

Dott.ssa Ilaria Ruffilli

**CLM3 e Carcinoma Anaplastico  
della Tiroide**  
Tesi di Specializzazione

Università di Pisa  
22 Giugno 2015



Università di Pisa

---

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

# CLM3 e Carcinoma Anaplastico della Tiroide

Tesi di  
Dott.ssa Ilaria Ruffilli

Relatori

Prof. Aldo Paolicchi .....

Prof. Alessandro Antonelli .....

Candidato

Dott.ssa Ilaria Ruffilli .....

---

Sessione di Laurea Giugno 2015  
Anno Accademico 2013/2014

# Indice

<b>Riassunto</b>	<b>3</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>5</b>
1.1 Cenni epidemiologici e aspetti clinici . . . . .	5
1.2 Trattamento chirurgico . . . . .	7
1.3 Altre tipologie di trattamento . . . . .	9
1.3.1 Radioterapia . . . . .	10
1.3.2 Chemioterapia . . . . .	11
1.4 Plurimodalit� di trattamento . . . . .	14
1.5 Nuovi agenti farmacologici . . . . .	16
1.6 CLM3, CLM29 e CLM94 . . . . .	17
<b>2 Scopo della Tesi</b>	<b>20</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>21</b>
3.1 Sintesi del composto . . . . .	21
3.2 Tessuti tiroidei . . . . .	22
3.3 Allestimento delle colture primarie . . . . .	23
3.3.1 Colture primarie di cellule follicolari tiroidee sane . . .	23
3.3.2 Colture primarie di cellule di ATC . . . . .	23
3.3.3 Linea cellulare AF . . . . .	24
3.3.4 Linea cellulare 8305C . . . . .	24
3.4 Saggi di vitalit� e proliferazione cellulare . . . . .	24

---

3.5	Determinazione dell'apoptosi . . . . .	26
3.5.1	Captazione dell'Hoechst . . . . .	26
3.5.2	Saggio dell'Annessina V . . . . .	26
3.6	Migrazione e Invasione . . . . .	27
3.7	Inibizione di fosfo-EGFR e fosfo-VEGFR-2 . . . . .	27
3.8	ERK 1/2 e Akt ELISA . . . . .	28
3.9	Quantificazione della ciclina D1 . . . . .	28
3.10	Studi <i>in vivo</i> . . . . .	29
3.10.1	Xenotrapianto di AF in topi CD nu/nu e CLM3 . . . . .	29
3.10.2	Immunoistochimica e densità microvascolare . . . . .	29
3.11	Analisi dei dati . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Risultati</b>	<b>31</b>
4.1	Test nelle linee cellulari di ATC . . . . .	31
4.1.1	Saggio di proliferazione . . . . .	31
4.1.2	Apoptosi . . . . .	31
4.1.3	Migrazione e Invasione . . . . .	32
4.2	Test nelle linee cellulari 8305C e AF . . . . .	32
4.2.1	Proliferazione e apoptosi . . . . .	32
4.2.2	EGFR e fosforilazione di ERK1/2 e Akt . . . . .	32
4.2.3	Ciclina D1 . . . . .	33
4.3	Studi <i>in vivo</i> . . . . .	33
4.3.1	Dimensione del tumore . . . . .	33
4.3.2	Espressione di VEGF-A e densità microvascolare . . . . .	33
4.4	Figure e tabelle . . . . .	34
<b>5</b>	<b>Discussione</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Letteratura citata</b>	<b>46</b>

## Elenco delle figure

3.1	Struttura del derivato pirazolo[3,4-d]pyrimidinico, CLM3. . .	22
3.2	Riduzione del sale di tetrazolio a formazano da parte di un sistema cellulare riducente (RS); EC, accettore intermedio di elettroni. . . . .	25
4.1	Saggio di proliferazione WST-1 a 2 ore dall'inizio della reazione di tetrazolio (media $\pm$ SD di tutti i campioni) nelle cellule di ATC (A) trattate con CLM3 per 24 ore e apoptosi nelle cellule di ATC dopo trattamento con CLM3 per 48 ore (media $\pm$ SD di tutti i campioni) (B). . . . .	34
4.2	Migrazione (A) e invasione (B) nelle cellule di ATC trattate rispetto al controllo. Per la migrazione le cellule sono state incubate 12 ore mentre per l'invasione 24 ore. Nelle tabelle sottostanti le figure, sono state riportate le percentuali di inibizione sia della migrazione che dell'invasione in confronto alla percentuale di inibizione della proliferazione. . . . .	35
4.3	Saggio di proliferazione WST-1 a 2 ore dall'inizio della reazione di tetrazolio (media $\pm$ SD di tutti i campioni) nella linea cellulare 8305C (A) e nella linea cellulare AF (B) trattate con CLM3 per 24 ore e l'apoptosi nelle 8305C (C) e nelle cellule AF (D) dopo trattamento con CLM3 per 48 ore. . . . .	36

4.4 Inibizione della fosforilazione di EGFR nelle cellule 8305C (A) e nelle cellule AF (B) dopo 72 ore di trattamento con CLM3 e inibizione della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 nelle cellule 8305C (C ed E rispettivamente) e nelle cellule AF (D e F rispettivamente) dopo 72 ore dal trattamento. Tutti i dosaggi sono stati effettuati con un kit ELISA. La concentrazione della ciclina D1 é stata misurata nelle cellule 8305C (G) e nelle cellule AF (H) dopo 72 ore di trattamento con CLM3 o il solo veicolo. . . . . 37

4.5 Confronto della crescita tumorale nel gruppo di controllo rispetto al gruppo dei trattati con CLM3 (50 mg/Kg/die) (A). Peso del tumore nel gruppo di controllo rispetto al gruppo dei trattati (B). Perdita di peso (C), non significativo, del gruppo dei trattati rispetto a quello di controllo. . . . . 38

4.6 Immagine istologica della massa tumorale sviluppatasi dopo inoculo delle cellule AF in topi CD nu/nu, dopo colorazione ematossilina-eosina, compatibile con tipologia istologica di ATC (A). CLM3 riduceva l'espressione di VEGF e la densità microvascolare (MVD) nella massa tumorale (B). Rappresentazione microscopica dell'immunoreattività di VEGF-A localizzata nelle cellule tumorali del gruppo di controllo (C) e nel gruppo dei trattati con CLM3 (D). Rete microvascolare nel tessuto tumorale di controllo (E) significativamente ridotta dopo trattamento con CLM3 (F). . . . . 39

# Abbreviazioni

<b>ATC</b>	carcinoma anaplastico della tiroide
<b>EGFR</b>	recettore del fattore di crescita epidermico
<b>FBS</b>	fetal bovine serum
<b>FCS</b>	fetal calf serum
<b>FNAB</b>	fine needle aspiration biopsy
<b>FTC</b>	carcinoma follicolare tiroideo
<b>MTC</b>	carcinoma midollare della tiroide
<b>MVD</b>	densità microvascolare
<b>PTC</b>	carcinoma papillare tiroideo
<b>TC</b>	tomografia computerizzata
<b>TFC</b>	cellule follicolari tiroidee
<b>TK</b>	tirosin-chinasi
<b>TKI</b>	inibitori delle tirosin-chinasi
<b>TKR</b>	recettori delle tirosin-chinasi
<b>TSH</b>	ormone tireostimolante
<b>VEGF</b>	fattore di crescita vascolare endoteliale
<b>VEGFR</b>	recettore di crescita dell'endotelio vascolare

# Riassunto

Il carcinoma anaplastico della tiroide (ATC) é una delle forme tumorali piú aggressive e letali, che quasi inevitabilmente in tempi brevi conduce alla morte i pazienti affetti.

Nonostante siano state testate varie modalitá di trattamento, tra cui la combinazione dell'intervento chirurgico con la radioterapia e/o la chemioterapia, la prognosi di questi pazienti non risulta sostanzialmente modificata. Sono state, quindi, proposte nuove strategie di trattamento, tra cui l'utilizzo di nuovi agenti farmacologici, in particolare le molecole inibitrici delle tirosin-chinasi (TKI).

I TKI risultano avere un ruolo importante nel trattamento dell'oncogenesi e dell'angiogenesi patologica, in quanto determinano l'inibizione della trasmissione del segnale mitogeno attraverso il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR) e il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), impedendo la fosforilazione dei residui di tirosina associati al recettore.

Con questa tesi é stata studiata l'attivitá antineoplastica e antiangiogenica di un composto pirazolopirimidinico (CLM3) con la capacitá di inibire multiple vie di trasduzione del segnale (includendo la tirosin-chinasi RET, EGFR e VEGF) in colture cellulari primarie di ATC, nella linea cellulare umana 8305C (carcinoma indifferenziato della tiroide) e in una linea cellulare di ATC (AF), ottenuta spontaneamente in coltura.

CLM3 é stato testato sulle cellule primarie di ATC alle concentrazioni di 5, 10, 30, e 50  $\mu\text{M}$ ; nelle cellule 8305C e nella linea AF sono state utilizzate le concentrazioni 1, 5, 10, 30, 50, or 100  $\mu\text{M}$ . CLM3 é stato, inoltre, testato

*in vivo* nei topi CD nu/nu con la linea AF.

CLM3 ha inibito significativamente la proliferazione cellulare nelle linee 8305C e AF, inducendo anche l'apoptosi. Si é osservata una significativa riduzione della proliferazione anche nelle cellule ATC ( $p < 0.01$ ). CLM3 aumentava la percentuale di apoptosi nelle cellule di ATC in maniera dose dipendente ( $p < 0.001$ ), inibiva la migrazione ( $p < 0.01$ ) e l'invasione ( $p < 0.001$ ).

La linea cellulare AF é stata iniettata a livello sottocutaneo in topi CD nu/nu e ha portato allo sviluppo di una massa tumorale identificabile nei successivi 15 giorni. CLM3 (50 mg/Kg/die) ha inibito significativamente la crescita tumorale partendo dal sedicesimo giorno dopo l'inizio del trattamento. CLM3 riduceva significativamente l'espressione di VEGF-A e la densità microvascolare del tessuto tumorale AF. CLM3 inibiva, inoltre, la fosforilazione di EGFR, AKT ed ERK1/2 e deregolava la ciclina D1 nelle 8305C e nella linea AF.

In conclusione, l'attività antitumorale e antiangiogenica di CLM3, composto pirazolopirimidinico, risulta essere interessante e molto promettente nel trattamento dell'ATC, aprendo la strada alla futura valutazione clinica.

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Cenni epidemiologici e aspetti clinici

Il carcinoma anaplastico della tiroide (ATC) é uno dei carcinomi umani piú aggressivi (Ain 1998) e la patologia piú letale nell'ambito della chirurgia endocrina, che quasi inevitabilmente conduce alla morte i pazienti affetti nel giro di circa un anno (Shaha, 2004).

L'ATC si manifesta in maniera improvvisa come una massa in rapida crescita a livello della ghiandola tiroidea, a partire da una patologia tiroidea benigna pre-esistente o da un carcinoma differenziato (Gilliland *et al.*, 1997). In molti casi, infatti, rappresenta lo stadio terminale del processo di dedifferenziazione di un carcinoma papillare tiroideo (PTC) o di un carcinoma follicolare tiroideo (FTC), anche se spesso appare come un ATC fin dall'inizio. La maggior parte dei pazienti (>50%), come vedremo con maggior dettaglio in seguito, si presenta alla diagnosi con una metastasi nella regione linfonodale o sistemica. L'ATC costituisce soltanto l'1-2% di tutti i tumori tiroidei, ma il 14-39% dei casi di morte per carcinomi alla tiroide (Hundahl *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999). Le differenze, considerando il comportamento biologico dei vari tipi istologici di carcinoma tiroideo, sono ben note. In contrasto con l'FTC e il PTC, l'ATC é una delle neoplasie piú aggressive negli uomini. La percentuale di mortalitá é superiore al 90% con una sopravvivenza media di 4-12 mesi dalla diagnosi (Nel *et al.*, 1985; Tan *et al.*, 1995; Giuffrida *et al.*, 2000). Poiché l'ATC é raro, é stato difficile

studiare un sufficiente numero di pazienti per comprendere meglio la storia naturale del tumore e i fattori che possono influenzare il trattamento e la sopravvivenza (Ordonez *et al.*, 2004).

L'ATC si presenta principalmente nei soggetti piú anziani, l'età media alla diagnosi é di 55-65 anni (Tan *et al.*, 1995; Carty, 2001). In una casistica di 84 pazienti, valutati consecutivamente alla Mayo Clinic, dal 1971 al 1993, l'età media era di 70 anni (range 43-87 anni) (McIver *et al.*, 2001). Le donne sembrano essere colpite piú frequentemente degli uomini (F:M =3:1; 57% vs 43%). L'ATC avanzato ha manifestazioni cliniche tipiche. La piú comune é l'estensione di una massa in rapida crescita a livello del collo. Un'emorragia all'interno della massa tiroidea si può manifestare come rapido ingrandimento, accompagnato da dolore, severa disfagia e raucedine.

I segni e i sintomi piú frequenti e importanti dei pazienti osservati alla Mayo Clinic erano raucedine (77%), disfagia (56%), paralisi delle corde vocali (49%), dolore cervicale (29%) e disfonia (19%). Il carcinoma, alla visita iniziale, si può manifestare come: nodulo singolo (58%), noduli multipli (36%), coinvolgimento bilaterale (24%) e lesione fissa e dura (75%). Nel 6% dei pazienti il tumore misurava piú di 10 cm e nel 58% da 5 a 10 cm. Le strutture circostanti risultavano invase nel 70% dei pazienti, in particolare risultavano interessati i muscoli (65%), la trachea (46%), l'esofago (44%), il nervo laringeo (27%) e la laringe (13%). Le metastasi linfonodali sono state osservate nel 43% dei pazienti e le metastasi a distanza nel 20%-50% dei casi al momento della diagnosi (Nel *et al.*, 1985; Giuffrida e Gharib, 2000; Giuffrida *et al.*, 2001). La sede piú frequente di metastasi a distanza risulta essere il polmone (80%), seguito dalle ossa (10%), dalla pelle e dal cervello (10%). Sono state descritte anche metastasi cardiache (Tan *et al.*, 1995; Carty, 2001; Giuffrida *et al.*, 2001). Nella casistica della Mayo Clinic, le metastasi polmonari sono state riscontrate nel 45% dei pazienti e le metastasi ossee nel 12%. Un'accurata stadiazione con laringoscopia, ecografia del collo, indagini ossee e tomografia computerizzata (TC) di testa, collo, mediastino, torace e addome é importante per determinare l'estensione e l'infiltrazione del tumore. L'ATC é una neoplasia in rapida crescita e ha prognosi pessima. La sopravvivenza media complessiva é di circa 6 mesi. I fattori prognostici piú

importanti sono l'età e l'estensione della patologia alla diagnosi. In generale, i pazienti più giovani di 60 anni hanno una patologia meno estesa al momento della diagnosi. Sempre nella casistica della Mayo Clinic, la regressione multipla di Cox indicava che i seguenti fattori potessero essere predittivi di peggiore sopravvivenza: tipo istologico della cellula (carcinoma a cellule giganti), dimensione della lesione (6 cm o più), trattamento chirurgico (sola biopsia), invasione delle strutture adiacenti ed estensione della malattia con metastasi a distanza. Il trattamento dell'ATC non è a oggi standardizzato. Molti pazienti muoiono in pochi mesi dalla diagnosi, soprattutto per ostruzione delle vie aeree causata dall'invasione tumorale locale. La chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, singolarmente, sono raramente adeguate per controllare la patologia, ma, una combinazione di questi trattamenti, può migliorare il controllo locale (Kebebew *et al.*, 2005).

Sebbene l'ATC costituisca una parte ristretta dei tumori della tiroide, esso è responsabile di più del 50% circa delle 1200 morti annue attribuibili al carcinoma tiroideo (Ain, 1998). L'incidenza di questa forma tumorale rara si sta riducendo negli ultimi anni, mentre i casi di carcinoma differenziato della tiroide sono in aumento, probabilmente perché molti tumori classificati in passato come ATC vengono adesso riconosciuti come linfomi o carcinomi midollari scarsamente differenziati, principalmente mediante metodiche immunochimiche (Holting *et al.*, 1990a).

## 1.2 Trattamento chirurgico

E' stata riscontrata una prognosi più favorevole per i piccoli ATC scoperti per caso e per quelli confinati a livello del collo, rispetto ai tumori con metastasi distali (Pacheco-Ojeda *et al.*, 2001; Sugitani *et al.*, 2001). L'approccio chirurgico appare generalmente inappropriato, poiché l'ATC si presenta come una grande massa cancerosa che invade le strutture adiacenti, con metastasi distali al momento della diagnosi.

Alcuni autori sono favorevoli all'utilizzo di vari trattamenti più aggressivi nel caso di pazienti con una forma maligna in uno stadio precoce, ma non è ancora chiaro se un tale approccio possa aumentare la sopravvivenza in

modo significativo (Busnardo *et al.*, 2000; Besic *et al.*, 2001; Haigh *et al.*, 2001; Pierie *et al.*, 2002; De Crevoisier *et al.*, 2004; Haddad *et al.*, 2005).

Il ruolo del trattamento chirurgico dell'ATC resta, quindi, ancora controverso, sebbene alcuni studi riportino che, nel caso di pazienti con tumori localizzati, la completa rimozione della massa tumorale possa aumentare la sopravvivenza (Junor *et al.*, 1992; Haigh *et al.*, 2001; De Crevoisier *et al.*, 2004; Kihara *et al.*, 2004; Kebebew *et al.*, 2005). Il consenso al trattamento chirurgico dell'ATC raccomanda la completa rimozione chirurgica, laddove sia possibile (Cobin *et al.*, 2001), nonostante essa sia giustificata soltanto se il tasso di morbilità post-operatorio resta basso. La paralisi bilaterale delle corde vocali, il sanguinamento, e la fistola esofagea sono complicazioni drammatiche che minacciano la vita dei pazienti trattati e che possono comprometterne la sopravvivenza o, piú frequentemente, ritardare le successive terapie coadiuvanti. Per questi motivi, la rimozione di strutture vitali, come la laringe o l'esofago, dovrebbe essere evitata (Cobin *et al.*, 2001). La rimozione parziale del tumore, seguita dalla radioterapia e dalla chemioterapia, potrebbe ritardare o evitare l'ostruzione delle vie aeree e prevenire la morte per asfissia, nonostante questo possa aumentare la sopravvivenza del paziente soltanto di pochi mesi. In alcuni casi la tracheostomia può essere eseguita al momento dell'intervento chirurgico se l'ostruzione delle vie aeree é già presente, a causa della paralisi bilaterale del nervo laringeo o della compressione esercitata dalla massa neoplastica non rimossa. Alcuni autori hanno, comunque, notato che nei pazienti in cui era stata eseguita la tracheostomia, la sopravvivenza risultava minore (Hotling *et al.*, 1990b; Haddad *et al.*, 2005).

La tiroidectomia totale e la dissezione radicale del collo possono non avere vantaggio su un approccio chirurgico meno aggressivo. Il controllo locale della malattia é un'importante componente di gestione clinica. La terapia sostitutiva con levotiroxina é generalmente richiesta nel periodo postoperatorio.

### 1.3 Altre tipologie di trattamento

Il trattamento medico dei pazienti affetti da ATC non é ancora stato standardizzato, ed é quasi sempre utilizzato in seguito all'intervento chirurgico per riuscire a controllare meglio l'evolvere della malattia.

Lo scopo dell'intervento chirurgico é di ottenere la rimozione macroscopica completa prima della chemioterapia, in quanto, questo approccio sembra rallentare il corso della malattia.

Nello studio di Haigh *et al* (Haigh *et al.*, 2001), infatti, 26 pazienti su 33 affetti da ATC sono stati trattati chirurgicamente; 8/26 pazienti operati hanno avuto una completa rimozione della massa tumorale, mentre negli altri casi é stato eseguito un intervento parziale. In seguito, i pazienti in cui era stata eseguita una tiroidectomia totale, sono stati trattati con radioterapia (45-75 Gy) e con chemioterapia (doxorubicina). La sopravvivenza media nei due gruppi di pazienti sopra citati é stata di 43 mesi contro 3 mesi, rispettivamente (Haigh *et al.*, 2001).

Analogamente, in un altro studio (Kobayashi *et al.*, 1996) i pazienti trattati con tiroidectomia totale e radioterapia e chemioterapia hanno avuto una maggiore sopravvivenza rispetto a quelli con residui post-operatori (sopravvivenza media di 8 mesi contro 2 mesi, rispettivamente).

Nella maggior parte degli studi (Lo *et al.*, 1999; Haigh *et al.*, 2001; Heron *et al.*, 2002) l'intervento chirurgico risulta essere il primo trattamento consigliato, seguito da altri, mentre in altri lavori si consiglia di eseguire la radioterapia/chemioterapia prima dell'intervento chirurgico (Nilsson *et al.*, 1998; Tennvall *et al.*, 2002). Quest'ultimo metodo potrebbe rendere operabili pazienti che precedentemente non lo erano; inoltre, una precoce chemioterapia potrebbe prevenire o ritardare lo sviluppo di metastasi distali. I potenziali svantaggi di questo approccio, invece, includono un ritardo nell'evitare l'ostruzione delle vie aeree e nell'esecuzione della tiroidectomia totale a causa degli effetti collaterali della radioterapia/chemioterapia. Questo metodo in diversi pazienti permette un migliore controllo della patologia dopo la tiroidectomia totale e una sopravvivenza di oltre due anni (Tennvall *et al.*, 2002). La mancanza di sufficienti evidenze sperimentali non permette di chiarire se

questo tipo di approccio conferisca un vantaggio clinico significativo.

### 1.3.1 Radioterapia

La radioterapia a fasci esterni é utile nel ritardare le recidive locali e nel prevenire l'ostruzione toracica. É stato dimostrato che la radioterapia non varia la percentuale di mortalitá, ma migliora il controllo locale della malattia, sebbene l'ATC sia considerato radioresistente. Simpson per primo (Simpson, 1980) riportó dati sul trattamento dell'ATC con dosi di radiazioni di 350-800 cGy, ma questo protocollo non riuscí a eliminare la malattia e ad aumentare la sopravvivenza del paziente, i quali morirono tutti entro nove mesi dalla diagnosi. La radioterapia locale iperfrazionata sembra essere piú efficace nel controllo a livello locale rispetto ai trattamenti convenzionali, nonostante essa comporti grossi effetti collaterali. In uno studio di Wong CS *et al.* (Wong *et al.*, 1991) 14 pazienti sono stati trattati con radioterapia iperfrazionata (100 cGy per 4 volte al giorno); la completa regressione del tumore é stata osservata nel 43% dei casi, contro una parziale regressione nel 50%. Sono state osservate, tuttavia, 3 morti dipendenti dalle conseguenze del trattamento ricevuto, quindi, il protocollo é stato sospeso. Un regime di frazionamento di due volte al giorno é ben tollerato e ha una tendenza a prolungare la sopravvivenza (Wang *et al.*, 2006).

Junor e colleghi riportarono una casistica di 91 pazienti che ricevettero radioterapia dopo intervento chirurgico e notarono che i pazienti che erano stati sottoposti a tiroidectomia totale o parziale avevano una sopravvivenza significativamente migliore rispetto a quelli che erano stati sottoposti solamente a biopsia (Junor *et al.*, 1992).

La maggior parte dei pazienti ricevette tra 30 e 60 Gy somministrati in frazioni da 2 Gy (sopravvivenza media 21 settimane; sopravvivenza a sei mesi 45% e sopravvivenza a nove mesi 32%).

Nel lavoro di Levendag PC *et al.* (Levendag *et al.*, 1993) condotto su 51 pazienti trattati con radioterapia e intervento chirurgico, i pazienti con metastasi distali, ma migliore controllo tumorale a livello locale, avevano una sopravvivenza media di 7,5 mesi contro 1,6 mesi di quelli con residui locali

della malattia. Nello studio di Demeter e colleghi, (Demeter *et al.*, 1991) 12 pazienti ricevettero radioterapia e il 42% ebbe una risposta documentata.

Mitchell G *et al.* (Mitchell *et al.*, 1999) hanno trattato 17 pazienti con alte dosi di radioterapia (60,8 Gy in frazioni di 1,9 Gy due volte al giorno), riportando una percentuale di risposta del 59%, tra cui 3 risposte complete; al momento del decesso dei pazienti nel 76% dei casi era mantenuto il controllo della lesione locale. In altri lavori di Kim JH e Leeper RD (Kim e Leeper, 1983; Kim e Leeper, 1987) su 19 pazienti con ATC localmente in fase avanzata, è stata riportata una risposta completa nell'84% dei casi al trattamento con radioterapia iperfrazionata (57,6 Gy in frazioni di 1,6 Gy per due volte, per 3 giorni a settimana) combinata con doxorubicina (10 mg/m<sup>2</sup>) assunta settimanalmente; la sopravvivenza media è stata di 12 mesi, e al momento del decesso dei pazienti nel 68% dei casi è stato mantenuto il controllo della lesione locale.

Le dosi riportate in letteratura per la radioterapia tradizionale e frazionata per il trattamento dell'ATC variano considerevolmente; comunque, sembra che debbano essere utilizzate dosi superiori a 45-50 Gy (Mitchell *et al.*, 1999; Pierie *et al.*, 2002) per il trattamento radicale.

### 1.3.2 Chemioterapia

Il chemioterapico maggiormente utilizzato nel trattamento dell'ATC è la doxorubicina, da sola o in combinazione con la bleomicina, il ciclofosfamide, il 5-fluorouracile, il cisplatino, il metotrexate o il paclitaxel. La somministrazione della doxorubicina può comportare reazioni avverse cutanee e della mucosa, e mielosoppressione; è stato, quindi, proposto (Asakawa *et al.*, 1997) di testare *in vitro* la sensibilità a questi farmaci, per evitare chemioterapie inefficaci.

La doxorubicina è stata utilizzata anche da sola in uno studio controllo randomizzato (Eastern Cooperative Oncology Group) con risultati poco soddisfacenti. Shimaoka *et al.*, infatti, osservarono solamente una risposta su 21 pazienti trattati con doxorubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) in monoterapia (Shimaoka *et al.*, 1985). Combinando doxorubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) e cisplatino (40 mg/m<sup>2</sup>)

in un lavoro di Shimaoka K *et al.* (Shimaoka *et al.*, 1985) é stata osservata una risposta positiva da parte di 6/18 pazienti. Questo studio ha dimostrato che la risposta ottenuta combinando questi farmaci é superiore a quella di un trattamento con un solo chemioterapico. In una review della letteratura sul trattamento di ATC, Ahuja e Ernest (Ahuja e Ernst, 1987) riportarono che la frequenza di risposta con doxorubicina in monoterapia era del 22.1% (17 su 77 pazienti).

In uno studio Giapponese (Chemoterapy Committee, the Japanese Society of Thyroid Surgery, 1995), 15 pazienti con ATC sono stati trattati con cisplatino (40 mg/m<sup>2</sup>), doxorubicina (60 mg/m<sup>2</sup>), etoposide (100 mg/m<sup>2</sup> 3/4 per 3 giorni) e peplomicina (5 mg); 11 pazienti sono deceduti entro i 7 mesi successivi al trattamento e 4 sono sopravvissuti per 3-11 mesi.

Nel lavoro di Auersperg M *et al.* (Auersperg *et al.*, 1990) 89 pazienti con ATC sono stati trattati con vinblastina, cisplatino, doxorubicina e mitoxantrone prima dell'intervento chirurgico e il 15% di essi é deceduto prima dell'operazione; dei pazienti che hanno proseguito lo studio, soltanto il 9% é sopravvissuto per piú di 1 anno.

Sono stati riportati dati anche sul trattamento con alte dosi di chemioterapici e trapianto di midollo osseo (Kobayashi *et al.*, 1996). I risultati ottenuti su 9 pazienti trattati con bleomicina, ciclofosfamide e 5-fluorouracile contemporaneamente a radioterapia (30-40 Gy) sono stati poco soddisfacenti, in quanto la remissione é stata soltanto momentanea e la sopravvivenza di circa 3 mesi.

In uno studio di Schlumberger M *et al.* (Schlumberger *et al.*, 1991), 20 pazienti con ATC sono stati trattati con doxorubicina/cisplatino o mitoxantrone da solo, e successivamente con radioterapia (17,5 Gy in 7 frazioni); soltanto 3 pazienti sono sopravvissuti per piú di 20 mesi.

In uno studio di Ain KB *et al.* (Ain *et al.*, 2000), 19 pazienti con lesione locale persistente o metastasi distali di ATC sono stati infusi con paclitaxel (120-225 mg/m<sup>2</sup>) ed é stata osservata una risposta positiva nel 57% dei casi.

In un lavoro di Miccoli P *et al.* (Miccoli *et al.*, 2007), tra Luglio 2001 e Maggio 2006, sono stati trattati 2254 pazienti con carcinoma tiroideo primario. Tra questi pazienti, 17 (0,7%) erano affetti da ATC, diagnosticato

tramite agobiopsia ("fine needle aspiration biopsy" - FNAB) o intervento chirurgico e confermato all'istologia finale. Sono stati esclusi dallo studio casi di carcinoma scarsamente differenziato, FTC con componenti insulari, tumori cellulari primordiali costituiti da varianti trabecolari, solide e insulari, in modo da analizzare esclusivamente i pazienti affetti da ATC. Non é stato utilizzato un protocollo standardizzato nella selezione dei pazienti da trattare con chemioterapia post-operatoria (varie combinazioni di doxorubicina, cisplatino e vinblastina) o radioterapia (una dose di piú di 45 Gy nel 70% dei pazienti e minore di 45 Gy nel 30%).

Le caratteristiche cliniche dei 17 pazienti considerati (4 uomini e 13 donne, di età media di 71,4 anni - range di età di 42-85 anni) sono mostrate in Tab. 1.

	<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>No (%)</b>
<b>Etá</b>	40-59	2 (11,7%)
	60-79	10 (58,8%)
	80-90	5 (29,5%)
<b>Sesso</b>	Maschio	4 (23,5%)
	Femmina	13 (76,5%)
<b>Dimensioni tumore</b>	< 5	14 (82,3%)
	≥ 5	3 (17,7%)
<b>Metastasi</b>	Assenti	5 (29,5%)
	Presenti	12 (70,5%)

**Tabella 1.1:** Caratteristiche cliniche di 17 pazienti con ATC al momento della diagnosi.

L'intervento chirurgico é stato eseguito in tutti i pazienti e la resezione completa della massa neoplastica é stata ottenuta nel 58,8% dei pazienti, mentre nel 42,2% é stata incompleta, a causa dell'estensione locale del tumore a strutture vascolari o vitali. Soltanto 2 pazienti sono stati trattati con radioterapia e chemioterapia preoperatorie. La completa rimozione della neoplasia, seguita da radioterapia e chemioterapia, é stata eseguita soltanto in 6 pazienti, mentre la sola radioterapia dopo l'intervento in 4 pazienti. La sopravvivenza media dei 17 pazienti é stata di 5,7 (2-24) mesi ed é mostrata in Tab. 1. Non é stata osservata alcuna associazione tra una maggiore sopravvivenza e diametro massimo possibile della neoplasia o trattamento radio/chemioterapico o metastasi distali o età; mentre l'estensione della parte tumorale rimossa tramite l'intervento chirurgico sembra influenzare la sopravvivenza del paziente, nonostante non sia stata evidenziata una differenza significativa tra i 2 gruppi (pazienti in cui é stata operata una completa rimozione del tessuto tumorale e pazienti con resezione incompleta).

## 1.4 Plurimodalit  di trattamento

L'ATC é fortemente maligno e la sopravvivenza non é influenzata, né dalla radioterapia né dalla sola chemioterapia. Le neoplasie, infatti, spesso crescono indipendentemente dalla terapia. La causa di morte per la maggior parte dei pazienti é l'invasione locale del tumore.

Una combinazione di chirurgia, chemioterapia e radioterapia é stata efficace in alcuni pazienti (Kurukahvecioglu *et al.*, 2007), sia per la sopravvivenza sia per il controllo locale della malattia, evitando il soffocamento causato dall'invasione tracheale (Haigh *et al.*, 2001; De Crevoisier *et al.*, 2004).

Nel report di Venkatesh, l'11% di pazienti che ricevevano sia radioterapia che la chemioterapia sopravvissero per una media di 13 mesi (Venkatesh *et al.*, 1990). Tallroth suddivise 47 pazienti in 4 gruppi di trattamento (Tallroth *et al.*, 1987). Il primo gruppo ricevette metotrexate e radioterapia (30-40 Gy) ed ebbe una sopravvivenza media totale di 9 mesi. Il secondo gruppo ricevette bleomicina, ciclofosfamide, fluorouracile e radioterapia ed ebbe una sopravvivenza media di 4 mesi. Il terzo gruppo ricevette la stessa terapia del secondo

gruppo con l'aggiunta della resezione chirurgica; anche in questo gruppo la sopravvivenza media era di 4 mesi. Il quarto gruppo ricevette doxorubicina, radioterapia e la resezione chirurgica ed ebbe anche una sopravvivenza media di quattro mesi.

Dei 34 pazienti trattati con bleomicina, ciclofosfamide, fluorouracile e radioterapia, solamente 11 morirono per la crescita locale. Werner ebbe risultati simili con l'associazione di chemioterapia e radioterapia a fasci esterni (Werner *et al.*, 1984). La maggior parte dei pazienti con carcinoma tiroideo a cellule anaplastiche giganti non sopravvisse più a lungo a causa dell'ostruzione delle vie aeree causata dalla crescita locale del tumore.

Dopo aver fatto diagnosi di ATC con FNAB o biopsia incisionale, Tezelman e Clark somministrarono bleomicina da una a due ore prima di ogni dose di radioterapia e il fluorouracile prima di ogni secondo trattamento (Tezelman e Clark, 1995). Tre settimane dopo questa terapia di associazione chemio/radioterapica fu eseguita la tiroidectomia per rimuovere la maggior parte del tumore. La radioterapia e la chemioterapia venivano di nuovo utilizzate 2-3 settimane dopo. Questo metodo di trattamento preveniva la recidiva del tumore nel collo e l'ostruzione completa delle vie aeree. Il trattamento del paziente richiede molta attenzione per il controllo del dolore, per la pervietà delle vie aeree e per altri aspetti relativi alla qualità di vita. Risultati variabili sono stati riportati con diversi agenti chemioterapici, includendo il paclitaxel, il fluorouracile e l'idrossiurea in aggiunta alla radioterapia.

Paclitaxel fu aggiunto al fluorouracile e all'idrossiurea a causa della sua attività sul tumore testa-collo e la sua capacità di migliorare l'efficacia della radiazione. Studi clinici hanno dimostrato l'effetto benefico del paclitaxel con una percentuale di risposta del 53% (Ain *et al.*, 2000). I regimi multimodali di trattamento aggressivi mostrano un miglioramento nel controllo locale nei pazienti con ATC. Le percentuali di sopravvivenza per pazienti con ATC rimangono, comunque, basse.

## 1.5 Nuovi agenti farmacologici

Recentemente sono stati individuati diverse mutazioni e differenti meccanismi patogenetici che portano alla formazione di tumori, alla loro dedifferenziazione e allo sviluppo di resistenza ai trattamenti. In differenti studi é stato dimostrato il ruolo centrale delle tirosin-chinasi (TK) e dei recettori delle TK (TKR) come il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), il recettore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR), le vie di trasduzione del segnale RET, BRAF, RAS/RAF/ERK e RAS/PI3K/AKT. Queste vie sono in grado di determinare la trasformazione cellulare inviando segnali mitogeni e di sopravvivenza, come nel caso del carcinoma tiroideo (Knauf, 2011; Romei e Elisei, 2012; Howell *et al.*, 2013) e in altre patologie neoplastiche (Ledford, 2015).

A conferma di quanto affermato, le nuove terapie antineoplastiche utilizzano come bersaglio le TK e i TKR. Gli inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) sono molecole che competono con i siti di legame dell'ATP su i TKR bloccando, in questo modo, l'attivazione delle TK e, quindi, la via di segnale oncogenica (Wells e Santoro, 2014).

Attualmente sono stati studiati diversi TKI (Ye *et al.*, 2010; Gild *et al.*, 2011; Knauf, 2011), molti dei quali sono stati anche approvati per il trattamento di alcune tipologie di carcinomi come, a esempio, l'imatinib per l'anemia mieloide cronica (Baccarani *et al.*, 2015), il sorafenib per il carcinoma tiroideo avanzato resistente alla radioiodio terapia (Fallahi *et al.*, 2013), vandetanib e cabozantinib per il trattamento del carcinoma midollare della tiroide (MTC).

Tra i diversi TKI, sono stati prodotti e testati composti derivanti dalle pirazolopirimidine, i quali presentano un'utile attività antineoplastica. Le pirazolopirimidine sono costituite da un anello pirazolico fuso con la porzione pirimidinica diversamente da quanto avviene con l'imidazolo per la porzione purinica (Dinakaran *et al.*, 2012).

All'inizio le pirazolopirimidine sono state studiate come antagonisti del recettore adenosinico. Sono stati prodotti diversi composti chimici con cuore centrale pirazolopirimidinico e, recentemente, Mahajan *et al.* hanno pubbli-

cato un articolo su i target ACK1-TK inibenti la proliferazione delle cellule tumorali, comprendendo i derivati pirazolo[3,4-d]pyrimidinici (Mahajan e Mahajan, 2013). Esistono svariati isomeri delle pirazolopirimidine con differenti meccanismi d'azione e possibili usi come l'attività antivirale (Chern *et al.*, 2004), antimicrobica (Bakavoli *et al.* 2010), antitumorale (Baviskar *et al.*, 2013), antileucemica, antitubercolosa, radioprotettiva, etc.

Le pirazolopirimidine sono state valutate su differenti target tra cui RET, VEGFR, EGFR, Abl, Src, Aurora kinase e altri, ognuno dei quali è coinvolto nello sviluppo, nella progressione e nella trasformazione di molti tumori.

I principali derivati pirazolopirimidinici analizzati sono: gli inibitori Abl, per la loro azione antiproliferativa in linee cellulari umane di leucemia; gli inibitori Src, valutati per l'azione antineoplastica diretta contro la proliferazione di cellule di neuroblastoma; gli inibitori delle aurora chinasi, con buona attività antitumorale nelle cellule leucemiche; gli inibitori della fosfolipasi D, per la capacità di inibire l'adesione cellulare riducendo così la migrazione del plasminogeno urochinasico che inibiscono l'attività dell'enzima urochinasasi riducendo la proliferazione cellulare; PP1 e PP2, che inibiscono la crescita cellulare, in particolare in linee cellulari di PTC, inibendo le oncoproteine RET, e CLM3, CLM29 e CLM94 di cui si approfondirà più avanti.

## 1.6 CLM3, CLM29 e CLM94

Recentemente è stato dimostrato che CLM3 o (R)-1-phenethyl-N-(1-phenylethyl)-1H-pirazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine, possa essere un inibitore multiplo del segnale di trasduzione, includendo RET-TK, BRAF, EGFR e con attività angiogenica. CLM3 ha mostrato un effetto antiangiogenico con una marcata attività inibitoria in linee cellulari umane di carcinoma tiroideo e un'azione antiproliferativa e proapoptotica in specifiche linee cellulari (Antonelli *et al.*, 2011).

Sartini *et al.* (Sartini *et al.*, 2014) hanno studiato nuovi derivati di CLM3 per poter meglio comprendere l'azione farmacologica sui siti di legame dell'ATP di VEGFR2 e RET. Le nuove molecole sono state testate per le loro proprietà inibitorie delle TK e per i loro effetti antiproliferativi diretti con-

tro linee cellulari endoteliali e di carcinoma tiroideo umano, rivelando un promettente profilo antiproliferativo sulle linee di MTC.

L'attività antitumorale e antiangiogenica dei nuovi composti cicloamidici CLM94 (Antonelli *et al.*, 2011), come anche CLM3 e CLM29 (una pirazolo[3,4-d]pyrimidina che inibisce RET, EGFR, VEGFR) e con attività antiangiogenica, è stata dimostrata in cellule primarie di ATC come si analizzerà in seguito (Antonelli *et al.*, 2011). Antonelli *et al.* hanno dimostrato che CLM29 inibisce la migrazione nelle cellule di PTC dedifferenziato. Questo effetto inibitorio è risultato essere indipendente dalla presenza della mutazione  $V^{600E}$ BRAF. È stata ottenuta spontaneamente in coltura una linea cellulare di PTC dedifferenziato (AL) presentante la mutazione  $V^{600E}$ BRAF in grado di crescere in topi nu/nu dopo essere stata iniettata a livello sottocutaneo. Gli autori hanno osservato che CLM29 aumenta l'espressione di TSP-1 nella linea cellulare AL. L'attività antineoplastica di CLM29 potrebbe essere il risultato della combinazione degli effetti antiproliferativi e dell'aumentata apoptosi nelle cellule tumorali e dell'inibizione della migrazione e della neovascolarizzazione neoplastica. I meccanismi che sottointendono l'inibizione della neovascolarizzazione neoplastica è probabilmente associata alla sovraregolazione dei principali inibitori endogeni dell'angiogenesi come TSP-1, infatti, CLM29 aumenta l'espressione di TSP-1 presentando svariati effetti antiangiogenici come l'apoptosi delle cellule endoteliali e l'interazione di diverse proteine extracellulari coinvolte nel processo angiogenico come VEGF (Tan e Lawler, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

Ferrari *et al.* (Ferrari *et al.*, 2014) hanno riportato l'attività antineoplastica e antiangiogenica *in vitro* di CLM94 e di CLM3 in colture cellulari primarie di MTC e nella linea cellulare TT, avente la mutazione RET C634W, e nelle cellule MZCRC-1, presentanti la mutazione Met891Thr. Questi composti inibiscono *in vitro* la proliferazione delle TT e delle cellule primarie di MTC, aumentando in parte i livelli di apoptosi. L'effetto inibitorio di CLM94 e CLM3 sembrerebbe indipendente dalla presenza della mutazione RET nelle cellule primarie di MTC. Questi risultati confermerebbero la possibilità che CLM3 e CLM94 siano inibitori delle multiple vie di segnale di trasduzione, includendo RET-TK, EGFR, VEGFR, e presentino effetti anti-

angiogenici. Una riduzione significativa dell'espressione di VEGF-A è stata, inoltre, osservata nelle cellule TT dopo trattamento con CLM3 e CLM94.

Recentemente, è stato testato CLM29 nell'MTC, sia in cellule primarie, ottenute da intervento chirurgico, sia in cellule TT con mutazione RET C634W (Antonelli *et al.*, 2014). CLM29 (10, 30, 50  $\mu$ M) ha inibito significativamente la proliferazione e ha aumentato la percentuale di apoptosi nelle cellule primarie di MTC e nelle TT. L'inibizione della proliferazione indotta da CLM29 è simile nelle cellule primarie di MTC indipendentemente dalla presenza della mutazione RET. Anche in questo lavoro le cellule TT sono state iniettate a livello sottocutaneo in topi CD nu/nu e dopo 20-30 giorni è stato possibile individuare la massa tumorale. CLM29 ha ridotto significativamente la crescita, la dimensione e la densità microvascolare della massa tumorale. Questi dati hanno dimostrato l'attività antineoplastica di CLM29 nell'MTC sia *in vitro* che *in vivo*, aprendo la strada per future valutazioni cliniche (Antonelli *et al.*, 2014).

## Capitolo 2

### Scopo della Tesi

L'ATC é caratterizzato da una veloce proliferazione, da un rapido aumento nelle dimensioni e un forte potenziale invasivo (Ain, 1998), che permette a questa forma tumorale maligna di superare la ghiandola tiroidea per estendersi soprattutto a livello di ossa, polmoni e cervello.

Nonostante siano state testate varie tipologie di trattamento, tra cui la combinazione dell'intervento chirurgico con la radioterapia e/o la chemioterapia, che sembra oggi migliorare la prognosi di questi pazienti (Junor *et al.*, 1992), l'ATC risulta in realtà ancora resistente a molte terapie.

Sono state proposte nuove strategie di trattamento, tra cui l'utilizzo di nuovi agenti farmacologici, come i TKI al fine di ottenere ulteriori progressi nel trattamento da adottare per questa forma di malignità.

Scopo della presente tesi é stato quello di valutare, *in vitro* (in colture cellulari di ATC) e *in vivo* (in topi CD nu/nu), gli effetti antiproliferativi, antiapoptotici e anti-angiogenici di un derivato pirazolo[3,4-d]pyrimidinico, il CLM3, al fine di screenare i pazienti capaci di dare una risposta positiva a questo tipo di trattamento ed evitare la successiva somministrazione di farmaci inefficaci e con potenziali elevati effetti collaterali in pazienti in cui il trattamento darebbe esiti negativi.

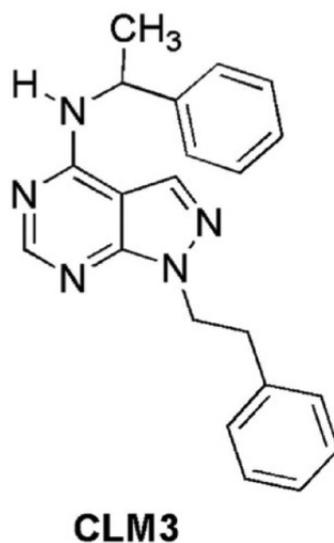
La possibilità di testare la sensibilità dei TKI o di altri farmaci in cellule in coltura primaria derivanti da ogni singolo paziente potrebbe permettere, infatti, di aumentare l'efficacia del successivo trattamento.

# Capitolo 3

## Materiali e metodi

### 3.1 Sintesi del composto

Il derivato pirazolo[3,4-d]pyrimidinico, CLM3, é stato sintetizzato presso il Dipartimento di Farmacologia dell'Universitá di Pisa, come riportato in diverse pubblicazioni (Antonelli *et al.*, 2011; Bocci *et al.*, 2011). In breve, l'alchilazione del 3-amino-4-pirazolocarbonitrile con il 2-bromoethylbenzene, seguito dalla ciclizzazione con acido formico bollente, produce l'intermedio chiave, 1-phenethyl-1H-pirazolo[3,4-d]pyrimidin-4(5H)-one. Il trattamento con phosphoryl trichloride produce il corrispondente derivato 4-chloro, il quale porta all'inibitore CLM3 (Fig.4.1) reagendo con (R)-(+)-1-phenylethylamine in presenza di triethylamine. La soluzione stock del composto testato é stata preparata in dimetilsulfossido sterile ed é stata conservata in aliquote a -80°C.



**Figura 3.1:** Struttura del derivato pirazolo[3,4-d]pirimidinico, CLM3.

## 3.2 Tessuti tiroidei

Il tessuto tiroideo per l'allestimento delle colture primarie é stato ottenuto da 6 pazienti affetti da ATC e da 6 soggetti sani, sottoposti a paratiroidectomia. La diagnosi é stata stabilita secondo i comuni e approvati criteri clinici, laboratoristici e istologici (Antonelli *et al.*, 2008a; 2008b; 2009a). L'immunostochimica ha dimostrato l'assenza di espressione del recettore dell'ormone tireostimolante (TSH), della tireoperossidasi, della tireoglobulina e del sim-

porto sodio/iodio. È stata eseguita la microdissezione e l'estrazione del DNA che ha permesso di individuare la mutazione BRAF con l'utilizzo della PCR single-strand per i polimorfismi e il sequenziamento diretto con l'utilizzo di metodi convenzionali (Antonelli *et al.*, 2008a; 2008b; 2009a).

### 3.3 Allestimento delle colture primarie

#### 3.3.1 Colture primarie di cellule follicolari tiroidee sane

Gli espianti tiroidei sono stati suddivisi in condizioni di sterilità in frammenti più piccoli con l'aiuto di forbici e bisturi e digeriti con collagenasi (1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germania) in terreno RPMI 1640 (Whittaker Bio-products, Inc., Walkersville, MD, USA) per 1 ora a 37°C. Successivamente, sono stati rimossi i follicoli semidigeriti, centrifugati per 2 min e messi in coltura in terreno RPMI 1640, contenente glutammina (2 mM - Sigma-Aldrich, Milano, Italia), penicillina/streptomicina (50 µg/ml - Sigma-Aldrich, Milano, Italia), e integrato con Fetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v (Seromed, Biochrom, Berlin, Germania), inattivato al calore (Antonelli *et al.*, 2006). Le cellule sono cresciute in un incubatore a 37°C in atmosfera satura di umidità e CO<sub>2</sub> al 5%. Raggiunta all'incirca l'80% di confluenza, le cellule sono state distaccate, incubandole per circa 3 minuti in una soluzione contenente tripsina 5 g/l ed EDTA sodico 0,2 g/l, risospese nel loro terreno di coltura e riseminate a densità opportuna.

#### 3.3.2 Colture primarie di cellule di ATC

Il tessuto neoplastico è stato finemente ridotto in frammenti di 1-3 mm di dimensioni con l'aiuto di forbici e bisturi. I frammenti sono stati lavati da 3 a 5 volte in terreno M-199 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), contenente penicillina (500 U/ml - Sigma-Aldrich, Milano, Italia), streptomicina (500 U/ml - Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e nistatina (1000 U/ml - Sigma-Aldrich, Milano, Italia). In seguito, il tessuto è stato risospeso in terreno DMEM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), contenente glutammina (2 mM - Sigma-Aldrich, Milano, Italia), penicillina (100 U/ml) e streptomicina (50 µg/ml - Sigma-

Aldrich, Milano, Italia), e integrato con Fetal Calf Serum (FCS) 10% v/v, inattivato al calore. Le cellule sono cresciute in un incubatore a 37°C in atmosfera satura di umidità e CO<sub>2</sub> al 5%. Raggiunta all'incirca l'80% di confluenza, le cellule sono state distaccate incubandole per circa 3 minuti in una soluzione contenente tripsina 5 g/l ed EDTA sodico 0,2 g/l, risospese nel loro terreno di coltura e riseminate a densità opportuna.

### 3.3.3 Linea cellulare AF

Tra sei delle colture cellulari primarie di ATC preparate, una è riuscita a superare il cinquantesimo passaggio. Questa linea (linea cellulare AF) è stata in grado di crescere nel topo nu/nu una volta inoculata a livello sottocutaneo, come vedremo in seguito.

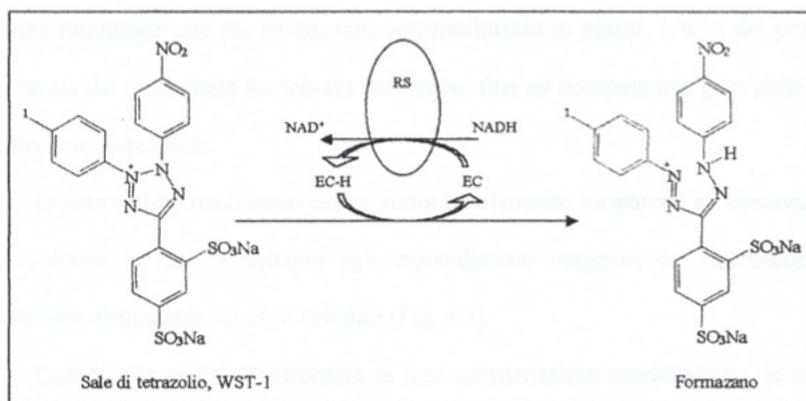
### 3.3.4 Linea cellulare 8305C

La linea cellulare 8305C (derivante da un carcinoma della tiroide non differenziato con componente papillare, linea cellulare presente nel catalogo DSMZ delle linee cellulari umane e animali), usata come controllo, è stata mantenuta in terreno RPMI 1640 (Whittaker Bioproducts, Inc., Walkersville, MD, USA) integrato con il 15% di FBS e L-glutammina (2 mM - Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

## 3.4 Saggi di vitalità e proliferazione cellulare

Per determinare la proliferazione cellulare delle linee ATC, cellule follicolari tiroidee (TFC), 8305C e AF è stato usato il saggio di vitalità e proliferazione basato sul clivaggio del sale di tetrazolio aggiunto nel mezzo di coltura (Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Diagnostics) (Antonelli *et al.*, 2008b; 2009a). Il reagente WST-1 è composto da un sale di tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonato) e da un accettore intermedio di elettroni. Il sale di tetrazolio è ridotto da NADH e NADPH, prodotti dalle cellule vive, attraverso un meccanismo che coinvolge l'anione superossido, infatti, la superossido dismutasi inibisce tale riduzione,

che sembra avvenire a livello della membrana plasmatica (Berridge *et al.*, 2005). Il prodotto di questa reazione é un formazano solubile nel mezzo di coltura con un picco massimo di assorbimento a 450 nm (Fig. 3.2).



**Figura 3.2:** Riduzione del sale di tetrazolio a formazano da parte di un sistema cellulare riducente (RS); EC, accettore intermedio di elettroni.

Un'espansione nel numero di cellule vitali porta a un incremento complessivo dell'attività della deidrogenasi mitocondriale nel campione, che porta all'incremento della formazione del formazano, che é direttamente correlato al numero di cellule metabolicamente attive nella coltura. Il formazano prodotto dalle cellule metabolicamente attive é stato quantificato da uno spettrofotometro (lettore di piastre ELISA) misurando l'assorbanza a 450 nm. Le cellule ATC, TFC, 8305C e AF sono state seminate nel loro terreno di coltura completo in una piastra per colture cellulari da 96 pozzetti alla densità di 35 000 cells/ml in un volume finale di 100  $\mu$ l per pozzetto. Per determinare l'IC50 di CLM3, é stato aggiunto ai pozzetti (in quadruplicato) un range di concentrazioni di CLM3, e l'IC50 é stata determinata utilizzando

l'interpolazione lineare. Al termine del periodo d'incubazione ai 100  $\mu$ l sono stati aggiunti in ogni pozzetto 10  $\mu$ l di Cell Proliferation Reagent WST-1 ed é stata misurata l'assorbanza a 450 nm rispetto al controllo (il campione senza trattamento). In alcuni pozzetti é stato aggiunto lo stesso volume di terreno di coltura completo e di Cell Proliferation Reagent WST-1 in modo da ottenere un background di controllo come bianco (assorbanza del terreno di coltura completo con WST-1 in assenza di cellule). L'assorbanza é stata misurata subito dopo l'aggiunta del WST-1 (tempo 0), dopo 1 e 2 ore. Il valore della lettura del bianco é stato sottratto dal controllo e dai trattati e il controllo é stato normalizzato al 100% per ogni saggio; i trattamenti sono espressi come % del controllo. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per ogni coltura cellulare. Le concentrazioni di CLM3 utilizzate negli esperimenti *in vitro* sono le seguenti: 5, 10, 30, e 50  $\mu$ M nelle ATC e nelle TFC o 1, 5, 10, 30, 50, o 100  $\mu$ M nelle 8305C e nelle AF. Le cellule sono state seminate e trattate dopo 24 ore con CLM3 o con il solo veicolo.

## 3.5 Determinazione dell'apoptosi

### 3.5.1 Captazione dell'Hoechst

Le linee cellulari di ATC, 8305C e AF sono state seminate nel loro terreno di coltura completo in una piastra per colture cellulari da 96 pozzetti alla densità di 35 000 cells/ml in un volume finale di 100  $\mu$ l per pozzetto. A questo punto le cellule, trattate con CLM3, sono state mantenute nell'incubatore per 48 ore a 37°C in atmosfera satura di umidità e  $CO_2$  al 5% e sono state colorate con l'Hoechst 33342 (Antonelli *et al.*, 2009b). E' stato calcolato, quindi, l'indice apoptotico (rapporto tra le cellule apoptotiche e il numero totale di cellule) x 100.

### 3.5.2 Saggio dell'Annexina V

Le cellule sono state seminate nel loro terreno di coltura completo nel Lab-TekII Chamber Slide System (Nalge Nunc International), trattate con CLM3 per 48 ore. Al termine del tempo d'incubazione le cellule sono state

colorate utilizzando l'Annexin V-FIT Fluorescence Microscopy Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguendo le istruzioni del produttore e sono state osservate a un microscopio a fluorescenza (Leica). Le immagini sono state ottenute grazie al collegamento della fotocamera Leica DFC320.

### 3.6 Migrazione e Invasione

La migrazione e l'invasione cellulare sono state determinate usando una piastra Transwell da 96 pozzetti con supporto permeabile (Corning Life Sciences) seguendo le indicazioni del produttore. Le cellule sono state affamate per 5 ore utilizzando un terreno di coltura privo di FBS a 37°C, 5%  $CO_2$ , sono state staccate utilizzando una soluzione di PBS e 5 mM EDTA e sono state contate. Le cellule sono state centrifugate, risospese nel terreno di coltura senza siero e sono state seminate ( $0.5 \times 10^5$  cells/well). FCS 10% (v/v) (o terreno di coltura privo di siero come controllo negativo) è stato aggiunto ai pozzetti riceventi (per produrre un gradiente) e, dove indicato, sono state aggiunte concentrazioni crescenti di CLM3 in entrambe le Transwell chambers. Il mezzo di coltura è stato rimosso e nel compartimento più basso è stata aggiunta una soluzione di calceina AM ( $2 \mu\text{g/ml}$ ; Sigma-Aldrich) per 1 ora. La fluorescenza è stata letta da un lettore di piastre ELISA con i filtri settati a 485 nm per l'eccitazione e a 520 nm per l'emissione. Per il saggio di migrazione si è utilizzato un periodo d'incubazione di 12 ore mentre per l'invasione 24 ore. Solo per l'invasione è stata utilizzata una soluzione overnight per la membrana basale (Trevigen) (basement membrane extract (Trevigen) solution) per coattare (37°C, 5%  $CO_2$ ) gli inserti prima di seminare le cellule. Una curva standard, con differenti concentrazioni cellulari, è stata preparata per ogni saggio in modo da permettere la conversione della fluorescenza.

### 3.7 Inibizione di fosfo-EGFR e fosfo-VEGFR-2

Le linee cellulari 8305C e AF ( $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto) sono state seminate e mantenute in terreno di coltura con l'1% di FBS. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate per 72 ore con CLM3 a una concentrazione ap-

prossimativamente vicino all'IC50 sperimentale della proliferazione cellulare (15  $\mu\text{M}$  per le 8305C e 25  $\mu\text{M}$  per le AF), alla concentrazione piú alta (100  $\mu\text{M}$ ) e alla concentrazione piú bassa (1  $\mu\text{M}$ ) o con il solo veicolo. I lisati sono stati raccolti e saggiati come segue:

- PathScan phospo-EGFR (Tyr1173) e totale EGFR sandwich ELISA kits (Cell Signaling Technology); oppure
- PathScan phospo-VEGFR-2 (Tyr1175) e con totale VEGFR-2 sandwich ELISA kits (Cell Signaling Technology).

### 3.8 ERK 1/2 e Akt ELISA

Le colture cellulari di 8305C e AF (5 x 10<sup>4</sup> cellule/pozzetto) sono state trattate per 72 ore con CLM3 e lisate. Ogni campione é stato testato per la fosforilazione di ERK1/2 umano e Akt dal PhosphoDetect ERK1/2 (pThr185/pTyr187) ELISA kit e dal PhosphoDetect Akt (pThr308) ELISA kit (Calbiochem, EMD Millipore) e sono state normalizzate per la concentrazione totale di proteine misurata da ERK1/2 e Akt ELISA kit, rispettivamente.

### 3.9 Quantificazione della ciclina D1

Per analizzare come CLM3 modula la proteina ciclina D1, le cellule 8305C e le AF sono state trattate per 72 ore con CLM3 alle concentrazioni sopra citate o con il solo veicolo. Per quantificare la ciclina D1, le cellule sono state direttamente lisate con 0.5 ml di buffer di lisi 1x freddo. I lisati sono stati raccolti e sonicati in ghiaccio per 10 secondi. I campioni sono stati, quindi, microcentrifugati per 10 min a 4 °C e il sovrantante é stato raccolto. I lisati delle cellule tumorali sono stati testati seguendo le istruzioni del produttore del kit ELISA per la ciclina D1 umana (USCN Life Science and Technology Co).

## 3.10 Studi *in vivo*

### 3.10.1 Xenotrapianto di AF in topi CD nu/nu e CLM3

Per gli studi *in vivo* sono stati utilizzati topi CD nu/nu maschi con peso di circa 20-25 g. La vitalità delle cellule AF è stata valutata dall'esclusione del colorante trypan blue e il giorno zero,  $1.3 \times 10^6$  cellule/topo sono state inoculate sottocute e misurate. I topi sono stati raggruppati in modo casuale in gruppi di sei. I topi svilupparono il tumore ( $50 \text{ mm}^3$ ) e, dopo 27 giorni dall'inoculo delle cellule, è stato somministrato 50 mg/Kg/die di CLM3 intraperitoneale per 21 giorni. Al gruppo di controllo è stato somministrato intraperitonealmente il solo veicolo (la concentrazione di dimetilsolfossido utilizzata per diluire la dose di CLM3 dei topi trattati). Dopo 48 giorni dall'inoculo delle cellule, i topi sono stati soppressi con un overdose di anestetico.

### 3.10.2 Immunoistochimica e densità microvascolare

Il tessuto tumorale dei due gruppi trattati diversamente è stato pesato, fissato in formalina e incluso in paraffina. È stata effettuata una sezione del tumore ( $5 \mu\text{m}$  di spessore) che è stata colorata con l'ematosilina-eosina. L'espressione di VEGF è stata saggiata con l'anticorpo policlonale anti-VEGF di coniglio (Santa Cruz Biotechnology) utilizzato a una diluizione 1:50 ed è stata valutata come percentuale di cellule positive su un totale di massimo 1000 cellule tumorali. La conta microvascolare è stata determinata utilizzando l'anticorpo policlonale anti-FVIII (Ventana Medical Systems).

## 3.11 Analisi dei dati

I valori ottenuti sono forniti come media  $\pm$  SD per variabili normalmente distribuite, oppure come la mediana e l'intervallo interquartile. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte con le cellule di ogni donatore e sono state riportate le loro medie in sei esperimenti da differenti donatori, sia per i campioni sani, sia per i campioni di ATC. I valori della media del gruppo sono

stati confrontati con l'ANOVA a una via per variabili normalmente distribuite, oppure, con il Mann-Whitney  $U$  o Kruskal-Wallis test. Le proporzioni sono state confrontate con il  $\chi^2$  test. Comparazioni *post hoc* su variabili normalmente distribuite sono state effettuate utilizzando il Bonferroni-Dunn test. I dati relativi all'apoptosi sono stati analizzati utilizzando l'ANOVA a una via con il Newman-Keuls test per comparazioni multiple.

# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1 Test nelle linee cellulari di ATC

#### 4.1.1 Saggio di proliferazione

I dati ottenuti dal saggio di proliferazione cellulare WST-1 nelle cellule di ATC hanno dimostrato una riduzione significativa della proliferazione rispetto al controllo con CLM3 a 1 e 2 ore ( $p < 0.01$ , ANOVA) (Fig. 4.1A). La conta cellulare a due ore ha confermato questo risultato. Nelle cellule di ATC la conta cellulare era di  $18315 \pm 805$  per  $100 \mu\text{l}$  per pozzetto;  $19850 \pm 1132$  (92%) con CLM3  $5 \mu\text{M}$ ;  $15752 \pm 1203$  (86%) con CLM3  $10 \mu\text{M}$ ;  $9158 \pm 903$  (50%) con CLM3  $30 \mu\text{M}$  e  $7143 \pm 896$  (39%) con CLM3  $50 \mu\text{M}$ ; ( $p < 0.01$ , ANOVA). L'IC<sub>50</sub> é stato determinato utilizzando l'interpolazione lineare ed era  $31.2 \pm 7.9 \mu\text{M}$ . La mutazione  $V^{600E}$ BRAF é stata osservata in due linee di ATC mentre le mutazioni RET/PTC1 e RET/PTC3 non sono state individuate nelle linee cellulari primarie di ATC dalla Real-Time PCR. I dati sull'inibizione della proliferazione dovuta a CLM3 sono simili sia in presenza sia in assenza della mutazione  $V^{600E}$ BRAF.

#### 4.1.2 Apoptosi

La percentuale di apoptosi delle cellule di ATC aumentava in modo dose-dipendente: dopo trattamento con CLM3  $10 \mu\text{M}$ , il 5.7% delle cellule era in apoptosi e questa percentuale aumentava dal 12.5% al 18% rispettivamente

con CLM3 30  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ , ANOVA) (Fig. 4.1B). Il saggio con l'annessina V é stato utilizzato per avere un'ulteriore conferma dell'induzione dell'apoptosi.

### 4.1.3 Migrazione e Invasione

Le cellule di ATC sono state portate alla confluenza e trattate con dosi crescenti di CLM3. La migrazione e l'invasione sono state testate in Transwell chambers (Corning Life Sciences), rivelando un'inibizione sia della migrazione (Fig. 4.2A) che dell'invasione (Fig. 4.2B).

## 4.2 Test nelle linee cellulari 8305C e AF

### 4.2.1 Proliferazione e apoptosi

CLM3 ha dimostrato un'attività antiproliferativa dose dipendente sia nella linea cellulare 8305C (IC<sub>50</sub> di  $16.7 \pm 6.8 \mu\text{M}$ ) (Fig. 4.3A) sia nella linea cellulare AF (IC<sub>50</sub> di  $26.1 \pm 5.8 \mu\text{M}$ ) (Fig. 4.3B). La percentuale di apoptosi nelle 8305C aumentava in dipendenza della concentrazione: dopo trattamento con CLM3 10  $\mu\text{M}$ , il 6.8% delle cellule era in apoptosi e questa percentuale aumentava dal 18.1% al 24.3% rispettivamente con CLM3 30  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ , ANOVA) (Fig. 4.3C). La percentuale di apoptosi nelle cellule AF, come per le 8305C, aumentava in dipendenza della concentrazione: dopo trattamento con CLM3 10  $\mu\text{M}$ , il 6.3% delle cellule era in apoptosi e questa percentuale aumentava dal 15.6% al 22.5% rispettivamente con CLM3 30  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ , ANOVA) (Fig. 4.3D).

### 4.2.2 EGFR e fosforilazione di ERK1/2 e Akt

In seguito all'esposizione a differenti concentrazioni di CLM3, la forma fosforilata di EGFR era significativamente ridotta nei lisati cellulari in maniera concentrazione-dipendente, sia nella linea cellulare 8305C sia nella linea cellulare AF (Fig. 4.4A e B). Le linee cellulari esaminate non esprimono VEGFR-2. Il rapporto tra ERK1/2 fosforilato e non fosforilato e il dosaggio delle proteine Akt, misurato con il test ELISA nei campioni trattati con

CLM3, era significativamente ridotto sia nella linea cellulare 8305C sia nella linea cellulare AF (Fig. 4.4C, D, E, F).

### 4.2.3 Ciclina D1

CLM3, in modo dose-dipendente, ha inibito l'espressione genica della ciclina D1 sia nella linea cellulare 8305C (Fig. 4.4G) sia nella linea cellulare AF (Fig. 4.4H) ( $p < 0.05$ ). Sulla base di questi dati, sono stati misurati i livelli intracellulari di proteina ciclina D1 nelle cellule trattate con il composto e nelle cellule trattate con il solo veicolo.

## 4.3 Studi *in vivo*

### 4.3.1 Dimensione del tumore

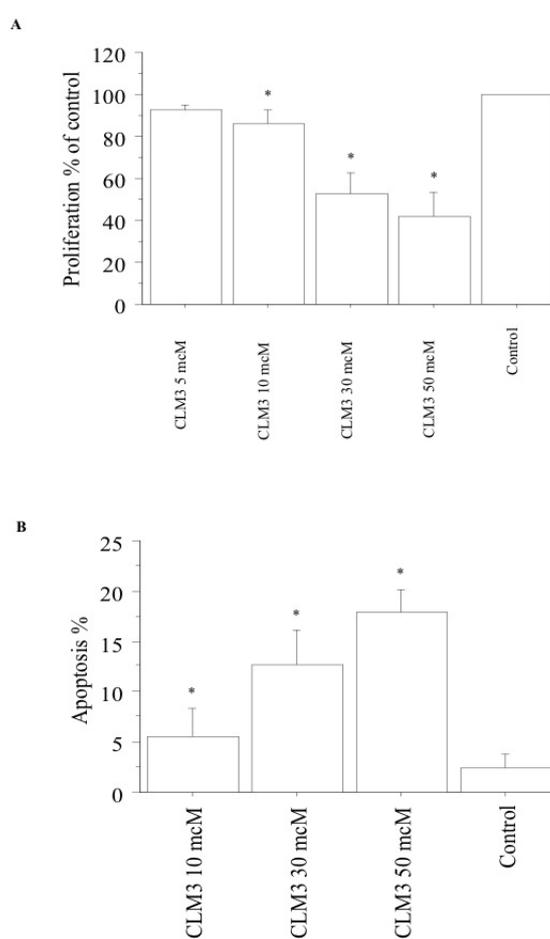
Dopo 15 giorni dall'inoculo è stato possibile individuare la massa tumorale e gli animali del gruppo di controllo mostravano un aumento progressivo della massa con rallentamento al giorno 39. Al giorno 48, sia gli animali del gruppo di controllo che quelli del gruppo trattato, sono stati sacrificati (Fig. 4.5). CLM3 (50 mg/kg/die) ha inibito significativamente la crescita tumorale a partire dal giorno 16 dopo l'inizio del trattamento rispetto al controllo (Fig. 4.5A). L'espianto del tumore ha confermato una significativa riduzione di peso nel gruppo trattato con CLM3 rispetto al gruppo di controllo (Fig. 4.5B). Gli animali del gruppo trattato con CLM3 non mostravano una significativa perdita di peso (Fig. 4.5C).

### 4.3.2 Espressione di VEGF-A e densità microvascolare

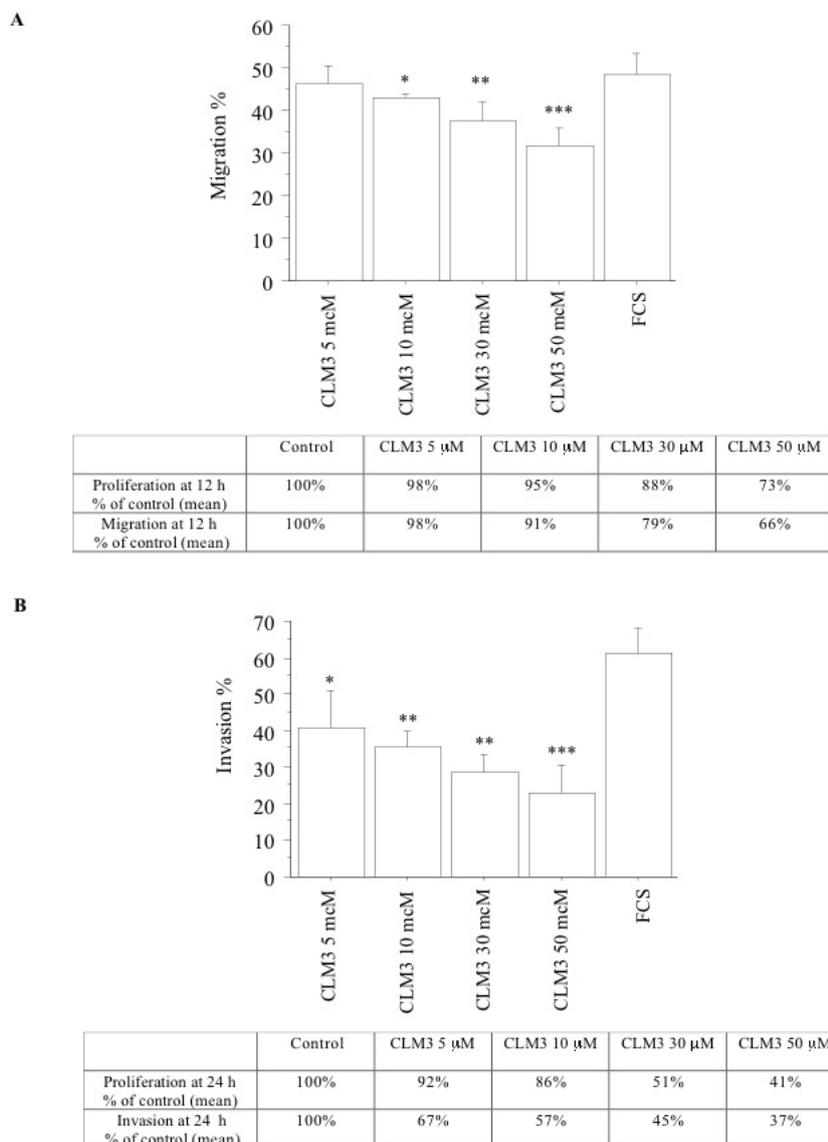
La linea cellulare AF ha prodotto un tumore che presentava un tipo istologico compatibile con quello dell'ATC (Fig. 4.6A). Il composto CLM3 riduceva significativamente VEGF come indicato in Fig. 4.6B ( $p < 0.05$ ). Una ben definita immunoreattività di VEGF-A, come mostrato nell'immagine microscopica, è, infatti, localizzata nelle cellule tumorali del gruppo di controllo (Fig. 4.6C) ma è ridotta nelle cellule tumorali dopo trattamento con CLM3

(Fig. 4.6D) ( $55\pm 7$  vs  $32\pm 4$ , %), con una contemporanea riduzione della densità microvascolare ( $13\pm 2$  vs  $24\pm 5$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4.6F e E).

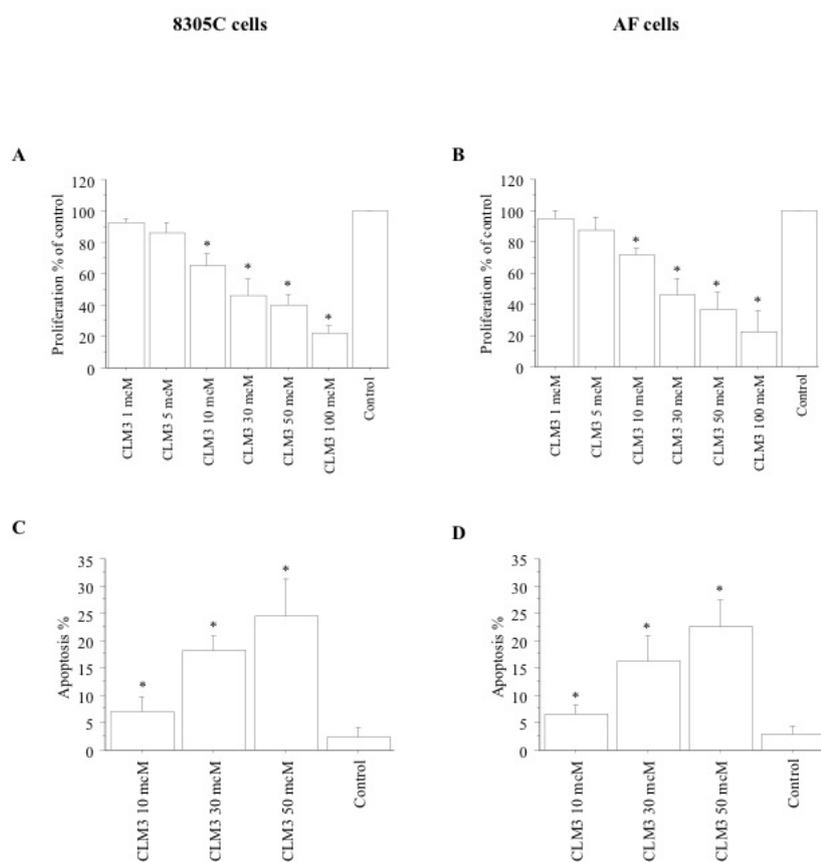
## 4.4 Figure e tabelle



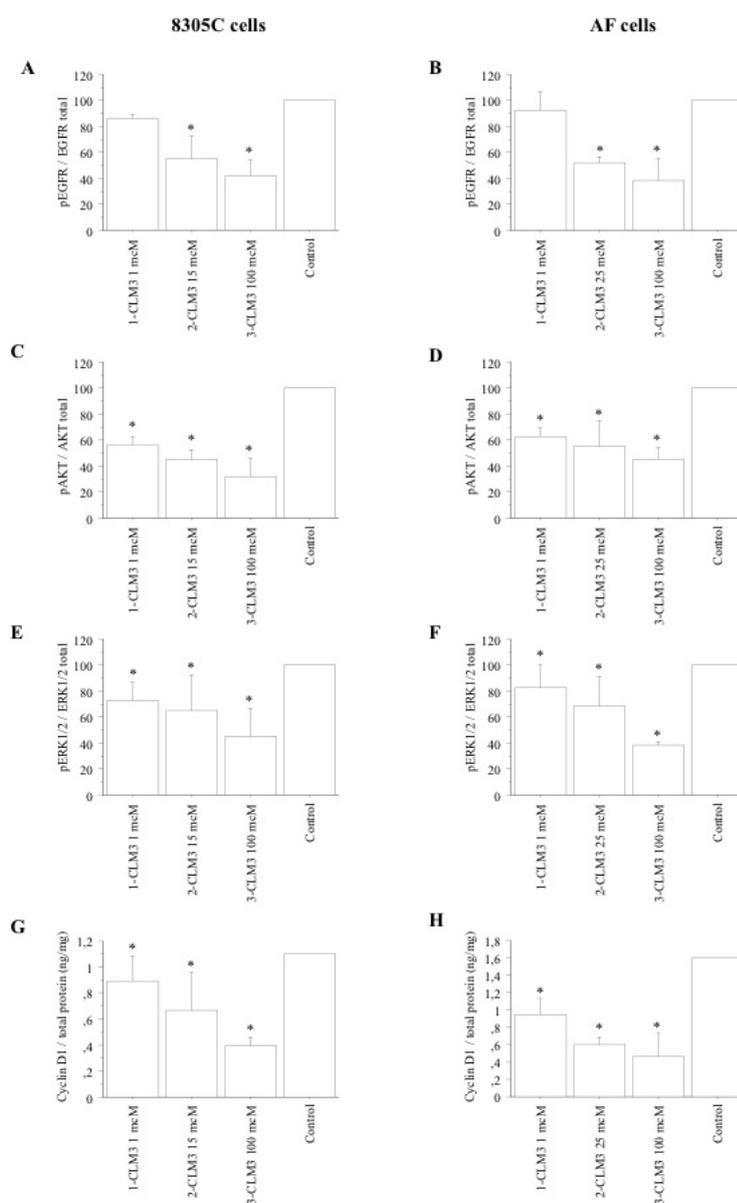
**Figura 4.1:** Saggio di proliferazione WST-1 a 2 ore dall'inizio della reazione di tetrazolio (media $\pm$ SD di tutti i campioni) nelle cellule di ATC (A) trattate con CLM3 per 24 ore e apoptosi nelle cellule di ATC dopo trattamento con CLM3 per 48 ore (media $\pm$ SD di tutti i campioni) (B).



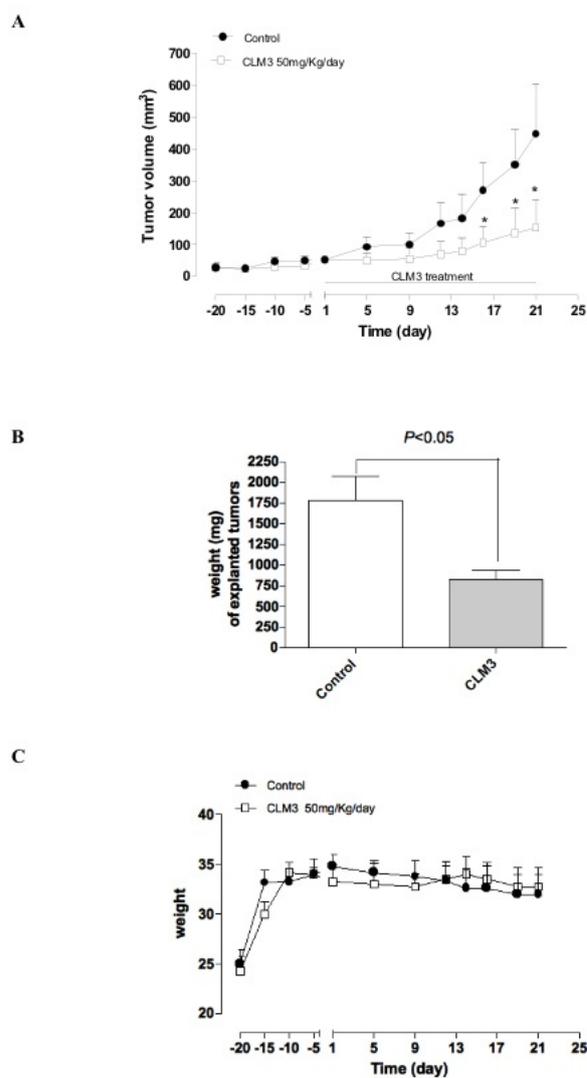
**Figura 4.2:** Migrazione (A) e invasione (B) nelle cellule di ATC trattate rispetto al controllo. Per la migrazione le cellule sono state incubate 12 ore mentre per l'invasione 24 ore. Nelle tabelle sottostanti le figure, sono state riportate le percentuali di inibizione sia della migrazione che dell'invasione in confronto alla percentuale di inibizione della proliferazione.



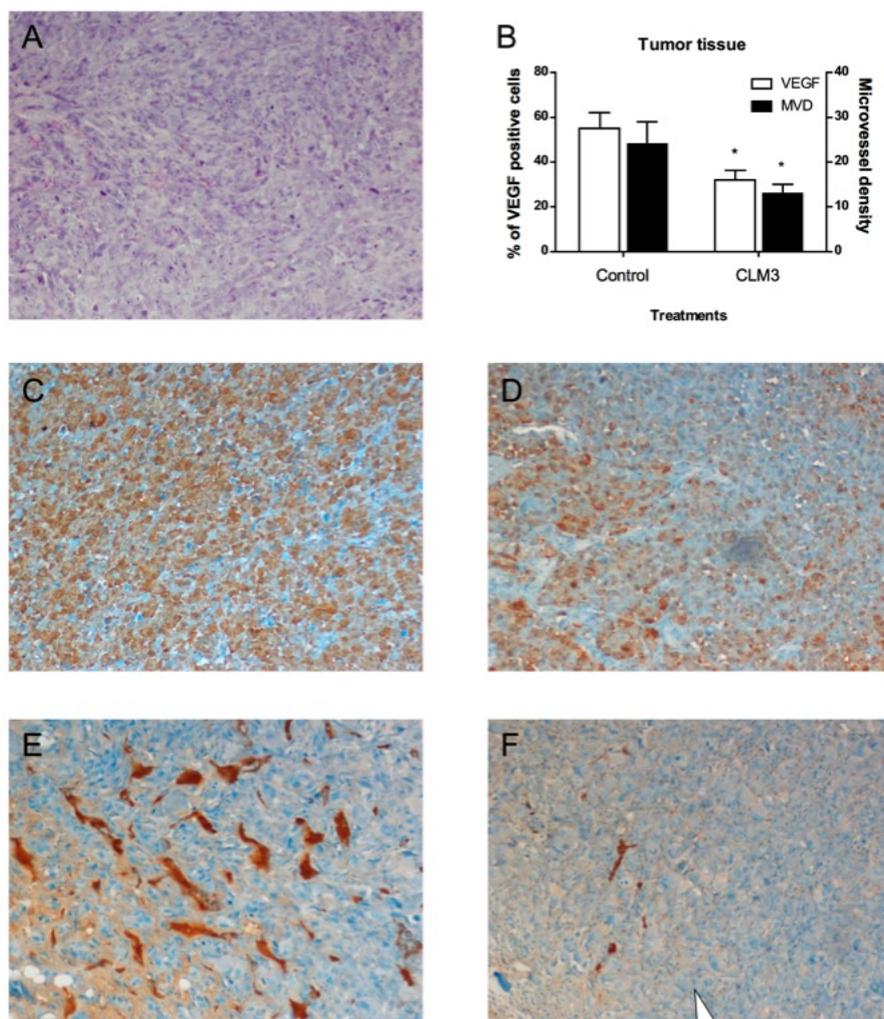
**Figura 4.3:** Saggio di proliferazione WST-1 a 2 ore dall'inizio della reazione di tetrazolio (media $\pm$ SD di tutti i campioni) nella linea cellulare 8305C (A) e nella linea cellulare AF (B) trattate con CLM3 per 24 ore e l'apoptosi nelle 8305C (C) e nelle cellule AF (D) dopo trattamento con CLM3 per 48 ore.



**Figura 4.4:** Inibizione della fosforilazione di EGFR nelle cellule 8305C (A) e nelle cellule AF (B) dopo 72 ore di trattamento con CLM3 e inibizione della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 nelle cellule 8305C (C ed E rispettivamente) e nelle cellule AF (D e F rispettivamente) dopo 72 ore dal trattamento. Tutti i dosaggi sono stati effettuati con un kit ELISA. La concentrazione della ciclina D1 è stata misurata nelle cellule 8305C (G) e nelle cellule AF (H) dopo 72 ore di trattamento con CLM3 o il solo veicolo.



**Figura 4.5:** Confronto della crescita tumorale nel gruppo di controllo rispetto al gruppo dei trattati con CLM3 (50 mg/Kg/die) (A). Peso del tumore nel gruppo di controllo rispetto al gruppo dei trattati (B). Perdita di peso (C), non significativo, del gruppo dei trattati rispetto a quello di controllo.



**Figura 4.6:** Immagine istologica della massa tumorale sviluppatasi dopo inoculo delle cellule AF in topi CD nu/nu, dopo colorazione ematossilina-eosina, compatibile con tipologia istologica di ATC (A). CLM3 riduceva l'espressione di VEGF e la densità microvascolare (MVD) nella massa tumorale (B). Rappresentazione microscopica dell'immunoreattività di VEGF-A localizzata nelle cellule tumorali del gruppo di controllo (C) e nel gruppo dei trattati con CLM3 (D). Rete microvascolare nel tessuto tumorale di controllo (E) significativamente ridotta dopo trattamento con CLM3 (F).

# Capitolo 5

## Discussione

L'ATC é una delle forme tumorali piú aggressive nell'ambito della chirurgia endocrina (Shaha, 2004). Esso costituisce soltanto l'1-2% di tutti i tumori tiroidei, ma é responsabile di piú del 50% delle circa 1200 morti annue attribuite al carcinoma tiroideo (Ain, 1998).

Questa forma tumorale maligna si manifesta improvvisamente come una massa in rapida crescita a livello della ghiandola tiroidea da una pre-esistente patologia tiroidea benigna o da un carcinoma differenziato (Gilliland *et al.*, 1997), ed é caratterizzata da una veloce proliferazione, da un rapido aumento nelle dimensioni e un elevato potenziale invasivo (Ain, 1998), che le permette di superare la ghiandola tiroidea per estendersi soprattutto a livello di ossa, polmoni e cervello. Al momento della diagnosi la maggior parte dei pazienti (>50%) si presenta con una forma giá metastatizzata, con un tempo di sopravvivenza media di 4-12 mesi (Nel *et al.*, 1985; Tan *et al.*, 1995).

Nonostante siano stati testati diversi approcci terapeutici, tra cui la combinazione dell'intervento chirurgico con la radioterapia e/o la chemioterapia che sembra oggi migliorare la prognosi di questi pazienti (Junor *et al.*, 1992), l'ATC é ancora resistente a molte terapie.

Sono state, quindi, proposte nuove strategie di trattamento, tra cui l'utilizzo di nuovi agenti farmacologici come i TKI, al fine di ottenere nuove informazioni per comprendere la patogenesi e il miglior trattamento da attuare per questa forma di malignitá. I TKI sono attualmente valutati come possibile cura per il trattamento dell'ATC (Antonelli *et al.*, 2012a).

In questa tesi si é dimostrato che il derivato pirazolo[3,4-d]pyrimidinico CLM3 é in grado di inibire *in vitro* la proliferazione di cellule primarie di ATC incrementandone l'apoptosi. CLM3, inoltre, é capace di inibire la migrazione e l'invasione delle cellule di ATC, ridurre la crescita tumorale delle cellule di AF in topi CD nu/nu in assenza di tossicitá e ridurre la densitá microvascolare nel tessuto tumorale AF. A oggi, altri derivati pirazolo[3,4-d]pyrimidinici sono stati testati per carcinomi tiroidei umani con riarrangiamenti RET/PTC (Hanke *et al.*, 1996; Carlomagno *et al.*, 2002a; Carlomagno *et al.*, 2003). Le cellule primarie di ATC utilizzate per questo studio sono tutte RET/PTC negative e l'effetto antiproliferativo di CLM3 é stato osservato in tutte le linee indipendentemente dalla presenza/assenza della mutazione <sup>V600E</sup>BRAF.

I dati ottenuti confermano il concetto che CLM3 puó essere utilizzato come inibitore di differenti vie di trasduzione di segnale, inclusi la tirosin-chinasi RET, EGFR, AKT, ERK, etc, e che possiede un effetto antiangiogenetico.

AKT sembrerebbe giocare un ruolo importante nell'ATC, infatti, é stato dimostrato che l'inibizione farmacologica e molecolare del fosfatidilinositol 3-chinasi e delle isoforme di AKT, *in vitro*, é in grado di ridurre la proliferazione e la migrazione in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano (Shinohara *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Nell'ATC sono state evidenziate le vie di RAS-RAF-MAPK chinasi-ERK e fosfatidilinositol 3-chinasi sono, inoltre, entrambe coinvolte nella patogenesi del carcinoma della tiroide e mutazioni, in uno di questi geni, sono state trovate nell'ATC (Santarpia *et al.*, 2008). Entrambe le proteine ERK e AKT risultano fosforilate e, quindi, attivate nell'ATC, suggerendo che queste molecole potrebbero essere importanti obiettivi terapeutici.

Dai dati ottenuti si é osservato che la fosforilazione di ERK 1/2 e Akt é significativamente inibita dal CLM3 nelle linee cellulari 8305C e AF. In queste cellule é, inoltre, inibita significativamente la fosforilazione di EGFR sempre grazie all'azione inibente del CLM3. Queste osservazioni sono in accordo con quanto dimostrato da Di Desidero *et al.* (Di Desidero *et al.*, 2013), sull'inibizione della fosforilazione di EGFR da parte del Sunitinib in cellule di ATC.

La ciclina D1 é un importante regolatore della progressione del ciclo cel-

lulare (Klein e Assoian, 2008). Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2008) hanno osservato l'espressione a differenti livelli della ciclina D1 nel 67% dei casi di ATC analizzati. Wiseman *et al.* (Wiseman *et al.*, 2007) ne hanno riportato una forte sovraespressione nel 77% dei casi. Vandetanib, duplice inibitore delle tirosin-chinasi (agisce su EGFR e VEGFR-2), inibisce la proliferazione cellulare attraverso la sottoregolazione dell'espressione della ciclina D1 e della ciclina E (Sarkar *et al.*, 2010). CLM3 é stato in grado di sottoregolare la proteina ciclina D1 nelle cellule 8305C come anche nelle cellule della linea AF.

Nelle cellule primarie di ATC, il valore di IC50 di CLM3 per la proliferazione cellulare é di 31  $\mu\text{M}$  mentre nella linea 8305C é di 16  $\mu\text{M}$  e nella linea cellulare AF 26  $\mu\text{M}$ . Questi valori sono simili a quelli dei derivati del 2-indolinone che sono all'incirca intorno al 3  $\mu\text{M}$  e piú alti rispetto a quelli di ZD6474 (1  $\mu\text{M}$ ) (Carlomagno *et al.*, 2002b) o di 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3, 4-d]pyrimidine (Carlomagno *et al.*, 2002a) e di 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (Carlomagno *et al.*, 2003) ( $< 5 \mu\text{M}$ ) (valutati in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano) e sono abbastanza simili al valore IC50 di CLM3 per la proliferazione in colture cellulari primarie di carcinoma dedifferenziato della tiroide (33  $\mu\text{M}$ ) (Antonelli *et al.*, 2011).

CLM3 inibisce significativamente la crescita del tumore AF nei topi CD nu/nu in assenza di perdita di peso che potrebbe indicare un basso profilo tossicologico, mentre, altri composti presentano diversi effetti collaterali sia negli animali sia nell'uomo (Ye *et al.*, 2010), tuttavia, non ci sono dati relativi al fegato, ai reni e altri test biochimici che saranno eseguiti successivamente nello studio. La combinazione degli effetti antiproliferativi associati con l'aumentata apoptosi nelle cellule tumorali, l'inibizione della migrazione e dell'invasione e l'inibizione della neovascolarizzazione tumorale potrebbero rappresentare l'attività antineoplastica del CLM3 nell'ATC.

Nuovi approcci terapeutici nella cura dell'ATC sono in via di sviluppo, anche se esistono ancora diverse limitazioni nella selezione di nuovi composti. Nonostante, infatti, nel tessuto tumorale siano presenti potenziali target, come BRAF, la risposta antitumorale potrebbe essere presente soltanto in una parte dei pazienti. Una mancata risposta potrebbe essere, per esempio,

che l'inibizione di un obiettivo porti all'attivazione di una via di segnale compensatoria, la quale riattiva la crescita tumorale.

La possibilità di testare la sensibilità a diversi TKI delle cellule di ATC di ciascun soggetto potrebbe aumentare l'efficacia del trattamento. I test *in vitro*, infatti, sono in grado di predire *in vivo* l'efficacia nel 60% dei casi (Blumenthal e Goldenberg, 2007), mentre è noto che il test di chemiosensibilità negativo *in vitro* è associato al 90% d'inefficacia del trattamento *in vivo* (Blumenthal e Goldenberg, 2007; Antonelli *et al.*, 2010), questo permetterebbe di evitare la somministrazione di chemioterapici inefficaci in questi pazienti (Antonelli *et al.*, 2008a; 2008b; 2012a; 2012b).

In questa tesi sono stati dimostrati gli effetti antitumorali diretti di CLM3 (inibitore multitargets delle chinasi con attività antiangiogenica) in colture cellulari primarie di ATC da pazienti, aprendo la strada alla possibilità di personalizzare la terapia con i TKI per ogni paziente e a futuri studi clinici di fase 0 e fase 1.

# Capitolo 6

## Conclusioni

I TKI sono molecole che competono con l'ATP su i TKR, bloccando l'attivazione delle TK e, quindi, delle vie oncogeniche; ne sono stati studiati diversi e alcuni di loro sono stati approvati di recente per il trattamento di diversi tipi di tumore.

Tra i differenti TKI, la struttura chimica piú studiata é quella del core eterociclico "pyrazolo[3,4-d]pyrimidine", che ha dimostrato di avere lo scheletro piú versatile per ottenere composti efficaci. Attualmente, i derivati appartenenti a questa classe strutturale hanno mostrato un largo spettro di utilizzi, essendo agenti multitarget.

La presente tesi ha evidenziato la possibilitá di testare, *in vitro* in cellule di ATC umano in coltura primaria ottenute da espianati chirurgici, e *in vivo* in topi CD nu/nu, l'effetto antiproliferativo, proapoptotico e antiangiogenico esercitato dal CLM3, derivato del pyrazolo[3,4-d]pyrimidine.

La valutazione *in vitro* della sensibilitá a questi nuovi agenti farmacologici (TKI e in particolare CLM3) in cellule tumorali derivanti dalla coltura primaria, potrebbe permettere di selezionare i pazienti capaci di dare una risposta positiva a questo tipo di trattamento e di evitare, quindi, l'eventuale successiva somministrazione di farmaci inefficaci e con effetti collaterali importanti.

La possibilitá di testare la sensibilitá a TKI o ad altri farmaci nei pazienti affetti da ATC in cellule di coltura primaria aumenterebbe l'efficacia del successivo trattamento.

Ulteriori studi saranno necessari per poter rendere possibile la personalizzazione della terapia con i TKI e non solo, per ogni paziente affetto da ATC.

# Capitolo 7

## Letteratura citata

Ahuja S, Ernst H. Chemotherapy of thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest.* 1987;10:303-10.

Ain KB. Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches. *Thyroid.* 1998;8:715-26.

Ain KB, Egorin MJ, DeSimone PA. Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group. *Thyroid.* 2000;10:587-94.

Antonelli A, Bocci G, La Motta C, Ferrari SM, Fallahi P, Corrado A, Fioravanti A, Sartini S, Orlandi P, Piaggi S, Corti A, Materazzi G, Galleri D, Ulisse S, Fontanini G, Danesi R, Da Settimo F, Miccoli P. CLM29, a multi-target pyrazolopyrimidine derivative, has anti-neoplastic activity in medullary thyroid cancer in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;393:56-64.

Antonelli A, Bocci G, La Motta C, Ferrari SM, Fallahi P, Fioravanti A, Sartini S, Minuto M, Piaggi S, Corti A, Ali G, Berti P, Fontanini G, Danesi R, Da Settimo F, Miccoli P. Novel pyrazolopyrimidine derivatives as tyrosine kinase inhibitors with antitumoral activity in vitro and in vivo in papillary

dedifferentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E288-96.

Antonelli A, Bocci G, La Motta C, Ferrari SM, Fallahi P, Ruffilli I, Di Domenicantonio A, Fioravanti A, Sartini S, Minuto M, Piaggi S, Corti A, Ali G, Di Desidero T, Berti P, Fontanini G, Danesi R, Da Settimo F, Miccoli P. CLM94, a novel cyclic amide with anti-VEGFR-2 and antiangiogenic properties, is active against primary anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012b;97:E528-36.

Antonelli A, Fallahi P, Ulisse S, Ferrari SM, Minuto M, Saraceno G, Santini F, Mazzi V, D'Armiento M, Miccoli P. New targeted therapies for anaplastic thyroid cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012a;12:87-93.

Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Berti P, Materazzi G, Barani L, Marchetti I, Ferrannini E, Miccoli P. Primary cell cultures from anaplastic thyroid cancer obtained by fine-needle aspiration used for chemosensitivity tests. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008a;69:148-52.

Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Berti P, Materazzi G, Marchetti I, Ugolini C, Basolo F, Miccoli P, Ferrannini E. Evaluation of the sensitivity to chemotherapeutics or thiazolidinediones of primary anaplastic thyroid cancer cells obtained by fine-needle aspiration. *Eur J Endocrinol.* 2008b;159:283-91.

Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Berti P, Materazzi G, Minuto M, Giannini R, Marchetti I, Barani L, Basolo F, Ferrannini E, Miccoli P. Thiazolidinediones and antiproliferatives in primary human anaplastic thyroid cancer cells. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009a;70:946-53.

Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Frascerra S, Piaggi S, Gelmini S, Lupi C, Minuto M, Berti P, Benvenga S, Basolo F, Orlando C, Miccoli P. Dysregulation of secretion of CXC alpha-chemokine CXCL10 in papillary thyroid cancer: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocr Relat Cancer.* 2009b;16:1299-311.

Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Sebastiani M, Colaci M, Ruffilli I, Fallahi P. New targeted molecular therapies for dedifferentiated thyroid cancer. *J Oncol.* 2010;2010:921682.

Antonelli A, Rotondi M, Ferrari SM, Fallahi P, Romagnani P, Franceschini SS, Serio M, Ferrannini E. Interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:614-20.

Asakawa H, Kobayashi T, Komoike Y, Maruyama H, Nakano Y, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Monden M. Chemosensitivity of anaplastic thyroid carcinoma and poorly differentiated thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* 1997;17:2757-62.

Auersperg M, Us-Krasovec M, Petric G, Pogacnik A, Besic N. Results of combined modality treatment in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinoma. *Wien Klin Wochenschr.* 1990;102:267-70.

Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol.* 2015;94 Suppl 2:S141-7.

Bakavoli M, Bagherzadeh G, Vaseghifar M, Shiri A, Pordel M, Mashreghi M, Pordeli P, Araghi M. Molecular iodine promoted synthesis of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antibacterial agents. *Eur J Med Chem.* 2010;45:647-50.

Baviskar AT, Banerjee UC, Gupta M, Singh R, Kumar S, Gupta MK, Kumar S, Raut SK, Khullar M, Singh S, Kumar R. Synthesis of imine-pyrazolopyrimidinones and their mechanistic interventions on anticancer activity. *Bioorg Med Chem.* 2013;21:5782-93.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

Besic N, Auersperg M, Us-Krasovec M, Golouh R, Frkovic-Grazio S, Vodnik A. Effect of primary treatment on survival in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2001;27:260-4.

Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol.* 2007;35:185-97.

Bocci G, Fioravanti A, La Motta C, Orlandi P, Canu B, Di Desidero T, Mugnaini L, Sartini S, Cosconati S, Frati R, Antonelli A, Berti P, Miccoli P, Da Settimo F, Danesi R. Antiproliferative and proapoptotic activity of CLM3, a novel multiple tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with SN-38 on endothelial and cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:1309-16.

Busnardo B, Daniele O, Pelizzo MR, Mazzarotto R, Nacamulli D, Devido D, Mian C, Girelli ME. A multimodality therapeutic approach in anaplastic thyroid carcinoma: study on 39 patients. *J Endocrinol Invest.* 2000;23:755-61.

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Basolo F, Castellone MD, Melillo RM, Fusco A, Santoro M. Efficient inhibition of RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]-pyrimidine (PP2). *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1897-902.

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, Ryan AJ, Fontanini G, Fusco A, Santoro M. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res.* 2002b;62:7284-90.

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Napolitano M, Vecchio G, Fusco A, Gazit A, Levitzki A, Santoro M. The kinase inhibitor PP1 blocks tumorigenesis induced by RET oncogenes. *Cancer Res.* 2002a;62:1077-82.

Carty SE (2001) Anaplastic thyroid cancer. In: Doherty G, Skogeid B eds. Surgical Endocrinology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 127-134.

Chemotherapy Committee, the Japanese Society of Thyroid Surgery. Intensive chemotherapy for anaplastic thyroid carcinoma: Combination of cisplatin, doxorubicin, etoposide and peplomycin with granulocyte colony-stimulating factor support. *Jpn J Clin Oncol.* 1995;25:203-7.

Chern JH, Shia KS, Hsu TA, Tai CL, Lee CC, Lee YC, Chang CS, Tseng SN, Shih SR. Design, synthesis, and structure-activity relationships of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: a novel class of potent enterovirus inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14:2519-25.

Cobin RH, Gharib H, Bergman DA, Clark OH, Cooper DS, Daniels GH, Dickey RA, Duick DS, Garber JR, Hay ID, Kukora JS, Lando HM, Schorr AB, Zeiger MA; Thyroid Carcinoma Task Force. AACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: management of thyroid carcinoma. American Association of Clinical Endocrinologists. American College of Endocrinology. *Endocr Pract.* 2001;7:202-20.

De Crevoisier R, Baudin E, Bachelot A, Leboulleux S, Travagli JP, Caillou B, Schlumberger M. Combined treatment of anaplastic thyroid carcinoma with surgery, chemotherapy, and hyperfractionated accelerated external radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60:1137-43.

Demeter JG, De Jong SA, Lawrence AM, Paloyan E. Anaplastic thyroid carcinoma: risk factors and outcome. *Surgery.* 1991;110:956-61.

Di Desidero T, Fioravanti A, Orlandi P, Canu B, Giannini R, Borrelli N, Man S, Xu P, Fontanini G, Basolo F, Kerbel RS, Francia G, Danesi R, Bocci G. Antiproliferative and proapoptotic activity of sunitinib on endothelial and anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of Akt and ERK1/2 phosphorylation and by down-regulation of cyclin-D1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1465-73.

Dinakaran VS, Bomma B, Srinivasan KK. Fused pyrimidines: The heterocycle of diverse biological and pharmacological significance. *Der Pharma Chemica*, 2012;4:255-65.

Fallahi P, Ferrari SM, Santini F, Corrado A, Materazzi G, Ulisse S, Miccoli P, Antonelli A. Sorafenib and thyroid cancer. *BioDrugs.* 2013;27:615-28.

Ferrari SM, Fallahi P, La Motta C, Bocci G, Corrado A, Materazzi G, Galleri D, Piaggi S, Danesi R, Da Settimo F, Miccoli P, Antonelli A. Antineoplastic activity of the multitarget tyrosine kinase inhibitors CLM3 and CLM94 in medullary thyroid cancer in vitro. *Surgery.* 2014;156:1167-76.

Gild ML, Bullock M, Robinson BG, Clifton-Bligh R. Multikinase inhibitors: a new option for the treatment of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:617-24.

Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer.* 1997;79:564-73.

Giuffrida D, Gharib H. Anaplastic thyroid carcinoma: current diagnosis and treatment. *Ann Oncol.* 2000;11:1083-9.

Giuffrida D, Gharib H. Cardiac metastasis from primary anaplastic thyroid carcinoma: report of three cases and a review of the literature. *Endocr Relat*

*Cancer*. 2001;8:71-3.

Haddad R, Mahadevan A, Posner MR, Sullivan C. Long term survival with adjuvant carboplatin, paclitaxel, and radiation therapy in anaplastic thyroid cancer. *Am J Clin Oncol*. 2005;28:104.

Haigh PI, Ituarte PH, Wu HS, Treseler PA, Posner MD, Quivey JM, Duh QY, Clark OH. Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer*. 2001;91:2335-42.

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*. 1996;271:695-701.

Heron DE, Karimpour S, Grigsby PW. Anaplastic thyroid carcinoma: comparison of conventional radiotherapy and hyperfractionation chemoradiotherapy in two groups. *Am J Clin Oncol*. 2002;25:442-6.

Hölting T, Meybier H, Buhr H. Status of tracheotomy in treatment of the respiratory emergency in anaplastic thyroid cancer. *Wien Klin Wochenschr*. 1990b;102:264-6.

Hölting T, Möller P, Tschahargane C, Meybier H, Buhr H, Herfarth C. Immunohistochemical reclassification of anaplastic carcinoma reveals small and giant cell lymphoma. *World J Surg*. 1990a;14:291-4.

Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist*. 2013;18:926-32.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-

1995. *Cancer*. 1998;83:2638-48.

Junor EJ, Paul J, Reed NS. Anaplastic thyroid carcinoma: 91 patients treated by surgery and radiotherapy. *Eur J Surg Oncol*. 1992;18:83-8.

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005;103:1330-5.

Kihara M, Miyauchi A, Yamauchi A, Yokomise H. Prognostic factors of anaplastic thyroid carcinoma. *Surg Today*. 2004;34:394-8.

Kim JH, Leeper RD. Treatment of anaplastic giant and spindle cell carcinoma of the thyroid gland with combination Adriamycin and radiation therapy. A new approach. *Cancer*. 1983;52:954-7.

Kim JH, Leeper RD. Treatment of locally advanced thyroid carcinoma with combination doxorubicin and radiation therapy. *Cancer*. 1987 Nov 15;60(10):-2372-5.

Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Sugino K, Ozaki O, Mimura T, Ito K, Ito K, Tanaka S. Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:4043-9.

Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*. 2008;121:3853-7.

Knauf JA. Does the epidermal growth factor receptor play a role in the progression of thyroid cancer? *Thyroid*. 2011;21:1171-4.

Kobayashi T, Asakawa H, Umeshita K, Takeda T, Maruyama H, Matsuzuka F, Monden M. Treatment of 37 patients with anaplastic carcinoma of the

thyroid. *Head Neck*. 1996;18:36-41.

Kurukahvecioglu O, Ege B, Poyraz A, Tezel E, Taneri F. Anaplastic thyroid carcinoma with long term survival after combined treatment: case report. *Endocr Regul*. 2007;41:41-4.

Ledford H. Cancer: The Ras renaissance. *Nature*. 2015;520(7547):278-80.

Lee JJ, Au AY, Foukakis T, Barbaro M, Kiss N, Clifton-Bligh R, Staaf J, Borg A, Delbridge L, Robinson BG, Wallin G, Höög A, Larsson C. Array-CGH identifies cyclin D1 and UBCH10 amplicons in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:801-15.

Levendag PC, De Porre PM, van Putten WL. Anaplastic carcinoma of the thyroid gland treated by radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;26:125-8.

Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, Vasko V, El-Naggar AK, Xing M. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3106-16.

Lo CY, Lam KY, Wan KY. Anaplastic carcinoma of the thyroid. *Am J Surg*. 1999;177:337-9.

Mahajan K, Mahajan NP. ACK1 tyrosine kinase: targeted inhibition to block cancer cell proliferation. *Cancer Lett*. 2013;338:185-92.

McIver B, Hay ID, Giuffrida DF, Dvorak CE, Grant CS, Thompson GB, van Heerden JA, Goellner JR. Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution. *Surgery*. 2001;130:1028-34.

Miccoli P, Materazzi G, Antonelli A, Panicucci E, Frustaci G, Berti P. New trends in the treatment of undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Langenbecks. Arch Surg.* 2007;392:397-404.

Mitchell G, Huddart R, Harmer C. Phase II evaluation of high dose accelerated radiotherapy for anaplastic thyroid carcinoma. *Radiother Oncol.* 1999;50:33-8.

Nel CJ, van Heerden JA, Goellner JR, Gharib H, McConahey WM, Taylor WF, Grant CS. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 82 cases. *Mayo Clin Proc.* 1985;60:51-8.

Nilsson O, Lindeberg J, Zedenius J, Ekman E, Tennvall J, Blomgren H, Grimelius L, Lundell G, Wallin G. Anaplastic giant cell carcinoma of the thyroid gland: treatment and survival over a 25-year period. *World J Surg.* 1998;22:725-30.

Ordenez N, Baloch z, Matias-Guiu x, Evans H, Farid NR, Fagin JA, et al. (2004) Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. In: De Lellis RA, Lloyd RV, Hitz PU, Eng C, Editors, Pathology and Genetics?Tumor of Endocrine Organs. *WHO*; 77?80.

Pacheco-Ojeda LA, Martínez AL, Alvarez M. Anaplastic thyroid carcinoma in ecuador: analysis of prognostic factors. *Int Surg.* 2001;86:117-21.

Pierie JP, Muzikansky A, Gaz RD, Faquin WC, Ott MJ. The effect of surgery and radiotherapy on outcome of anaplastic thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2002;:57-64.

Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:54.

Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:278-84.

Sarkar S, Mazumdar A, Dash R, Sarkar D, Fisher PB, Mandal M. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3-K and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2010;9:592-603.

Sartini S, Coviello V, Bruno A, La Pietra V, Marinelli L, Simorini F, Taliani S, Salerno S, Marini AM, Fioravanti A, Orlandi P, Antonelli A, Da Settimo F, Novellino E, Bocci G, La Motta C. Structure-based optimization of tyrosine kinase inhibitor CLM3. Design, synthesis, functional evaluation, and molecular modeling studies. *J Med Chem.* 2014;57:1225-35.

Schlumberger M, Parmentier C, Delisle MJ, Couette JE, Droz JP, Sarrazin D. Combination therapy for anaplastic giant cell thyroid carcinoma. *Cancer.* 1991;67:564-6.

Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope.* 2004;114:393-402.  
Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer.* 1985;56:2155-60.

Shinohara M, Chung YJ, Saji M, Ringel MD. AKT in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology.* 2007;148:942-7.

Simpson WJ. Anaplastic thyroid carcinoma: a new approach. *Can J Surg.* 1980;23:25-7.

Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. Prognostic factors and the-

rapeutic strategy for anaplastic carcinoma of the thyroid. *World J Surg.* 2001;25:617-22.

Tallroth E, Wallin G, Lundell G, Löwhagen T, Einhorn J. Multimodality treatment in anaplastic giant cell thyroid carcinoma. *Cancer.* 1987;60:1428-31.

Tan K, Lawler J. The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:177-87.

Tan RK, Finley RK 3rd, Driscoll D, Bakamjian V, Hicks WL Jr, Shedd DP. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a 24-year experience. *Head Neck.* 1995;17:41-7.

Tennvall J, Lundell G, Wahlberg P, Bergenfelz A, Grimelius L, Akerman M, Hjelm Skog AL, Wallin G. Anaplastic thyroid carcinoma: three protocols combining doxorubicin, hyperfractionated radiotherapy and surgery. *Br J Cancer.* 2002;86:1848-53.

Tezelman S, Clark OH. Current management of thyroid cancer. *Adv Surg.* 1995;28:191-221.

Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer.* 1990;66:321-30.

Wang Y, Tsang R, Asa S, Dickson B, Arenovich T, Brierley J. Clinical outcome of anaplastic thyroid carcinoma treated with radiotherapy of once- and twice-daily fractionation regimens. *Cancer.* 2006;107:1786-92.

Wells SA Jr, Santoro M. Update: the status of clinical trials with kinase inhibitors in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1543-55.

Werner B, Abele J, Alveryd A, Björklund A, Franzén S, Granberg PO, Landberg T, Lundell G, Löwhagen T, Sundblad R, Tennvall J. Multimodal therapy in anaplastic giant cell thyroid carcinoma. *World J Surg.* 1984;8:64-70.

Wiseman SM, Masoudi H, Niblock P, Turbin D, Rajput A, Hay J, Bugis S, Filipenko D, Huntsman D, Gilks B. Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:719-29.

Wong CS, Van Dyk J, Simpson WJ. Myelopathy following hyperfractionated accelerated radiotherapy for anaplastic thyroid carcinoma. *Radiother Oncol.* 1991;20:3-9.

Ye L, Santarpia L, Gagel RF. The evolving field of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2010;31:578-99.

Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, Parangi S, Lawler J. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *FASEB J.* 2009;23:3368-76.