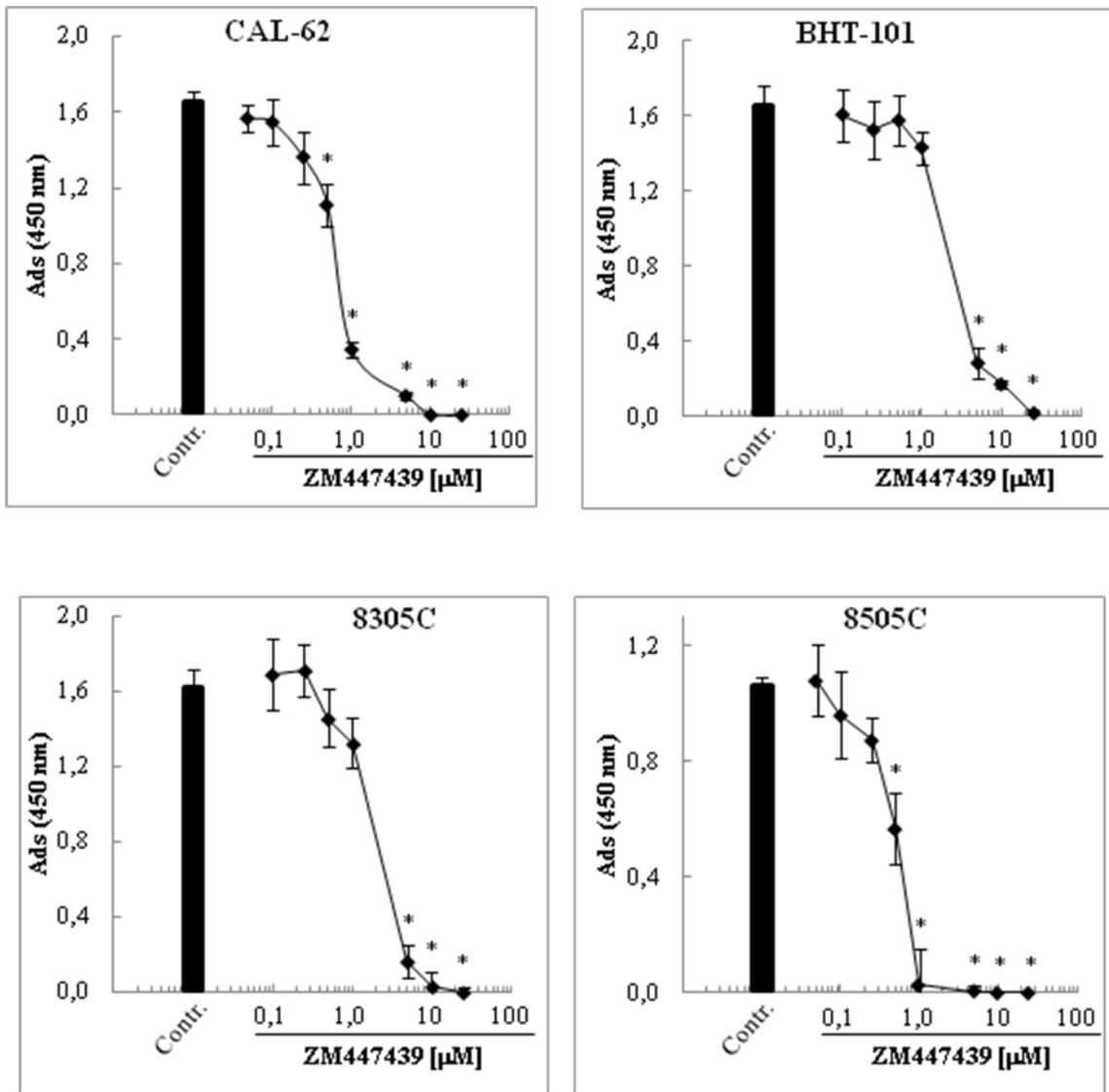


Figura 18- Curve di proliferazione cellulare dose-risposta

*Le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni crescenti di farmaco per 4 giorni. I dati riportati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$.*

In seguito la dose minima sufficiente a produrre l'effetto inibitorio massimale sulla proliferazione è stata utilizzata per testare la rapidità dell'effetto farmacologico mediante saggi di proliferazione **tempo-risposta**.

La figura 19 mostra l'effetto inibitorio tempo-risposta del farmaco. In particolare, **10 μ M di ZM447439 causa una significativa inibizione dell'incorporazione di BrdU già dopo le prime 24 ore in tutte le linee cellulari testate.**

L'effetto anti-proliferativo diviene massimale tra il giorno 4 e il giorno 6 di trattamento, quando l'incorporazione di BrdU risulta ridotta significativamente di più del 90%.

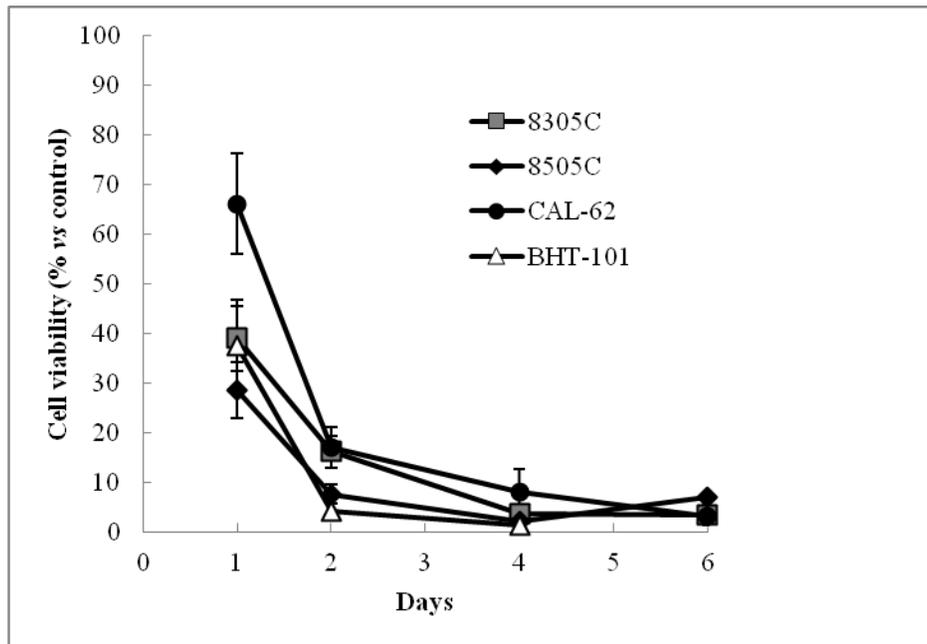


Figura 19- Curve di proliferazione cellulare tempo-risposta

*Le cellule sono state trattate con dosi inibitorie massimali di farmaco per 1,2, 4 e 6 giorni. La proliferazione cellulare è espressa come percentuale rispetto al controllo (100%) ed i dati riportati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$.*

2. Effetti di ZM447439 sulla crescita cellulare ancoraggio-indipendente

In seguito è stata valutata la capacità di ZM447439 di inibire la formazione di colonie in soft agar.

Le cellule sono state messe in coltura con e senza 10 μ M di ZM447439 per 2-3 settimane.

Alla fine dell'incubazione, **il trattamento con il farmaco in esame ha ridotto significativamente il numero e l'area delle colonie in tutte le linee cellulari analizzate** (figura 20A). Nella figura 20B sono riportati i grafici ad istogramma che evidenziano il numero di colonie e l'area media delle colonie per campo ottenuti dagli esperimenti.

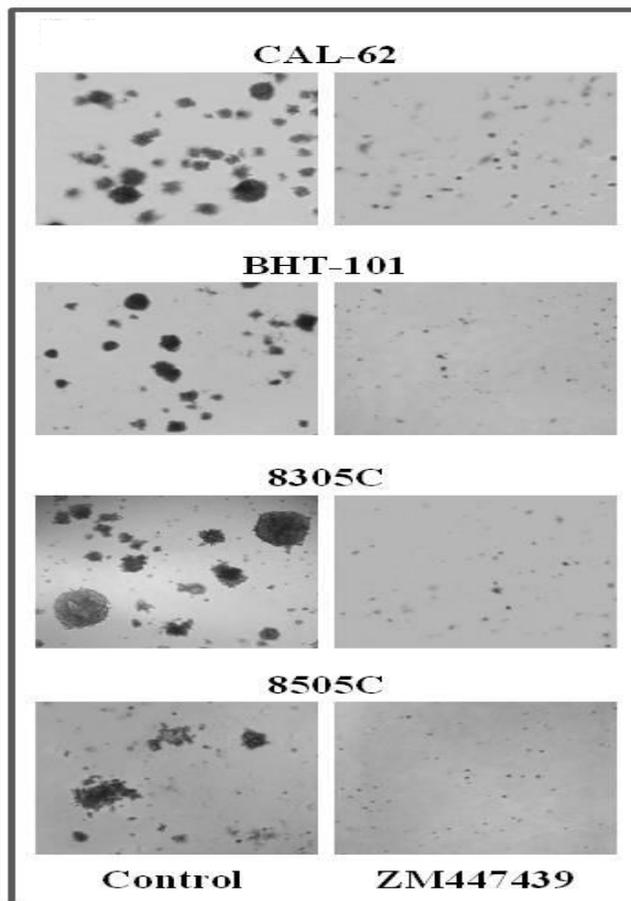


Figura 20A- Foto soft agar

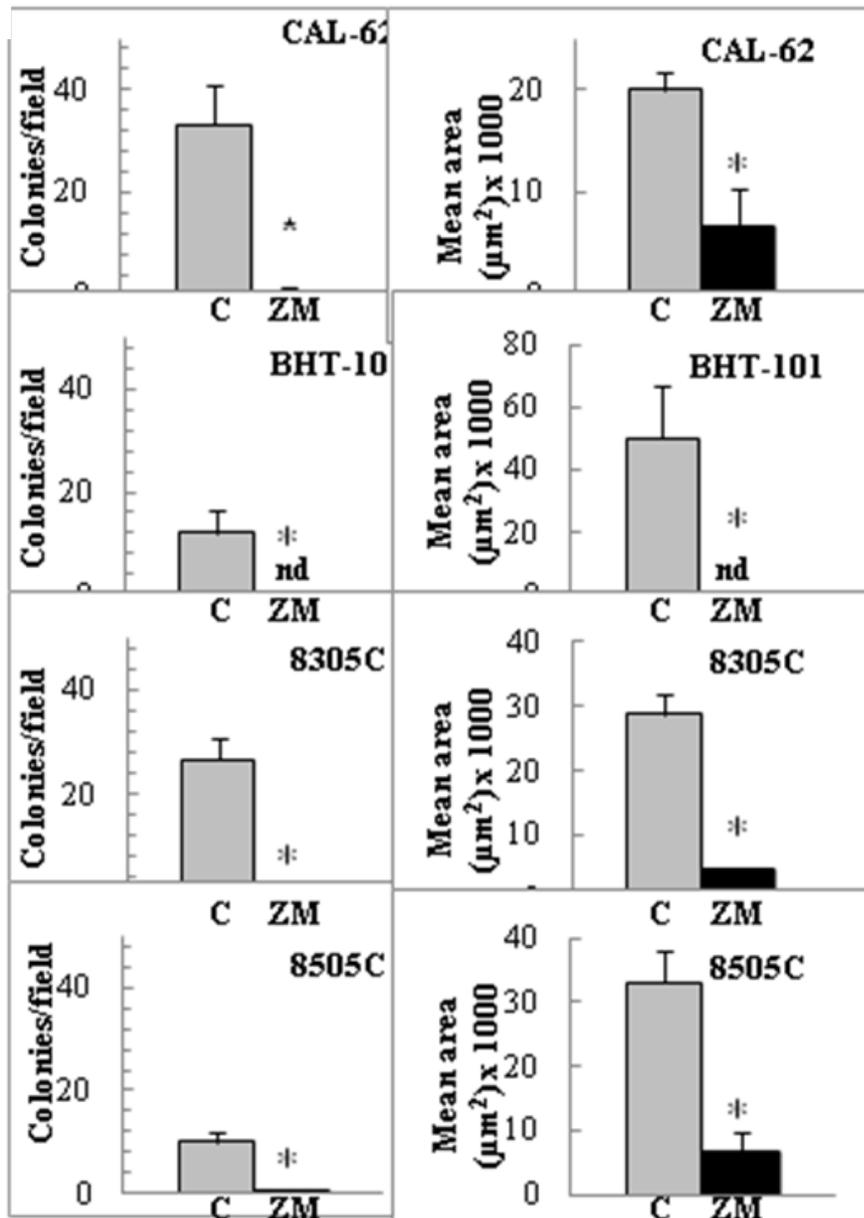


Figura 20B- Istogrammi dei risultati dei test di crescita in soft agar

A sinistra: numero di colonie per campo

A destra: area media delle colonie. I valori indicati in ordinata sono da intendersi nell'ordine delle migliaia

*nd= non rilevabile; *p<0.05*

3. Effetti di ZM447439 sulla ploidia cellulare, sulla progressione del ciclo cellulare e sull'apoptosi

L'inibizione dell'attività delle Aurora chinasi porta alla generazione di cellule poliploidi come risultato di multipli cicli di sintesi del DNA in assenza di citocinesi.

Al fine di osservare in tempo reale l'andamento del ciclo cellulare, le colture trattate col farmaco e quelle di controllo sono state monitorate per 24 ore al microscopio mediante *time-lapse*.

Tutte le linee cellulari mostrano un comportamento simile, rappresentato da CAL-62 nella figura 21.

I risultati mostrano che le cellule di controllo completano i processi mitotici in circa 90 minuti. Al contrario, le cellule trattate sono in grado di entrare in mitosi ma non riescono a completare il processo, riassumendo dopo 135 minuti un aspetto interfaseico senza essersi divise.

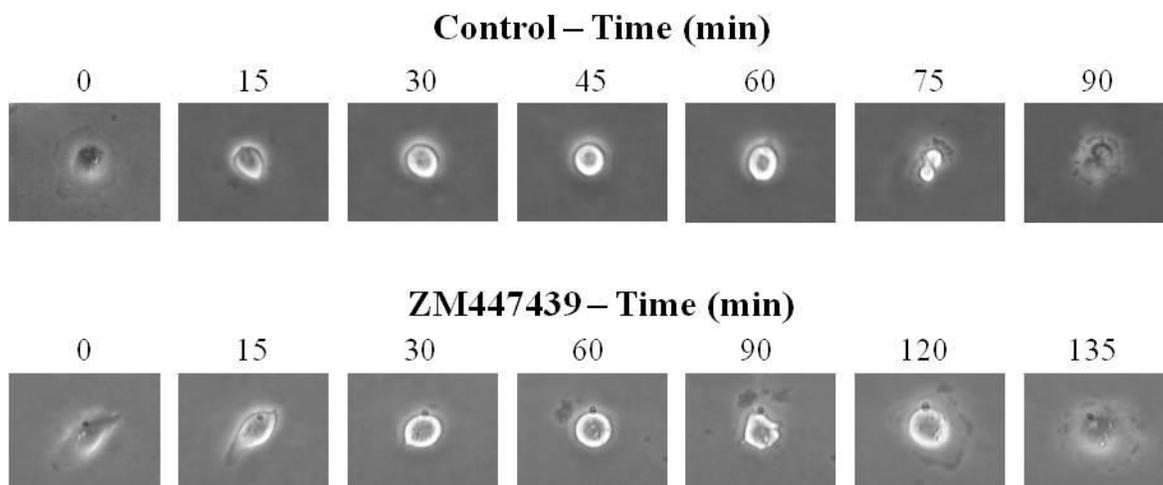


Figura 21- Foto scattate durante gli esperimenti di videomicroscopia in time-lapse

Le foto sono state acquisite ad intervalli di 5 minuti per un tempo complessivo di 24 ore. Dal pannello appare evidente un aumento del tempo trascorso in mitosi e l'assenza di citodieresi nelle cellule trattate col farmaco.

Si può quindi concludere che ZM447436 induce endoduplicazione e conseguente poliploidia nelle cellule di ATC.

L'andamento del ciclo cellulare nelle cellule sottoposte al trattamento farmacologico è stato quindi analizzato per un tempo più prolungato mediante esperimenti di citofluorimetria. Coerentemente coi dati ottenuti dal *time-lapse*, il trattamento con 10 μ M di ZM447436 per 48 ore induce una drastica riduzione della percentuale di cellule in fase G0/G1, con un concomitante accumulo di cellule in fase G2/M.

Ancora più importante, **in tutte le linee cellulari il farmaco causa un aumento considerevole del numero di cellule poliploidi 4N/8N e in 3 linee su 4 porta ad aumento delle cellule in apoptosi (figura 22).**

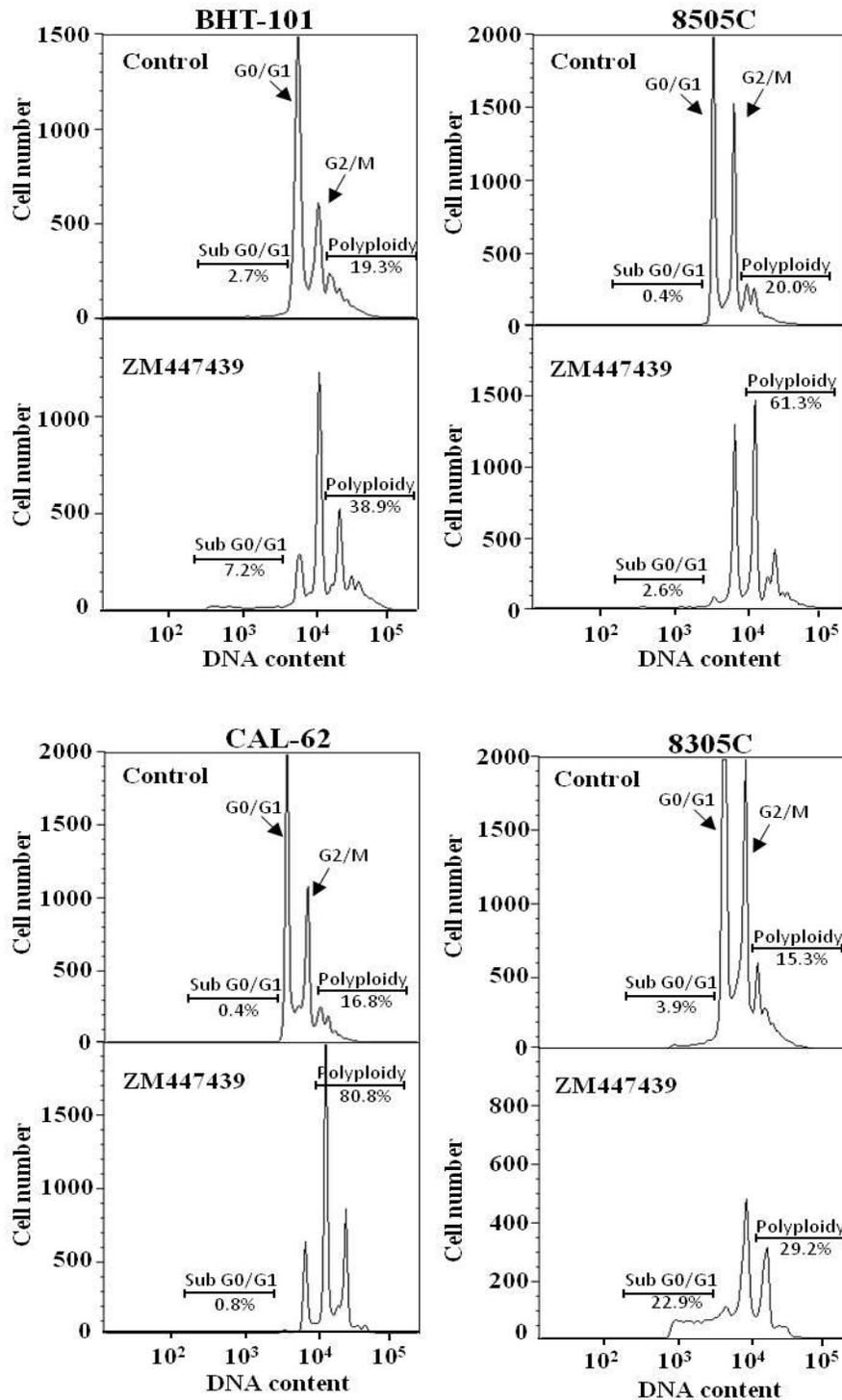


Figura 22- Grafici ottenuti dall'analisi citofluorimetrica sul ciclo cellulare e l'apoptosi

4. Effetti di ZM447439 sull'espressione delle Aurora chinasi, sulla loro attività e sulla localizzazione subcellulare

Per verificare l'effettiva inibizione dell'attività chinasi delle proteine Aurora ed individuare eventuali alterazioni dei livelli delle proteine Aurora a seguito del trattamento farmacologico, tutte le linee cellulari anaplastiche sono state trattate con 10 μ M di ZM447436 o con DMSO per 6 ore; sono poi state estratte le proteine da entrambi i gruppi (trattato e non trattato) ed analizzate in esperimenti di Western Blot.

A tal fine sono stati utilizzati anticorpi in grado di riconoscere le 3 chinasi Aurora indipendentemente dal loro stato di fosforilazione, unitamente ad un anticorpo specifico per i siti di auto-fosforilazione delle 3 chinasi e ad uno specifico per l'istone H3 fosforilato sulla Serina 10, substrato di Aurora-B.

La figura 23 mostra i risultati ottenuti per CAL-62; risultati simili sono stati ottenuti anche per le altre linee cellulari di ATC.

I risultati evidenziano che:

- **non c'è differenza nei livelli proteici di Aurora-A e di Aurora-B tra il controllo e le cellule trattate;**
- **l'autofosforilazione di tutte e 3 le chinasi Aurora è completamente abolita dal farmaco così come la fosforilazione dell'istone H3 sulla Serina 10, causata specificatamente da Aurora-B.**

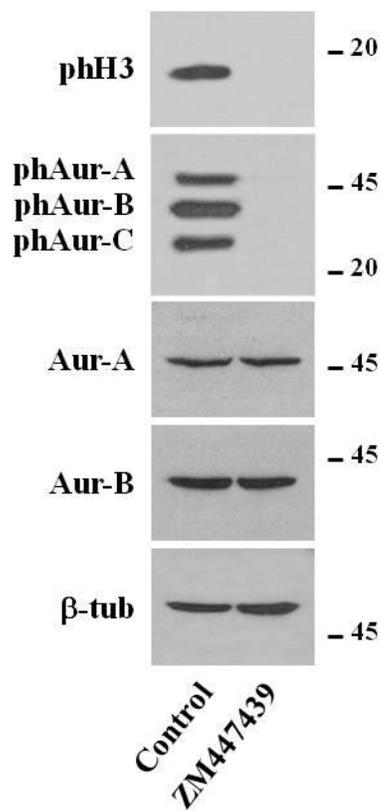


Figura 23- Western Blot sulla linea CAL-62 trattata con 10 μ M di ZM447436

Successivamente si è proceduto ad analizzare gli effetti dell'inibizione funzionale delle Aurora chinasi sulla loro localizzazione cellulare e sulla morfologia delle cellule mitotiche mediante esperimenti di immunofluorescenza.

A tal fine sono stati utilizzati gli stessi anticorpi impiegati negli esperimenti di Western blot.

Per valutare un'eventuale azione del farmaco sulla localizzazione delle 3 chinasi, sono stati eseguiti degli esperimenti usando anticorpi primari diretti contro le forme NON fosforilate di Aurora-A e di Aurora-B, dai quali è stato possibile verificare la **mancanza di effetti di de-localizzazione**.

I risultati, illustrati in figura 24, hanno mostrato, infatti, che la localizzazione di Aurora-A sul centrosoma è mantenuta nelle cellule trattate con 10 μ M di ZM447436 per 6 ore (figura 24, pannelli A e C), ma l'autofosforilazione di Aurora-A scompare in seguito al trattamento (figura 24, pannelli B e D).

Inoltre, le cellule trattate mostrano fusi multipli (pannello C della figura 24) o fusi bipolari o microtubuli molto corti.

La localizzazione di Aurora-B sulla cromatina condensata durante la profase è mantenuta anche nelle cellule trattate col farmaco (pannelli E e F della figura 24).

Il segnale della forma fosforilata di Aurora-B è visibile solo nel ponte citoplasmatico delle cellule in divisione, presumibilmente per l'accumulo della proteina in una piccola area (dato non mostrato), ma **non si osserva citocinesi nelle cellule trattate**.

In ogni caso, l'inibizione funzionale di Aurora-B risulta evidente dalla perdita, nelle cellule trattate, della fosforilazione dell'istone H3 sulla Serina 10 (pannello F della figura 24).

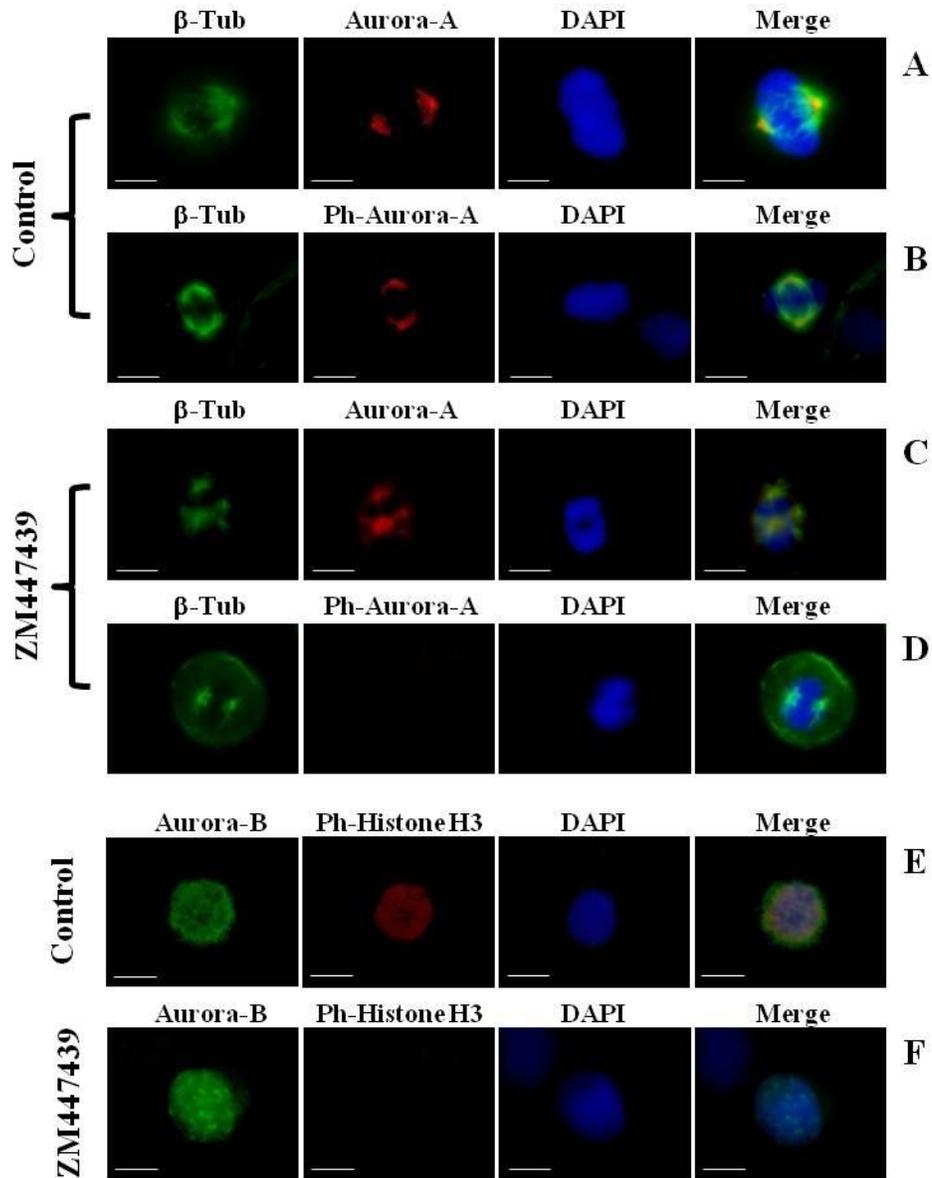


Figura 24- Foto scattate durante gli esperimenti di immunofluorescenza

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni i notevoli avanzamenti nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari fisio-patologici alla base della tumorigenesi hanno portato alla luce il ruolo oncogenico di alcune molecole implicate nella divisione mitotica.

Fra queste si collocano le tre chinasi Aurora-A, -B e -C, una famiglia di serin-treonin chinasi in studio dalla metà negli anni novanta; il dominio catalitico mostra più del 70% di omologia fra le 3 chinasi e contiene un sito di legame per l'ATP ed un residuo di treonina all'interno del loop di attivazione della proteina, che deve essere fosforilato perché la chinasi si attivi.

Questo aspetto è importante perché rappresenta la base del meccanismo d'azione degli inibitori funzionali delle chinasi Aurora (73).

Tali chinasi sono importanti proteine mitotiche, in quanto regolano l'ingresso nella mitosi, il corretto assemblaggio del fuso mitotico, la duplicazione del centrosoma, la segregazione cromosomica e la citocinesi. Una loro disfunzione si associa, pertanto, ad aneuploidia e ad instabilità cromosomica (66).

Le chinasi Aurora risultano iperesprese in diversi tipi di tumore; per cui livelli elevati di tali chinasi possono associarsi a trasformazione neoplastica.

AURKA, il gene codificante per l'**Aurora-A**, è localizzato sulla regione cromosomica 20q13.2-13.3 che risulta amplificata in diversi tipi di neoplasie, come quello della **mammella (BTAK), del colon, della vescica, dell'ovaio e del pancreas** (74, 75, 76).

Gli aumentati livelli di Aurora-A nei tessuti tumorali possono essere dovuti a iperespressione e/o amplificazione genica o anche alla diminuita degradazione della proteina.

L'iperespressione di Aurora-A contribuisce alla tumorigenesi tramite diversi meccanismi:

- fosforilazione eccessiva non solo dei substrati di Aurora-A, ma anche di altre proteine; questo perché in diverse cellule tumorali è stata osservata sia l'espressione costitutiva di Aurora-A nelle varie fasi del ciclo cellulare sia la sua delocalizzazione diffusa nel citoplasma;
- inibizione di BRCA1 (BREast Cancer 1) con conseguente replicazione incontrollata dei centrosomi e ad anomalie della nucleazione dei microtubuli con conseguente compromissione dell'integrità del fuso mitotico;
- aumentata degradazione dell'oncosoppressore p53, definito il "guardiano del genoma" che causa alterazioni a livello dei meccanismi di risposta al danno del DNA (DNA damage checkpoint) dipendenti da p53 e la mancata attivazione dei segnali pro-apoptotici. Nelle cellule normali di mammifero l'innescamento del DNA damage checkpoint inibisce l'attività di Aurora-A e induce l'arresto del ciclo in G2, mentre quando Aurora-A è iperespressa tale checkpoint è neutralizzato. Il DNA damage checkpoint non è però l'unico ad essere silenziato dall'eccesso di Aurora-A: le cellule di mammifero non trasformate, infatti, possiedono il "checkpoint G1 post-mitotico" dipendente da p53 e da Rb, il quale induce l'arresto in G1 se la cellula è

divenuta tetraploide a causa di una mitosi incompiuta. Se Aurora-A è iperespressa la cellula tetraploide non si arresta in G1, proseguendo il ciclo cellulare con un assetto genetico aberrante (75).

- distruzione dell'assemblaggio, tramite l'inibizione del legame tra Cdc20 e BubR1, del complesso del checkpoint mitotico SAC (Spindle Assembly Checkpoint), che, se disfunzionale, porta alla formazione di fusi irregolari;
- inoltre, sia in vitro sia in vivo, è stato dimostrato che l'eccesso di Aurora-A indipendentemente dalla sua attività chinasi causa amplificazione del centrosoma in cellule normali e tumorali, che conduce allo sviluppo di fusi mitotici multipolari e conseguentemente ad una segregazione cromosomica sbilanciata (76).

Aurora-B risulta iperespresso nel cancro *dell'endometrio e in modo particolare nel carcinoma del colon-retto e nell'astrocitoma*, dove elevati livelli della chinasi sono stati correlati con una prognosi peggiore (66).

Il ruolo di Aurora-B nella carcinogenesi è meno chiaro rispetto ad Aurora-A; il ruolo accertato è l'azione sull'istone H3. Di norma, infatti, Aurora-B fosforila l'istone H3 sulla Ser 10, passaggio importante per la condensazione della cromatina. L'iperespressione di Aurora-B porta ad una iperfosforilazione dell'istone H3, la quale, a sua volta, contribuisce all'instabilità cromosomica.

Aurora-C sembra co-localizzare con Aurora-B; la sua espressione, per le conoscenze attuali, è ristretta al testicolo, dove sembra essere coinvolto nella segregazione cromosomica durante la spermatogenesi (77, 78, 79).

Per quanto riguarda in specifico, l'espressione delle Aurora chinasi nei carcinomi tiroidei, il primo studio a dimostrarne l'iperespressione anche in questo tipo di tumori è stato un lavoro eseguito su colture primarie di tireociti umani normali e linee cellulari di carcinomi tiroidei papilliferi, follicolari, scarsamente differenziati e anaplastici (27). Questo studio ha riferito un aumento dell'espressione di Aurora-B nelle cellule tumorali, e maggiormente nelle linee anaplastiche, rispetto ai tireociti normali. Gli Autori hanno inoltre dimostrato che l'inibizione di tale chinasi mediante "RNA interference" e dell'attività chinasi, con un derivato della chinazolina, determinava una diminuzione del 50% della proliferazione delle cellule anaplastiche in vitro e una crescita più lenta del tumore prodotto dalle stesse cellule inoculate in topi immunodeficienti.

Un lavoro successivo (80) ha dimostrato che i tireociti normali esprimono tutte e tre le chinasi Aurora e che la loro espressione è regolata a seconda delle fasi del ciclo cellulare; lo studio ha evidenziato, inoltre, che linee cellulari derivanti da carcinoma tiroideo follicolare, capillifero ed anaplastico (ma non le cellule derivanti da adenoma follicolare) presentano un aumentato livello delle 3 proteine. Lo stesso aumento è stato riscontrato, in esperimenti di RT-PCR, per i livelli di RNAm di Aurora-A e di Aurora-B, non per Aurora-C, suggerendo così che l'espressione di quest'ultimo è regolata da meccanismi post-trascrizionali.

Successivamente un lavoro di microarray e immunocistochemica realizzato su 32 casi di carcinoma tiroideo anaplastico (ATC) identificò l'Aurora-A tra le proteine più frequentemente e più fortemente iperespresse in tali tumori (28).

Per tali ragioni i membri della famiglia delle chinasi Aurora hanno suscitato un grande interesse nel campo delle cosiddette terapie a bersaglio molecolare.

Tali terapie si basano sull'utilizzo di farmaci in grado di agire specificamente su una molecola o una classe di molecole coinvolte in vie di segnale o in processi cellulari importanti.

Nell'ambito di queste promettenti strategie terapeutiche si collocano, oltre che gli inibitori delle tirosin-chinasi e gli inibitori dell'angiogenesi, **gli inibitori delle Aurora chinasi.**

Negli ultimi anni sono state prodotte numerose molecole inibitrici delle Aurora chinasi, che hanno mostrato un'efficacia elevata nell'inibire la crescita di cellule cancerose in coltura e in xenotrapianti tumorali, alcune delle quali sono entrate nelle fasi I e II di sperimentazione clinica.

I principali inibitori delle chinasi Aurora hanno un meccanismo d'azione comune, agendo come inibitori competitivi dell'ATP.

Sono stati descritti diversi effetti degli inibitori di chinasi Aurora su linee cellulari derivanti da molteplici tipi di tumore.

In particolare, l'inibizione selettiva di Aurora-A determina arresto del ciclo cellulare in G2/M, fusi mitotici aberranti, formazione di cellule tetraploidi e apoptosi.

L'inibizione selettiva di Aurora-B provoca inattivazione del checkpoint mitotico, inibizione della citocinesi e generazione di cellule tetraploidi o poliploidi (81).

I principali farmaci inibitori delle chinasi Aurora sono (82): **VX-680**, in grado di inibire tutte e tre le chinasi; **MLN8054**, inibitore selettivo di Aurora-A; **AZD1152** e l'esperandina che inibiscono selettivamente l'Aurora-B; **SNS314**-mesilato, panibitore; **PHA739358**, panibitore; **ZM447439** attivo su Aurora-A e Aurora-B ed oggetto del presente lavoro di

tesi.

Di seguito sono riportati i dati degli ultimi studi solo sugli inibitori delle Aurora chinasi effettuati **in linee cellulari derivate da ATC**, che sono VX680, MLN8054, AZD1152, SNS314-mesilato.

VX680 (MK0457) è una piccola molecola sintetica capace di inibire tutte e tre le chinasi Aurora con un'elevata potenza di inibizione, che risulta essere maggiore per Aurora-A (KI: 0.6 nM) rispetto ad Aurora-B (KI:18 nM) e ad Aurora-C (KI: 4.6 nM).

Un recente studio (68) analizza l'effetto inibitorio di **VX680 su linee cellulari di ATC**, riportando la capacità del farmaco di arrestare la proliferazione ($IC_{50} = 25-150$ nM) e di indurre apoptosi in tutte le linee cellulari esaminate, suggerendone un possibile utilizzo a fini terapeutici.

Più recentemente altri autori hanno sperimentato l'inibitore **MLN8054**, selettivo per Aurora-A, su **linee cellulari di ATC** e sulla linea di carcinoma follicolare, riscontrando anch'essi un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare ($IC_{50} = 0.1-10$ μ M) ed un aumento dell'apoptosi (69). Inoltre, in topi xeno trapiantati con cellule Kat4 la somministrazione di MLN8054 è in grado di ridurre dell'86% il volume e dell'89% la vascolarizzazione tumorali.

Gli stessi autori hanno testato l'efficacia anti-tumorale dello **MLN8054 in terapia combinata con Bortezomib**, inibitore del proteasoma, su linee di ATC, ottenendo un potenziamento degli effetti antiproliferativi e proapoptotici rispetto ai singoli farmaci (69).

Una strategia analoga per il trattamento di ATC è stata sperimentata in uno studio che combinava AZD1152, inibitore selettivo di Aurora-B, con l'adenovirus oncolitico dl922-

947. I risultati ottenuti attestano l'efficacia antineoplastica di AZD1152, sia in trattamento monovalente ($IC_{50} = 5-30$ nM), sia in associazione con l'adenovirus oncolitico su cellule derivate da ATC. AZD1152 non sembrava facilitare l'ingresso nelle cellule del virus oncolitico e tuttavia gli effetti citotossici osservato erano di tipo sinergico (83).

Una ulteriore conferma dell'efficacia dell'inibizione farmacologica delle chinasi Aurora nel contrastare la crescita e la tumorigenicità delle cellule derivanti da **ATC** è arrivata da un recente studio in vitro sul panibitore **SNS314-mesilato**. Tale sostanza ha manifestato una potenza inibitoria sulla proliferazione ($IC_{50} = 2.6-26.6$ nM) maggiore rispetto a tutti i composti precedenti, unitamente alla capacità di indurre apoptosi in tutte le linee cellulari testate (84).

Il presente studio si focalizza sull'inibitore **ZM44743**, che è stato il primo inibitore delle Aurora chinasi sviluppato (70). Tale farmaco fu identificato da uno screening di oltre 250.000 composti inibenti l'attività della chinasi Aurora-A.

La formula di struttura è illustrata nella figura 25.

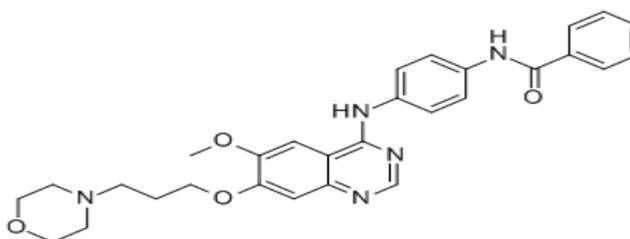


Figura 25- Formula di struttura di ZM44743

Studi condotti su ZM44743 (82) hanno dimostrato che il composto inibisce Aurora-A e Aurora-B in egual modo *in vitro* con una IC₅₀ nel range di 100 nM, ma gli eventi fenotipici indotti *in vivo* rispecchiano piuttosto l'inibizione di Aurora-B (inibizione della fosforilazione dell'istone H3).

Studi *in vitro* su linee cellulari derivate da colture leucemiche hanno evidenziato che il farmaco non impedisce l'entrata delle cellule in mitosi; tuttavia, esso determina la disorganizzazione del fuso, la morfologia aberrante e il non corretto allineamento dei cromosomi ed il *blocco del processo di citocinesi* (85). Inoltre, malgrado la presenza di cromosomi non allineati, sono state riscontrate la perdita di coesione dei cromatidi fratelli e la degradazione della ciclina B, indicativa dell'inizio dell'anafase, a dimostrazione del fatto che ZM447439 è *in grado di compromettere il check-point mitotico* (82).

E' stato dimostrato l'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico di ZM447439 su cellule derivanti da tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NETs) (71) e sui tumori della cervice uterina (72).

Il presente studio è il primo che ha valutato l'effetto di ZM447439 su linee cellulari derivanti da carcinomi tiroide.

I risultati preclinici ottenuti dimostrano la capacità di ZM447439 di ridurre la proliferazione e la tumorigenicità di 4 linee differenti di ATC.

In particolare si è dimostrato che:

5. ZM447439 è in grado di inibire la proliferazione di tutte le linee cellulari derivate da ATC in modo dose-dipendente con una IC₅₀ compresa tra 0.5 µM e 5 µM (dose-risposta);
6. 10 µM di ZM447439 causa una significativa inibizione dell'incorporazione di BrdU già

dopo le prime 24 ore in tutte le linee cellulari testate (tempo-risposta);

7. il composto induce una riduzione significativa del numero e dell'area delle colonie in soft agar in tutte le linee cellulari analizzate (crescita cellulare ancoraggio-indipendente);
8. vi è induzione di endoduplicazione e conseguente poliploidia nelle cellule di ATC; in tutte le linee cellulari il composto causa un aumento considerevole del numero di cellule poliploidi 4N/8N e porta ad aumento delle cellule in apoptosi;
9. infine dall'analisi del ruolo di ZM447439 sull'espressione delle Aurora chinasi, sulla loro attività e sulla localizzazione subcellulare si è dimostrato che:
 - non c'è differenza nei livelli proteici di Aurora-A e di Aurora-B tra il controllo e le cellule trattate;
 - l'autofosforilazione di tutte e 3 le chinasi Aurora è completamente abolita dalla sostanza così come la fosforilazione dell'istone H3 sulla Serina 10, causata specificatamente da Aurora-B,
 - che la localizzazione di Aurora-A sul centrosoma è mantenuta nelle cellule trattate con 10 μ M di ZM447436 per 6 ore, ma l'autofosforilazione di Aurora-A scompare in seguito al trattamento;
 - che la localizzazione di Aurora-B sulla cromatina condensata durante la profase è mantenuta anche nelle cellule trattate col composto.

E' interessante osservare che nessuna delle linee testate rispondeva alla sostanza con l'attivazione del checkpoint post-mitotico e il conseguente arresto del ciclo cellulare in una fase pseudo-G1. Tale checkpoint comporta l'induzione da parte di p53 della proteina p21, la quale a sua volta reprime l'attività del complesso ciclina E/A-CDK2, necessaria per la progressione del ciclo cellulare. Nei tessuti normali ciò impedisce l'espansione clonale di cellule che hanno sviluppato anomalie cromosomiche, mentre le cellule maligne con mutazioni inattivanti la p53 possono proseguire nel ciclo e continuare a dividersi anche in assetto aneuploide. L'inattivazione mutazionale di p53 è stata identificata nel 70-80% dei carcinomi tiroidei anaplastici, così come in tutte le linee cellulari usate in questo studio.

Peraltro, l'esistenza di una p53 funzionale non escluderebbe di per sé un effetto citotossico degli inibitori funzionali di chinasi Aurora, in quanto l'endoreplicazione è stata ugualmente osservata in seguito al trattamento con ZM447439 in cellule tumorali wild type per il gene p53 (86).

E' stato infatti ipotizzato che il tipo di risposta a tali inibitori non dipenda semplicemente dallo stato funzionale di p53, ma piuttosto dall'integrità del checkpoint post-mitotico, vale a dire dalla normale attività di tutte le proteine in esso implicate (87).

E' importante considerare che la dose di ZM447439, alla quale è stato ottenuto l'effetto inibitorio massimale sulle cellule testate, è praticabile *in vivo* su modelli animali, in una auspicabile prospettiva di passare successivamente a studi clinici.

Gli inibitori delle Aurora chinasi risentono ancora di importanti limiti.

Tra questi vi è indubbiamente il fatto che una terapia incentrata su un bersaglio specifico potrebbe fallire a causa della natura poligenica della patologia. Nei tumori si riscontrano spesso alterazioni a carico di più proteine appartenenti a classi funzionali diverse che concorrono al fenotipo tumorale attraverso vie biochimiche indipendenti, per cui l'inibizione di una sola proteina potrebbe risultare insufficiente.

In alternativa, potrebbe verificarsi nella cellule cancerose l'attivazione di meccanismi di deviazione dalla via biochimica soppressa tali da bypassare l'azione farmacologica. D'altra parte, quand'anche il farmaco fosse efficace nel bloccare la proliferazione cellulare, l'effetto potrebbe essere citostatico ma non citotossico, sicchè la progressione tumorale sarebbe arrestata solo temporaneamente e nel tempo l'instabilità genetica delle cellule maligne potrebbe portarle allo sviluppo di una resistenza. Per inibire più proteine contemporaneamente o per contrastare i meccanismi di resistenza si dovrebbe disporre di una combinazione terapeutica di più farmaci (69).

Appare quindi ovvia la necessità di implementare notevolmente le ricerche al fine di approfondire le conoscenze dei meccanismi d'azione dei farmaci antimitotici, nonché di colmare le lacune esistenti tra i promettenti risultati preclinici e le effettive possibilità di applicazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Russel PJ, *Genetica*, EDISES 2003.
2. Wolfe SL, *Biologia Molecolare e Cellulare*, EDISES 2000.
3. Martini FH, Bartholomew EF, “Elementi di Anatomia, Istologia e Fisiologia dell’Uomo”, Napoli, EdiSES, 2008.
4. Nikiforov YE, Biddinger PW et al, “Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid”, Baltimore-Philadelphia, LWW, 2009.
5. Karp G, “Biologia Cellulare e Molecolare”, Napoli, EdiSES, 2004.
6. Bolanos-Garcia VM, “Aurora kinases”, *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 1572-7, 2005.
7. Hochegger H, “Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle” , *Open Biol*, 3: 120-85, 2013.
8. Vader G, Lens SM, “The Aurora kinase family in cell division and cancer”, *Biochim Biophys Acta*, 1786: 60-72, 2008.
9. Carmena M, Ruchaud S, “Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting protein (cull3), *Curr Opin Cell Biol*, 21:796-805, 2009.
10. Lens SM, Voest EE, Medema RH, “Shared and separate functions of polo-like kinases and Aurora kinases in cancer”, *Nat Rev Cancer*, 10: 825-41, 2010.
11. Marumoto T, Zhang D, Saya H, “Aurora-A – a guardian of poles-“, *Nat Rev Cancer*, 5: 42-50, 2005.
12. Barr AR, Gergely F, “Aurora A: the maker and the breaker of spindle poles”, *J Cell Sci*, 120: 2987-96, 2007.
13. Giet R, Petretti C, Prigent C, “Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? “ *Trends Cell Biol*, 15: 241-50, 2005.
14. Vagnarelli P, Earnshaw WC, “Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events”, *Chromosoma* , 113: 211-22, 2004.
15. Higuchi T., Uhlmann F. Cell cycle: passenger acrobatics. *Nature*. 426: 780-81, 2003.

16. Fu J., Bian M., Jiang Q., Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 5: 1-10, 2007
17. Zhang Y., Nagata Y., Yu G., Nguyen H.G., Jones M.R., Toselli P., Jackson C.W., Tatsuka M., Todokoro K., Ravid K. Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression. *Blood.* 103: 3717-26, 2004.
18. Matthews N., Visintin C., Hartzoulakis B., Jarvis A. & Selwood D.L. Aurora A and B kinases as targets for cancer: will they be selective for tumors? *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 6: 109-20, 2006.
19. Yan X., Cao L., Li Q., Wu Y., Zhang H., Saiyin H., Liu X., Zhang X., Shi Q. & Yu L. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes Cells* 10: 617-26, 2005.
20. Li X., Sakashita G., Matsuzaki H., Sugimoto K., Kimura K., Hanaoka F., Taniguchi H., Furukawa K., Urano T. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J. Biol. Chem.* 279: 47201-11, 2004.
21. Sasai K, Katayama H, Stenoiien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004 Dec;59(4):249-63.
22. Hanahan D, Weinber RA, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation", *Cell*, 5:646-674, 2011.
23. Saeki T, Ouchi M, Ouchi T "Physiological and Oncogenic Aurora-A Pathway" *Int J boil Sci*, 5: 758-762, 2009.

24. Kanda A, Kawai H, Suto S et al. "Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation" , *Oncogene*, 24: 7266-72, 2005.
25. Khan J, Ezan F "Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation" *PLoS One*, 6:e26512, 2011.
26. Tsou JH "Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumorigenicity of epithelial cells" *J Pathol*, 225: 243-54, 2011.
27. Sorrentino R., Libertini S., Pallante P.L., Troncione G., Palombini L., Bavetsias V., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Linardopoulos S., Chieffi P., et al. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 928-35, 2005.
28. Wiseman SM, Masoudi H, Niblock P "Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment" *Ann Surg Oncol*, 14: 719-29, 2007.
29. D'Armiento M. Carcinomi della tiroide. In *Guida allo Studio dell'Endocrinologia*. Società Editrice Universo, 2009.
30. Yu GP et al. Thyroid cancer incidence and survival in the national cancer institute surveillance, epidemiology and end results race/ethnicity groups. *Thyroid* 2010 May; 20(5):465-73.
31. D'Armiento M et al. Trend in thyroid carcinoma size, age at diagnosis and histology in a retrospective study of 500 cases diagnosed over 20 years. *Thyroid* Volume 16, Number 11, 2006.

32. Haselkorn T. et al. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Los Angeles County, 1972-1995. *Cancer causes and control* 2000;11:163-170.
33. Ron E. et al. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Philadelphia: WB Saunders 1982:837-854.
34. Kuijpers JL. et al. Trends in treatment and long-term survival of thyroid cancer in Southeastern Netherlands, 1960-1992. *Eur J Cancer* 1998;34:1235-1241.
35. Burgess JR. et al. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid* 2006;16:47-53.
36. Pacini F. *Tumori della tiroide*. Mediserve Editore 2003.
37. Rugarli C *Medicina Interna sistematica*, Milano, Masson Elsevier, 2005.
38. Pacini F., Pinchera A., Elisei R.: *Tumori della tiroide*. Mediserve Editore 2003.
39. Boulay A., Breuleux M., Stephan C., Fux C., Brisken C., Fiche M., Wartmann M., Stumm M., Lane H.A., Hynes N.E.. The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer. *Cancer Res.* 68: 3743-51, 2008.
40. Williams D Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl *Oncogene* 2008 Dec;27 Suppl 2:S9-18.
41. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, Beck-Peccoz P. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol* 61: 239-243, 2004

42. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, Lushnikov E, Kumagai A, Nakashima M, Meirmanov S, Mine M, Hayashi T and Yamashita S The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol* **25**(6):1729-35, 2004.
43. Nikiforow Y.E. Anaplastic carcinoma of the thyroid -will Aurora B light a path for treatment? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:1243-45, 2005.
44. Kojima K., Konopleva M., Tsao T., Nakakuma H., Andreeff M. Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia. *Blood.* 112: 2886-95, 2008.
45. Shahedian B., Shi Y., Zou M. & Farid N.R. Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from p53 mutations. *Mol. Genet. Metab.* 72: 155-63, 2001.
46. Hayashi Y et al Papillary microcarcinoma of the thyroid among atomic bomb survivors: tumor characteristics and radiation risk. *Cancer.* 2010 Apr 1;116(7):1646-55.
47. Wong WW et al Primary non-Hodgkin lymphoma of the breast: The Mayo Clinic Experience, *Surg Oncol.* 2002 May;80 (1):19-25.
48. Williams D Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl *Oncogene* 2008 Dec;27 Suppl 2:S9-18.
49. Motta P. *Anatomia Umana.* III edizione, Edi-Ernes Editore 1998:578-589.

50. Bianco AR. Manuale di Oncologia clinica. McGraw-Hill Editore 1999:26-30.
51. Robbins RJ. Le basi patologiche delle malattie. VI edizione, Piccin Editore, 2000.
52. Sherman SI. Thyroid carcinoma. Lancet 2003;36:501-511.
53. Kinder BK et al Well differentiated thyroid cancer. Curr Opin Oncol 2003;15:71-77.
54. Pasiaka JL et al Anaplastic thyroid cancer. Curr Opin Oncol 2003;15:78-83.
55. Monaco F Endocrinologia clinica. Società Editrice Universo Editore 2006.
56. Cancer Guidelines 2002, British Thyroid Association.
57. Sobin LH. et al. TNM classification of malignant tumors, 7th ed. UICC. Wiley-Liss, New York 2009.
58. Frasoldati A. et al. Challenger in neck ultrasonography: lymphadenopathy and parathyroid grand. End Pract 2004;10:261-268.
59. Pacini F. et al. Therapeutic doses of iodine-131 reveal undiagnosed metastases in thyroid cancer with detectable serum thyroglobulin levels. J Nucl Med 1987;28:1888–1891.
60. Pacini F. et al. Outcome of 309 patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma treated with radioiodine. World J Surg. 1994;18:600-4.

61. Kinder BK. Well differentiated thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2003;15:71-77.
62. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;36:501-511.
63. Luster M. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35: 1941-1959.
64. Nagaiah G, Hossain H, Mooney CJ, Parmentier J and Remick SC. Anaplastic Thyroid Cancer: A Review of Epidemiology, Pathogenesis and Treatment. *J Oncol* 2011; 54:2358, 1-13.
65. Manchado E, Guillaumot M, Malumbres M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ* 2012;19:369-77.
66. Lok W, Klein RQ, Saif MW. Aurora kinase inhibitors as anti-cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2010;21:339-50.
67. Harrington EA, Bebbington D, Moore J et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 10: 262-267, 2004.
68. Arlot-Bonnemains Y, Baldini E, Martin B, et al. Effects of the Aurora kinase inhibitor VX-680 on anaplastic thyroid cancer-derived cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:559-68.
69. Wunderlich A, Roth S, Ramaswamy A, Greene BH, Brendel C, Hinterseher U, Bartsch DK, Hoffmann S. Combined inhibition of cellular pathways as a future therapeutic option in fatal anaplastic thyroid cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 762–768.

70. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A et al, Aurora-B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, mad2 and Cenp-E to kinetochores J Cell Biol 161: 267-280, 2003.
71. Georgieva I, Koychev D, Wang Y, Holstein J, Hopfenmüller W, Zeitz M, Grabowski P. ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines Neuroendocrinology. 2010;91(2):121-30.
72. Zhang L, Zhang S. ZM447439, the Aurora kinase B inhibitor, suppresses the growth of cervical cancer SiHa cells and enhances the chemosensitivity to cisplatin. J Obstet Gynaecol Res. 2011 Jun;37(6):591-600.
73. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:842-54.
74. Zhang X, Ems-McClung SC, Walczak CE. Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. Mol Biol Cell 2008;19:2752-65.
75. Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, et al. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. Cell Mol Life Sci 2012.
76. Ulisse S, Baldini E, Toller M, et al. Transforming acidic coiled-coil 3 and Aurora-A interact in human thyrocytes and their expression is deregulated in thyroid cancer tissues. Endocr Relat Cancer 2007;14:827-37.

77. Gabillard JC, Ulisse S, Baldini E, et al. Aurora-C interacts with and phosphorylates the transforming acidic coiled-coil 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408:647-53.
78. Slattery SD, Mancini MA, Brinkley BR, et al. Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B. *Cell Cycle* 2009;8:2984-94.
79. Schindler K, Davydenko O, Fram B, et al. Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2215-22.
80. Ulisse S, Delcros JG, Baldini E, et al. Expression of Aurora kinases in human thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer* 2006;119:275-82.
81. Katayama H and Sen S Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules *Biochimica et Biophysica Acta* 1799: 829-839, 2010.
82. Kitzen JJEM, De Jonge MJA and Verweij J Aurora kinase inhibitors *Oncol Hematol* 73: 99-110, 2010.
83. Wilkinson R AZD1152, a selective inhibitor of Aurora-B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis *Clin Cancer Res* 13: 3682-3688, 2007.
84. Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento E, et al. Effects of the Aurora kinases pan-inhibitor SNS-314 mesylate on anaplastic thyroid cancer derived cell lines. *Clin Ter* 163 (5): 307-14, 2012

85. Ikezoe T A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia *Mol Cancer Ther* 6: 1851-7, 2007.

86. Gizatullin F The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function *Cancer Res*, 66: 7668-77, 2006.

87. Wunderlich A, Fisher M, Schlosshaeur T et al. Evaluation of Aurora kinase inhibition as a new therapeutic strategy in anaplastic and poorly differentiated thyroid cancer *Cancer Sci*, 102: 762-8, 2011.