UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS

Effetti dell'Antibiotico Clofoctol su Cellule Tiroidee *in vitro*

Relatore:
Prof.ssa Paola Rebuzzini

Correlatore:
Dr.ssa Francesca Coperchini

Tesi Sperimentale di
Sara Acerbi

Anno Accademico 2025/2026

LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI 4

INTRODUZIONE 7

CAPITOLO 1 7

1. LA TIROIDE 7

1.1 Struttura, Funzione e Fisiologia della Tiroide 7

1.2 Patologie della Tiroide 9

1.2.1 Tiroiditi e Tireotossicosi 9

1.2.2 Ipertiroidismo 10

1.2.3 Ipotiroidismo 11

1.3 l Tumore della Tiroide 12

1.3.1 Classificazione 12

1.3.2 Diagnosi del Tumore 13

1.3.3 La Biologia Molecolare del Tumore 14

1.3.4 Terapia del Tumore 16

CAPITOLO 2 21

2. IL MICROAMBIENTE TUMORALE 21

2.1 Che cos'è e da cosa è composto 21

2.1.1. Componente Solida 21

2.1.2 Componente Solubile 23

2.2 Le Chemochine 25

2.2.1 CXCL8 27

2.2.2 CCL2 29

2.3 Il Microambiente Tumorale Tiroideo 31

2.4 Strategie Alternative e Innovative nella Cura del Tumore della Tiroide 33

CAPITOLO 3 37

3. RIPOSIZIONAMENTO DEI FARMACI 37

3.1 Perché è importante 37

3.2 Casi principali 38

3.3 Clofoctol 39

CAPITOLO 4 45

4. SCOPO DEL LAVORO 45

CAPITOLO 5 46

5. MATERIALI E METODI 46

5.1 Linee Cellulari di Tiroide in coltura 46

5.2 WST-1 come Saggio della Vitalità 46

5.4 Saggio di Formazione delle Colonie 48

5.5 Analisi immunofluorescente di Stress del RE e Vacuolizzazione 49

5.6 ELISA per CXCL8 e CCL2 50

5.7 Real-time PCR 51

5.8 Analisi Statistica 52

CAPITOLO 6 53

6. RISULTATI 53

6.1 Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la vitalità cellulare 53

6.2 Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la proliferazione cellulare 55

6.3 Clofoctol riduce la formazione di colonie in linee cellulari tumorali tiroidee 56

6.4 Clofoctol induce vacuolizzazione e stress associato al RE in linee cellulari tiroidee 57

6.5 Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CXCL8 in cellule tiroidee 59

6.6 Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CCL2 in cellule tiroidee 61

6.7 Clofoctol riduce i livelli di espressione degli mRNA di CXCL8 e CCL2 in linee cellulari tiroidee.....62

CAPITOLO 7 63

7. DISCUSSIONE.....63

CAPITOLO 8 65

8. CONCLUSIONE.....65

CAPITOLO 9 66

9. BIBLIOGRAFIA.....66

LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI

Ab – *Antibody* o Anticorpo

ADT – *Androgen Deprivation Therapy* o Terapia di Deprivazione Androgenica

Ag – *Antigen* o Antigene

AKT – *Ak strain Thynoma* o Proteinchinasi B

ATC – *Anaplastic Thyroid Cancer* o Tumore Anaplastico della Tiroide

ATDs – *Anti-Thyroid Drugs* o Farmaci AntiTiroidei

CAF – *Cancer-Associated Fibroblasts* o Fibroblasti Associati al Tumore

CCL2 – *C-C motif Chemokine Ligand 2* o Ligando della Chemochina con motivo C-C 2

cMET – *Hepatocyte Growth Factor Receptor* o Recettore del Fattore di Crescita degli Epatociti

CXCL8 – *C-X-C motif Chemokine Ligand 8* o Ligando della Chemochina con motivo C-X-C 8

DC – *Dendritic Cells* o Cellule Dendritiche

DIT – Diiodiotirosina

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMT – *Epithelial-Mesenchymal Transition* o Transizione Epitelio-Mesenchimale

ER – *Estrogen Receptor* o Recettore per gli Estrogeni

FANS – Farmaci Non Steroidei

FBS – *Fetal Bovine Serum* o Siero Fetale di Bovino

FDA – *Food and Drug Administration*

FGF – *Fibroblast Growth Factor* o Fattore di Crescita dei Fibroblasti

FGFR – *FGF Receptor* o Recettore di FGF

FNAB – *Fine Needle Aspiration Biopsy* o Agoaspirato

FTC – *Follicular Thyroid Cancer* o Tumore Follicolare della Tiroide

GPCR – *G Protein-Coupled Receptors* o Recettori accoppiati alle Proteine G

GSC – *Glioma Stem Cells* o Cellule Staminali Gliomali

HER2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* o Recettore per il Fattore di Crescita Epidermico Umano 2

hTG – *human Thyroglobuln* o Tireoglobulina umana

HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* o Cellule Endoteliali della Vena Ombelicale Umana

IC_{50} – *Half-maximal Inhibitory Concentration* o Concentrazione Inibente al 50%

IFN-γ – *Interferon γ* o Interferone γ

Ig – *Immunoglobulin* o Immunoglobuline

IL-2 – *Interleukin 2* o Interleuchina 2

IL-6 – *Interleukin 6* o Interleuchina 6

IL-8 – *Interleukin 8* o Interleuchina 8

INF-α – *Interferon α* o Interferone α

JHDL – *Johns Hopkins Drug Library*

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinases* o Proteina Chinasi Attivata da Mitogeni

MET – *Mesenchymal-Epithelial Transition* o Transizione Epitelio-Mesenchimale

MIT – Monoiodiotirosina

MMP – *Matrix Metalloproteinase* o Metalloproteasi della Matrice

MTC – *Medullary Thyroid Cancer* o Tumore Midollare Neuroendocrino della Tiroide

NF-kB – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* o Fattore di Trascrizione Nucleare kB

NHT – *Normal Human Thyroid cells* o Cellule Tiroidee Umane Normali

NIS – Na^+/I^- *Symporter* o Simporto Na^+/I^-

NTRK – *Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase* o Recettore della Tirosin Chinasi Neurotrofico

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* o Tampone Fosfato Salino

PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor* o Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine

PDGFR – *PDGF Receptor* o Recettore del PDGF

PD-1 – *Programmed Death-1 Receptor* o Recettore di Morte Programmata 1

PFA – *Paraformaldehyde* o Paraformaldeide

PI3 – Fosfatidilinositolo-3

PI3K – *PI3 Kinase* o PI3 Chinasi

PIP_2 – fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato

PIP_3 – fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato

PR – *Progesteron Receptor* o Recettore per il Progesterone

PTC – *Papillary Thyroid Cancer* o Tumore Papillare della Tiroide

RAI – *RadioActive Iodine* o Terapia allo Iodio Radioattivo

RE – *Endoplasmatic Reticulum* o Reticolo Endoplasmatico

RER – *Rough Endoplasmatic Reticulum* o Reticolo Endoplasmatico Ruvido

RH – *Releasing Hormones* o Fattori di Rilascio

ROS – *Reactive Oxygen Species* o Specie Reattive dell'Ossigeno

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction* o Reazione a Catena della Polimerasi in Tempo Reale

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* o Sodio Dodecil Solfato

SE – *Endocrin System* o Sistema Endocrino

SGLT – *Sodium-Glucose Linked Transporter* o Co-trasportatore Sodio/Glucosio

SNC – *Central Nervous System* o Sistema Nervoso Centrale

STR – *Short Tandem Repeats* o Microsatelliti

TAM – *Tumor-Associated Macrophages* o Macrofagi Associati al Tumore

TBG – *Tiroxine-Binding Protein* o Proteina che lega la Tiroxina

TEM – *Tumoral Extracellular Matrix* o Matrice Extracellulare Tumorale

TGF-β – *Transforming Growth Factor β* o Fattore di Crescita Trasformante β

TKI – *Tyrosin-kinase Inhibitors* o Inibitori delle Tirosin-chinasi

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor α* o Fattore di Necrosi Tumorale α

TPO – *Thyroperoxidase* o Tireoperossidasi

TRH – *Thyrotropin Releasing Hormone* o Tireoliberina

TRK – *Tyrosine Kinase Receptors* o Recettori Tirosin Chinasici

TSA – *Tumor Specific Antigens* o Antigeni Specifici del Tumore

TSH – *Thyroid-Stimulating Hormone* o Ormone Tireostimolante

TSHR – *TSH Receptors* o Recettore del TSH

T2DM – *Type 2 Diabetes Mellitus* o Diabete Mellito di Tipo 2

T3 – Triiodotironina

T4 – Tetraiodotironina o Tiroxina

UPR – *Unfolded Protein Response* o Risposta alle Proteine Non Ripiegate

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* o Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare

VEGFR – *VEGF Receptor* o Recettore di VEGF

WST-1 – *Water-Soluble Tetrazolium Dye* o Colorante Idrosolubile con Sali di Tetrazolio

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

1. LA TIROIDE

1.1 Struttura, Funzione e Fisiologia della Tiroide

La ghiandola tiroidea o tiroide è una ghiandola endocrina impari mediana posta nella parte inferiore del collo, davanti alla laringe, tra la quinta vertebra cervicale C5 e la prima vertebra toracica T1. Macroscopicamente, la tiroide è formata da due lobi principali uniti da un istmo centrale, che donano alla ghiandola la sua tipica forma a farfalla. Può presentare un terzo lobo, detto piramidale o di Morgagni, che si origina centralmente dall'istmo e si prolunga cefalicamente (Barbatelli, et al. 2021). La tiroide è un organo di tipo parenchimatoso, e quindi non cavo, ed è pertanto rivestita da una capsula di tessuto connettivo fibroso da cui si dipartono setti connettivali che dividono il parenchima in lobuli. I lobuli sono a loro volta composti da migliaia di follicoli tiroidei. Il follicolo tiroideo rappresenta l'unità funzionale e strutturale della tiroide: questo è composto da tireociti organizzati in un epitelio cubico semplice che formano la parete del follicolo e che delimitano una cavità centrale al follicolo. Questa cavità che si presenta otticamente vuota al microscopio ottico è, in realtà, ripiena di colloide, una sostanza eosinofila dall'aspetto gelatinoso che funge da accumulo di precursori e prodotti della tiroide (Barbatelli, et al. 2021).

Oltre ai tireociti, la tiroide presenta anche le cellule parafollicolari, o cellule C, che secernono la calcitonina, un ormone fondamentale nella regolazione dei livelli di calcio Ca^{2+} nel sangue.

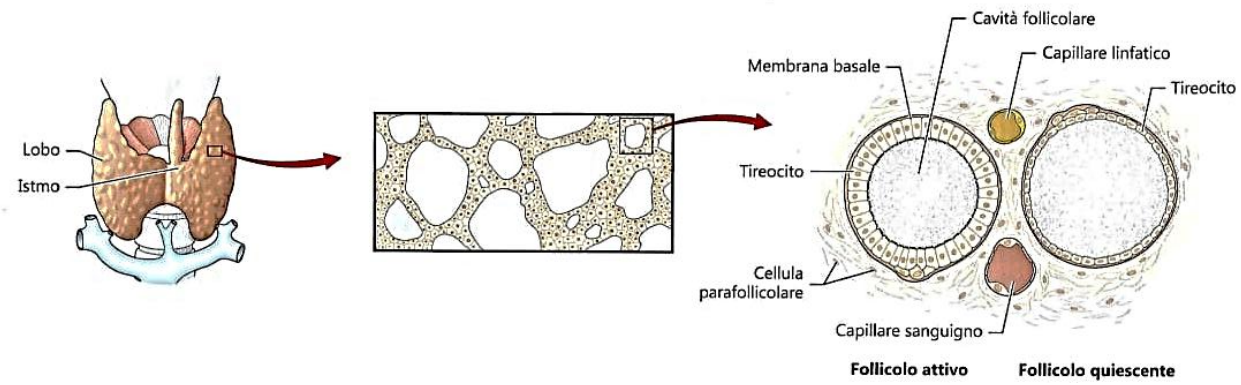


Figura 1. *Organizzazione schematica della tiroide e del parenchima tiroideo, con particolare su tireociti e cellule parafollicolari* (Barbatelli, et al. 2021)

La tiroide è una delle ghiandole fondamentali del Sistema Endocrino (SE). Il SE comprende le ghiandole a secrezione interna che hanno la funzione di mantenere l'omeostasi dell'organismo mediante la liberazione delle loro secrezioni, conosciute anche con il termine di ormoni (Barbatelli,

et al. 2021). La secrezione sistemica di queste molecole è permessa da una particolare rete capillare composta da sinusoidi fenestrati che circondano interamente la ghiandola (Barbatelli, et al. 2021).

La tiroide, in particolare, fa parte dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroideo (Chiamolera e Wondisford 2009). L'ipotalamo si trova al di sotto dei due emisferi cerebrali, in una zona molto protetta. È in grado di coordinare le funzioni nervose con le funzioni endocrine secernendo i cosiddetti fattori di rilascio o *Releasing Hormones* (RH). A diretto contatto con l'ipotalamo si trova l'ipofisi, divisa tra neuroipofisi e adenoipofisi. Tra gli RH prodotti dall'ipotalamo, è presente la tireoliberina o *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) che, tramite il circolo portale ipotalamoipofisiario, agisce a livello della adenoipofisi per la secrezione dell'ormone tireostimolante o *Thyroid-Stimulating Hormone* (TSH) (Chiamolera e Wondisford 2009).

Per la produzione degli ormoni tiroidei, è necessario che i tireociti captino lo iodio sottoforma di ione ioduro I^- dal circolo sanguigno (Rousset, et al. 2015). Lo iodio viene importato controgradiente nei tireociti tramite il *Na^+/I^- Symporter* (NIS), una proteina trasportatrice che utilizza il gradiente del Na^+ e viene stimolata dal TSH. Per poter essere utilizzato, I^- deve andare incontro ad una reazione di ossidazione ad opera dalla tireoperossidasi (TPO). Questo enzima attua una reazione di ossido-riduzione utilizzando come specie reattive I^- e l'acqua ossigenata H_2O_2: I^- viene ossidato a I e H_2O_2 viene ridotto ad H_2O (Rousset, et al. 2015). H_2O_2 viene prodotta per riduzione dell'ossigeno molecolare O_2 nella regione apicale del tireocita da DUOX2, un enzima appartenente alla famiglia NOX/DUOX composta dalle NADH ossidasi e dalle *dual* ossidasi (Rousset, et al. 2015).
All'interno dei follicoli, la colloide è costituita dalla tireoglobulina o *human Thyroglobulin* (hTg), una glicoproteina iodata ricca di residui amminoacidici di tirosina (Tyr o T). La hTg è il precursore degli ormoni tiroidei, viene prodotta dagli stessi tireociti e accumulata nella colloide. Contestualmente alla produzione della hTg, viene organicato lo I legando uno o due atomi agli anelli aromatici delle Tyr formando due tipi di residui: MIT e DIT, rispettivamente monoiodiotirosina e diiodiotirosina. La hTg iodinata viene accumulata all'interno del follicolo fino a stimolazione (Rousset, et al. 2015).
Sotto lo stimolo del TSH, i tireociti internalizzano la hTg iodinata attraverso un processo di macropinocitosi a livello del polo apicale. Le vescicole contenenti la colloide con la hTg si fondono con i lisosomi che digeriscono il contenuto delle vescicole: gli enzimi lisosomiali lisano la hTg liberando i residui MIT e DIT. Dall'unione di questi residui si andranno a formare gli ormoni tiroidei: un MIT e un DIT formeranno l'ormone T3 (triiodotironina) mentre due DIT formeranno l'ormone T4 (tetraiodotironina o tiroxina). Questi hanno natura lipofila quindi per viaggiare all'interno del

torrente circolatorio si legheranno a proteine di trasporto specifiche come l'albumina e la *Tiroxine-Binding Protein* TBG (Rousset, et al. 2015) (Ortiga-Carvalho, et al. 2016).

Gli ormoni T3 e T4 prodotti e rilasciati in circolo inibiscono l'ulteriore secrezione di TRH e TSH attraverso un meccanismo a feedback negativo estremamente rapido (Ortiga-Carvalho, et al. 2016).

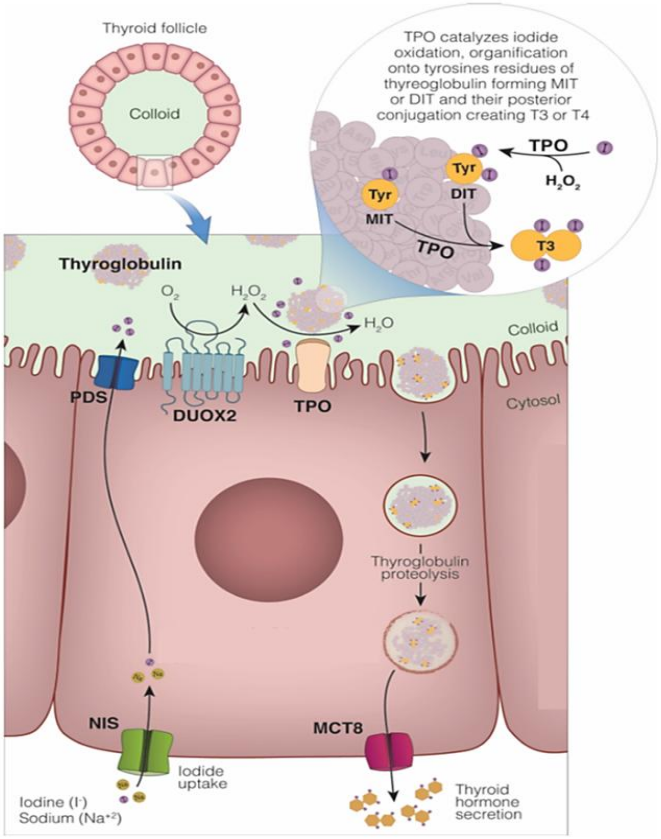


Figura 2. *Rappresentazione di un tireocita e dei passaggi principali per la sintesi degli ormoni tiroidei* (Ortiga-Carvalho, et al. 2016)

1.2 Patologie della Tiroide

La disregolazione positiva o negativa di qualsiasi dei fattori metabolici citati può provocare modifiche sostanziali all'equilibrio della ghiandola.

Queste patologie si possono racchiudere in quattro grandi gruppi distinti: ipo- e ipertiroidismo, tiroiditi e tumori. Di seguito si analizzano brevemente queste condizioni, focalizzando poi lo studio sul tumore della tiroide.

1.2.1 Tiroiditi e Tireotossicosi

Le tiroiditi sono un gruppo di patologie causate dall'infiammazione della ghiandola tiroidea che possono portare ad uno scompenso nella corretta produzione e secrezione di molecole segnale dal parenchima tiroideo (Hansen, et al. 2023).

Le tiroiditi possono avere eziologia esogena ed essere causate da agenti esterni, come virus o batteri, ma possono anche avere un'origine autoimmune, dove il sistema immunitario produce anticorpi diretti contro antigeni autologhi. Ne sono esempi lampanti la tiroidite di Hashimoto e il morbo di Graves (Pearce, Farwell e Braverman 2003).

Generalmente le tiroiditi di origine batterica o virale tendono a risolversi autonomamente ma possono anche essere somministrati farmaci antibiotici o antivirali specifici. Per le forme non infettive sono spesso utilizzati, a seconda della gravità del caso, antinfiammatori non steroidei (FANS), farmaci β-bloccanti e corticosteroidei per la gestione del dolore (Martinez-Quintero, Yazbeck e Sweeney 2021). Per le forme autoimmuni, invece, si ricorre spesso ad una terapia ormonale sostitutiva.

Nei casi in cui le tiroiditi non dovessero risolversi ma tendessero a cronicizzare, potrebbero indurre condizioni di tireotossicosi, ipertiroidismo o ipotiroidismo.

La tireotossicosi è una condizione per cui, a livello ematico, è presente una maggiore quantità di ormoni tiroidei e di hTg in circolo ma questo comportamento non è correlato ad una iperattività della ghiandola. Nel caso di tireotossicosi dovute a tiroiditi, questi ormoni vengono rilasciati a seguito del danneggiamento diretto del parenchima tiroideo (Inman e Long 2026).

1.2.2 Ipertiroidismo

L'ipertiroidismo è una condizione di iperattivazione del metabolismo tiroideo che provoca una eccessiva sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei nel circolo ematico (McKeown, et al. 2005). Possiamo distinguere tra un ipertiroidismo primario, legato alla diretta iperattivazione della ghiandola tiroidea, e un ipertiroidismo secondario, legato ad una aumentata secrezione di TSH a livello dell'adenoipofisi (Wiersinga, Poppe e Effraimidis 2023).

Il paziente che tendenzialmente è affetto da ipertiroidismo è una donna in età fertile con sintomi aspecifici legati a palpitazioni, peso corporeo e sfera emozionale come nervosismo, irrequietezza, irritabilità (Wiersinga, Poppe e Effraimidis 2023). Nei casi più evidenti si possono anche notare un tipico ingrossamento della ghiandola e, in ipertiroidismo autoimmune, la sporgenza anomala di uno o entrambi i bulbi oculari verso l'esterno dell'orbita, detta esoftalmo (McKeown, et al. 2005).

A livello clinico, la sospetta diagnosi è confermata effettuando analisi sulla quantità di TSH e ormoni T3 e T4 presenti in circolo: a seconda delle condizioni rilevate si distingueranno i diversi gradi di ipertiroidismo e di eventuale tireotossicosi (Wiersinga, Poppe e Effraimidis 2023).

L'ipertiroidismo è dalle quattro alle sette volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini indipendentemente dall'eziologia della condizione e si presenta con maggiore frequenza tra i 20 e i 50 anni.

La maggiore causa dello sviluppo dell'ipertiroidismo nei paesi occidentali è il morbo di Graves o malattia di Basedow che copre fino al 90% dei casi. Questa è una patologia autoimmune caratterizzata

da un anomalo numero di linfociti B e, di conseguenza, di anticorpi che riconoscono e attivano il recettore del TSH (TSHR), iperattivandolo e aumentando la quantità di ormoni tiroidei rilasciati (Hansen, et al. 2023).

I principali trattamenti per il morbo di Graves sono i farmaci antitiroidei (ATD), la terapia con iodio radioattivo (RAI) e, nei casi meno gestibili, la tiroidectomia. Gli ATD rappresentano generalmente il trattamento di prima linea e comprendono metimazolo, propiltiouracile e carbimazolo, tutti inibitori della TPO (Hansen, et al. 2023).

1.2.3 Ipotiroidismo

L'ipotiroidismo è il risultato di una insufficiente produzione di ormoni tiroidei o di una inadeguata azione di questi nei tessuti target (Almandoz e Gharib 2012).

Anche in questo caso, è possibile distinguere tre gradi di ipotiroidismo:

- Primario, dovuto ad una insufficienza tiroidea con eziologia di varia natura
- Secondario, dovuto ad una insufficiente secrezione di TSH a livello dell'ipofisi
- Terziario, dovuto ad una insufficiente secrezione di TRH da parte dell'ipotalamo

L'ipotiroidismo è una condizione relativamente comune nella popolazione, con una incidenza dieci volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini (Devdhar, Ousman e Burman 2007). L'ipotiroidismo è particolarmente evidente in aree geografiche naturalmente povere di iodio nel suolo e nelle falde acquifere: questo rende la carenza di iodio la principale causa, esogena e non, di ipotiroidismo.

Tra le cause endogene, invece, si annoverano numerosi difetti genetici nei diversi compartimenti del metabolismo tiroideo (iodotironine, hTg, deiodinasi) e malattie autoimmuni, come la tiroidite di Hashimoto (Almandoz e Gharib 2012).

L'ipotiroidismo non presenta dei sintomi specifici e riconoscibili ma presenta un quadro generale stabile con sintomi generici quali fatica, costipazione, dolori muscolari e pelle secca. A livello cardiaco possono presentarsi bradicardia, ipertensione sistemica, aritmie ventricolari e altri sintomi. Solo in alcuni casi possono essere presenti il gozzo alla base del collo e il mixedema negli arti inferiori, una condizione di gonfiore del sottocute causato dall'accumulo di glicosamminoglicani che formano il caratteristico edema duro (Almandoz e Gharib 2012) (Devdhar, Ousman e Burman 2007).

A livello clinico, l'ipotiroidismo si diagnostica attraverso esami di base dell'attività tiroidea come la quantifica di TSH e degli ormoni T4 e T3. Queste analisi di base possono essere confermate associandole ad analisi nel ritardo dell'uptake dello ^{131}I e dell'abbassamento del metabolismo basale (Devdhar, Ousman e Burman 2007).

Un'altra forma estremamente presente di ipotiroidismo è quella cronica di derivazione autoimmune conosciuta come tiroidite di Hashimoto, in onore del medico giapponese che l'ha studiata (Devdhar, Ousman e Burman 2007). Questa è la causa primaria di ipotiroidismo non legata all'assunzione

quotidiana di iodio. È caratterizzata dall'infiltrazione diffusa di linfociti B che, nella maggior parte dei casi, producono anticorpi indirizzati contro la TPO. Altri casi riguardano la produzione di anticorpi contro hTg e TSHR, portando complessivamente alla distruzione del tessuto ghiandolare (Almandoz e Gharib 2012).
In generale, l'ipotiroidismo primario è trattato con la somministrazione esogena di ormoni T3 e T4 sintetici, trattamento che deve essere mantenuto per tutta la vita e le cui dosi e condizioni vengono stabilite in base all'età del paziente (Devdhar, Ousman e Burman 2007).

1.3 l Tumore della Tiroide

1.3.1 Classificazione

L'incidenza del tumore della tiroide è aumentata a livello mondiale durante gli ultimi cinquant'anni, piazzandosi al settimo posto tra i tumori più diffusi globalmente (Forma, et al. 2025). Questo tipo di tumore rappresenta la più comune forma di cancro, coprendo il 3.4% dei casi diagnosticati annualmente (Prete, et al. 2020). In Italia, nel 2024, sono state effettuate più di 11.000 nuove diagnosi, suddivise tra 3000 uomini e 8000 donne (Fondazione Veronesi s.d.). Si può diagnosticare a tutte le età, con massima incidenza tra i 25 e i 60 anni, e con prevalenza nel sesso femminile.

Si possono distinguere tre gruppi di tumori di diversa origine istologica: tumore differenziato e tumore indifferenziato o anaplastico (ATC), originati dalle cellule dei follicoli tiroidei, e tumore neuroendocrino midollare (MTC), originato dalle cellule parafollicolari della tiroide (Cabanillas, McFadden e Durante 2016). I tumori differenziati vengono identificati con questo termine in quanto mantengono la "normale" organizzazione del tessuto tiroideo e mantengono conservate le caratteristiche funzionali del tessuto, come la secrezione degli ormoni tiroidei e della tireoglobulina. Al contrario, i tumori anaplastici indifferenziati sono più aggressivi e non mantengono la secrezione fisiologica della tiroide (Boucai e Braunstein 2026).
Il tumore di tipo differenziato è il più comune tra i tumori della tiroide, presentandosi in più del 95% dei casi (Cabanillas, McFadden e Durante 2016). I tumori differenziati possono essere suddivisi in ulteriori due categorie: carcinoma papillare (PTC) e carcinoma follicolare (FTC), entrambi originati dalle cellule follicolari epiteliali della tiroide. Il PTC è il più comune e anche il meno aggressivo, con metastasi generalmente limitate ai linfonodi cervicali e, raramente, ai polmoni.
Il ATC è una neoplasia estremamente rara (<1% dei casi) ed estremamente aggressiva con prognosi sfavorevole che si presenta con l'accrescimento rapido di una massa a livello della tiroide. Questo tumore sviluppa nel 20-50% dei casi metastasi anche molto lontane dal tumore primario, come alle ossa, ai polmoni e al cervello (Forma, et al. 2025).

1.3.2 Diagnosi del Tumore

In generale, il tumore alla tiroide può avere un'ampia sintomatologia nella sua fase iniziale. Numerosi pazienti riportano, infatti, sintomi generici come disturbi del sonno, fatica e disagio emotivo. Nei casi più evidenti, si possono osservare anche rigonfiamento del collo e condizioni di intorpidimento cervicale, dovute all'interazione della massa tumorale con i nervi laringei superiore e inferiore (Forma, et al. 2025).

Circa il 50% dei tumori della tiroide viene diagnosticato casualmente sottoponendosi ad accertamenti non correlati alla ghiandola. Tali riscontri possono derivare da radiografie al torace e/o ai polmoni e da esami istologici alla tiroide per patologie benigne (Forma, et al. 2025).

Normalmente, la diagnosi effettiva di tumore della tiroide avviene con ecografia della zona del collo, correlata da esami laboratoriali di routine e ricerca e dosaggio di markers tumorali delle neoplasie tiroidee (hTg, calcitonina).

Successivamente, per confermare la diagnosi, vengono prescritte ecografie localizzate e la *Fine Needle Aspiration Biopsy* (FNAB) o agoaspirato, tecnica fondamentale per la determinazione del tipo di tumore. Ulteriori esami, tra cui l'analisi dei marcatori molecolari e la scintigrafia con iodio radioattivo, vengono utilizzati per determinare il tipo e l'estensione del tumore (Forma, et al. 2025).

La FNAB sotto guida ecografica è una tecnica mininvasiva sicura, economica e accurata per la diagnosi di patologie benigne e maligne. La sua crescente diffusione l'ha resa una procedura utilizzata quotidianamente nella maggior parte dei centri medici di tutto il mondo (Rosa 2008). La FNAB percutanea è effettuata generalmente in condizioni di anestesia locale del paziente e utilizzando un ago con misura tra 20-22 gauge (<1 mm di diametro) lungo tra i 5 e i 20 cm, a seconda dell'area interessata (Kalogeraki, et al. 2015). La FNAB dovrebbe essere effettuata su lesioni tissutali tra 1 e 2 cm di grandezza. A seguito di questa operazione, si ottengono preparati istologici freschi del tessuto da analizzare che verranno fissati su vetrino e analizzati (Kalogeraki, et al. 2015). L'obiettivo della tecnica è quello di ottenere almeno 6 campioni di follicoli, ciascuno contenente dalle 10 alle 15 cellule provenienti almeno da due differenti prelievi (Nguyen, et al. 2015). I risultati ottenuti vengono classificati come:

- non diagnostici
- maligni
- sospetti per malignità (rischio 50-75%)
- indeterminati o sospetti per neoplasia (rischio 20-30%)
- lesione follicolare di significato indeterminato (rischio 5-10%)
- benigni

Per i risultati indeterminati o con sospetto di malignità è auspicabile procedere con un'analisi molecolare dei marker tumorali (Nguyen, et al. 2015).

1.3.3 La Biologia Molecolare del Tumore

La caratterizzazione molecolare dei tumori della tiroide ha permesso di migliorare la distinzione dei sottotipi di questi tumori, ciascuno caratterizzato da un metabolismo specifico e da una risposta caratteristica alle diverse terapie (Boucai, Zafereo e Cabanillas 2024). Inoltre, l'analisi molecolare permette di verificare trattamenti adatti alle mutazioni genetiche che regolano ciascun sottotipo tumorale.

Le mutazioni più comuni riscontrate sono quelle a carico dei geni che codificano per le proteine appartenenti ai pathway delle MAP chinasi (MAPK) e del fosfatidilinositolo-3 chinasi/protein chinasi B (PI3K/AKT) (Boucai, Zafereo e Cabanillas 2024) (Prete, et al. 2020).

La via di segnalazione delle MAPK gioca un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi fisiologica mentre regola, nelle cellule tumorali, anche la neoangiogenesi e la formazione di metastasi (Prete, et al. 2020).
Il gene maggiormente coinvolto in questi casi è BRAF e la mutazione che compare in più del 60% dei PTC è BRAF V600E dove un residuo di valina (Val o V) in posizione 600 della catena amminoacidica è sostituito da un residuo di acido glutammico (Glu o E). Questa mutazione impone uno stato attivo di BRAF indipendente dagli stimoli esterni alla cellula, iperattivando ERK che trasloca nel nucleo e favorisce la trascrizione di geni che supportano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (Bharti, et al. 2024). L'espressione di BRAF V600E, inoltre, altera il delicato equilibrio della cascata di segnalazione operata da WNT e dalla β-catenina che culmina in risposte cellulari aberranti che supportano la proliferazione cellulare incontrollata (Bharti, et al. 2024).

Mutazione altrettanto presente nei tumori della tiroide è quella a carico di RAS: questa mutazione si osserva nel 13% dei PTC e fino al 50% dei FTC. I tumori che presentano RAS mutato sono predisposti all'acquisizione di un comportamento metastatico e all'invasione vascolare (Boucai, Zafereo e Cabanillas 2024).

La seconda via di segnalazione spesso protagonista nei tumori della tiroide è PI3K/AKT. La PI3K è una chinasi che fosforila il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2) trasformandolo in fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato (PIP_3). Viceversa, l'enzima PTEN catalizza la defosforilazione di PIP_3 in PIP_2 (Fresno-Vara, et al. 2003). La produzione di PIP_3 permette la fosforilazione e attivazione del complesso AKT-mTOR: AKT attiva promuove la sopravvivenza cellulare e inibisce l'apoptosi andando indirettamente ad inattivare Bcl-2, fattore anti-apoptotico (Fresno-Vara, et al. 2003).

Mutazioni a carico di PTEN promuoveranno la proliferazione cellulare e la migrazione metastatica delle cellule tumorali (Prete, et al. 2020).

Nei tumori tiroidei si possono anche osservare fusioni cromosomiche che alterano la normale funzionalità proteica. Esempi di fusioni cromosomiche sono quelle di RET/PTC, PAX8-PPARγ e NTRK (Prete, et al. 2020).

Il riarrangiamento che coinvolge RET è la più comune alterazione genica identificata nei PTC (Nikiforov 2002). RET è un proto-oncogene che codifica per un recettore tirosin-chinasico molto espresso nelle cellule C della tiroide, dove mutazioni puntiformi di questo gene possono provocare in autonomia lo sviluppo di MTC (Nikiforov 2002). La fusione di RET con un secondo gene, chiamato partner di fusione, tendenzialmente provoca una incontrollata attivazione della subunità citosolica tirosin-chinasica di RET, la successiva iperattivazione della cascata delle MAPK con conseguente proliferazione cellulare (Prete, et al. 2020) (Nikiforov 2002).

PAX8 appartiene ad un'ampia famiglia di fattori di trascrizione necessari al corretto sviluppo delle funzioni tiroidee e, nei tireociti maturi, questo gene permette l'espressione fisiologica di hTg, TPO e NIS. Anche PPARγ è un fattore di trascrizione che è, però, associato alla regolazione dell'adipogenesi e del metabolismo lipidico (Raman e Koenig 2015). La fusione tra questi due geni è causata da una traslocazione cromosomica tra le regioni 2q13 e 3p25 che dà origine ad una proteina anomala: il promotore di PAX8, estremamente e perennemente attivo nei tireociti maturi, è associato al primo esone di PPARγ, originando un oncogene e, di conseguenza, un'oncoproteina che agisce come inibitore dominante-negativo della proteina *wild type*, favorendo la crescita tumorale (Raman e Koenig 2015).

NTRK (*Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase*) è una famiglia di tre geni che codificano per i recettori TRK, fondamentali per lo sviluppo e il funzionamento del sistema nervoso (Cocco, Scaltriti e Drilon 2019). Le fusioni che coinvolgono NTRK1, NTRK2 o NTRK3 rappresentano i meccanismi più comuni di attivazione oncogenica di TRK. Tipicamente, riarrangiamenti intracromosomici o intercromosomici danno origine a geni ibridi in cui il dominio tirosin-chinasico di NTRK1, NTRK2 o NTRK3 viene fuso con un secondo gene (Cocco, Scaltriti e Drilon 2019). Il prodotto della fusione è un'oncoproteina chimerica caratterizzata da un'attivazione costitutiva della chinasi TRK. Questa attivazione permanente invia segnali cellulari incontrollati che guidano la crescita e la proliferazione del tumore (Cocco, Scaltriti e Drilon 2019).

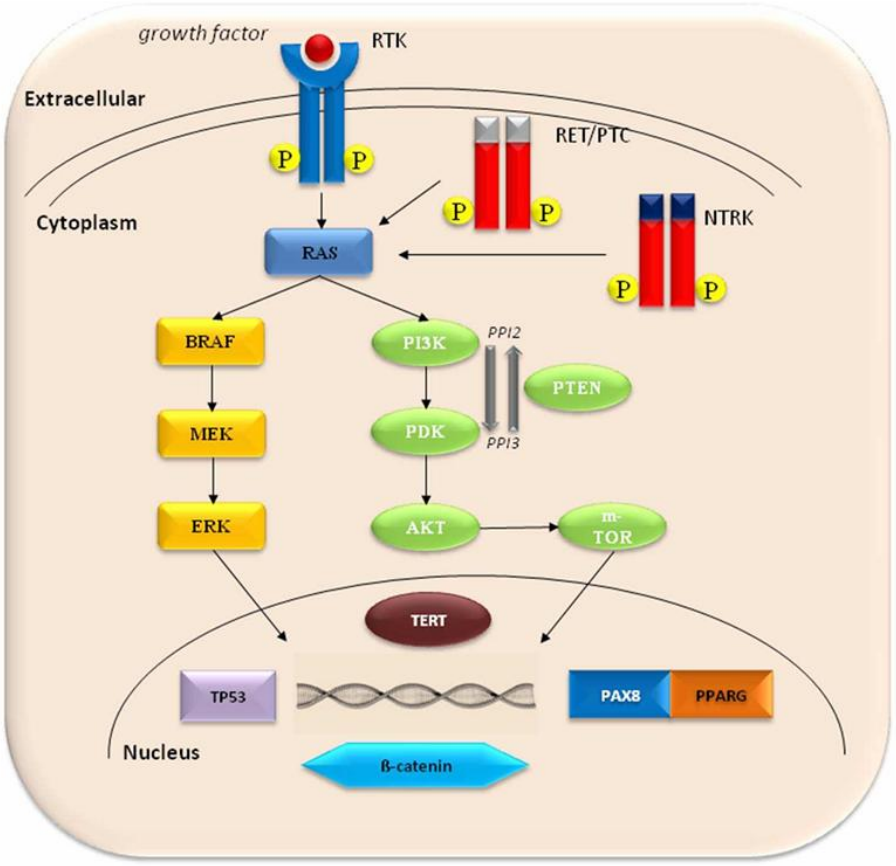


Figura 4. *La patogenesi molecolare del carcinoma tiroideo coinvolge una disregolazione delle vie di segnalazione MAPK e PI3K/AKT.*

Le più comuni mutazioni dela via MAPK includono riarrangiamenti in RET/PTC e NTRK, mutazioni di RAS e BRAF. Le alterazioni genetiche più frequenti nella via PI3K comprendono mutazioni di RAS, mutazioni o delezioni di PTEN e mutazioni di AKT1. L'attivazione della via di segnalazione Wnt/β-catenina, le mutazioni inattivanti di TP53 e le mutazioni attivanti del promotore di TERT sono frequentemente riscontrate nei ATC. (Prete, et al. 2020)

1.3.4 Terapia del Tumore

I trattamenti principali per la gestione di tumori della tiroide, oggi, sono la chirurgia, trattamenti radiometabolici con ^{131}I, trattamenti molecolari con differenti inibitori delle tirosin-chinasi (TKIs), chemioterapia, radioterapia e immunoterapia. La scelta del trattamento dipende dal tipo e dallo stadio del tumore (Nguyen, et al. 2015) (Forma, et al. 2025).

Queste tecniche possono essere suddivise in terapie di prima linea (chirurgia e terapia ^{131}I) o di seconda linea (TKI, chemioterapia e immunoterapia).

Tra gli interventi chirurgici si annoverano, a seconda dell'estensione della massa tumorale, emitiroidectomie, spesso con istmectomia, e tiroidectomie totali con rimozione anche dei linfonodi del collo. A causa dell'alta percentuale di distribuzione multifocale degli *hotspot* tumorali tiroidei, la rimozione totale della tiroide riduce le probabilità di una recidiva maligna nel parenchima tiroideo residuo (Nguyen, et al. 2015).

Il trattamento con ^{131}I è spesso utilizzato in associazione con le tiroidectomie per eradicare completamente la possibilità di recidive. Il principio su cui si basa questa tecnica è l'incorporazione di ^{131}I nelle cellule tiroidee che vengono danneggiate in modo selettivo, sfruttando l'antiporto operato dal NIS (Boucai, Zafereo e Cabanillas 2024) (Nguyen, et al. 2015).
Il paziente assume per via orale una capsula contenente ^{131}I che entra in circolo e, a livello della ghiandola tiroidea, viene portato all'interno dei tireociti: in loco, avviene il decadimento radioattivo di ^{131}I che emette particelle β^-. Queste radiazioni agiscono con un raggio d'azione estremamente ridotto (pochi millimetri) causando danni al DNA unicamente alle cellule che lo riescono ad internalizzare (Rowell 2023). Prima del trattamento con ^{131}I, ai pazienti viene imposta una dieta povera di iodio per 4-6 settimane e vengono sottoposti ad un regime di stimolazione con il TSH per assicurare un aumento dell'espressione di NIS e massimizzare l'incorporazione dello iodio nelle cellule tiroidee (Nguyen, et al. 2015).
Tra i tumori sopracitati, questo trattamento è indicato per i tumori differenziati che mantengono l'espressione del NIS nei tireociti: le cellule tumorali o sono maggiormente attive o hanno una maggiore espressione proteica rispetto a quelle sane, per cui la terapia al ^{131}I colpisce molto più velocemente e con maggiore intensità le cellule cancerogene. Al contrario, questa terapia non è indicata per i tumori ATC in quanto non mantengono l'espressione del NIS (Nguyen, et al. 2015).
Il trattamento con ^{131}I è, ovviamente, sconsigliato a donne in gravidanza e in allattamento o a pazienti affetti da tireotossicosi (Nguyen, et al. 2015).

Per il trattamento dei tumori ATC, si è notato che questi tumori sviluppano numerose mutazioni genetiche nei pathway che coinvolgono specifiche proteine, le tirosin-chinasi (TK), a livello di geni come RET, RAF o RAS. Mutazioni in questi geni portano ad una attivazione anomala del dominio tirosin-chinasico di questi enzimi. Per questa ragione, sono stati sviluppati numerosi farmaci a base di TKI, come *Vandetanib*, *Cabozantinib, Sorafenib* e altri (Nguyen, et al. 2015). Questi farmaci interagiscono con diversi fattori della cascata delle TK ma possono interagire anche a livello della membrana plasmatica con diversi recettori per fattori di crescita, come quello dei fibroblasti (FGFR), delle piastrine (PDGFR) e dell'epitelio vascolare (VEGFR). Si analizzano brevemente i farmaci più comuni riportati da Nguyen *et al.* (2015):

- Vandetanib è stato approvato nel 2011 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento di MTC ed è diretto contro il gene RET e il recettore VEGFR e contro il recettore di crescita epidermico (EGFR) (Wells, et al. 2011).
- Cabozantinib, approvato nel 2012 per il trattamento di tumori MTC, agisce sul gene RET, su VEGFR di tipo 2 e sul recettore del fattore di crescita degli epatociti (MET o cMET) (Elisei, et al. 2013).
- Sorafenib è stato approvato nel 2013 agendo su RET, BRAF V600E, sul recettore PDGFR e sulle isoforme 2 e 3 del VEGFR per il trattamento dei tumori differenziati della tiroide refrattari al trattamento con ^{131}I (Brose, et al. 2014).

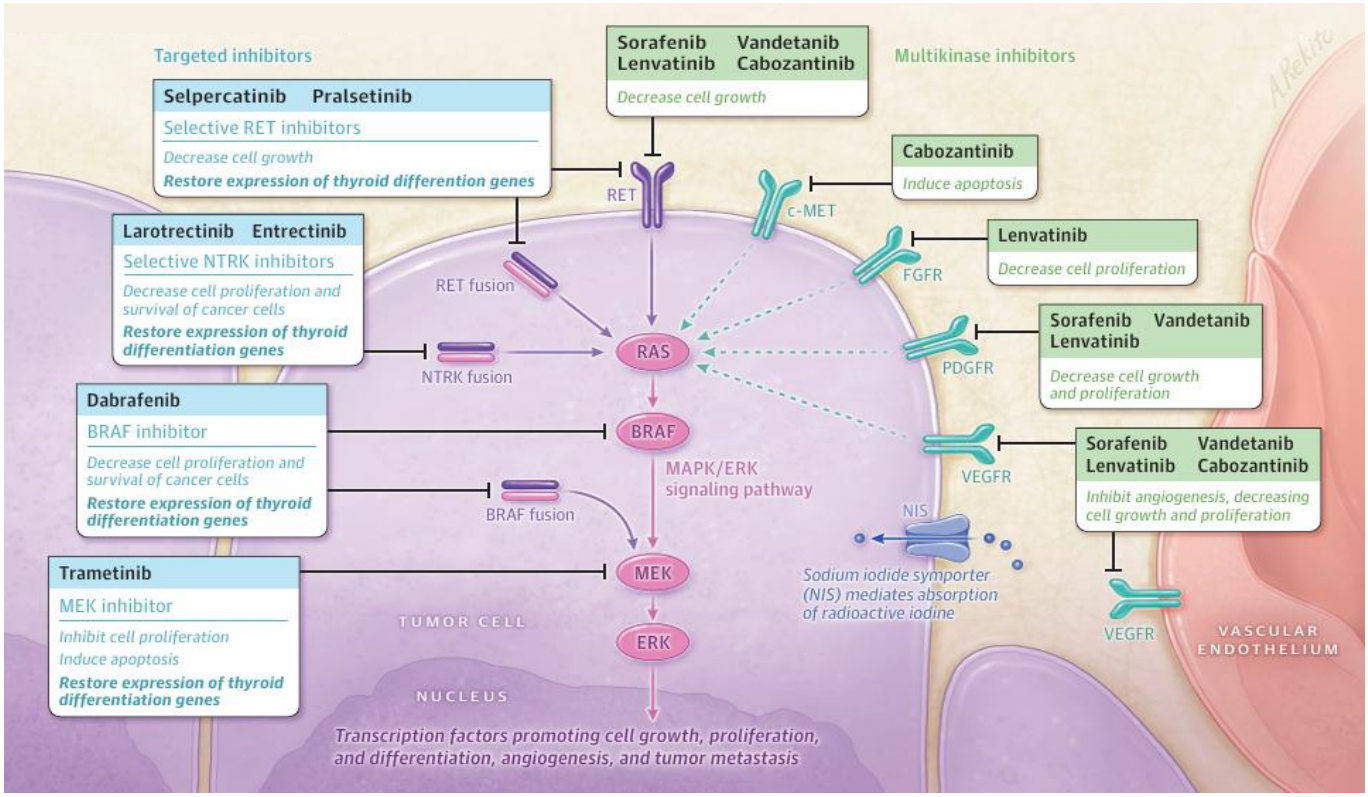


Figura 5. *Terapia anti-angiogenica (verde) e a bersaglio molecolare (blu) nel carcinoma tiroideo* (Boucai, Zafereo e Cabanillas 2024)

La chemioterapia non è frequentemente utilizzata nei casi di tumore della tiroide a causa di bassa efficienza ma può essere utile nei tumori ATC come via alternativa ai metodi sopracitati, in caso di recidive o resistenza (Forma, et al. 2025). I farmaci chemioterapici più utilizzati in questo contesto cono la doxorubicina (Randi 2020) e il cisplatino (Mirabile 2026).

Recentemente, si sono sviluppate nuove tecniche di immunoterapia legate ai tumori della tiroide utilizzando farmaci inibitori di PD-1 per intensificare l'attività del sistema immunitario del paziente contro le cellule tumorali tiroidee. L'immunoterapia è estremamente utile in caso di farmacoresistenza dei pazienti. L'efficacia di questo tipo di terapia dipende dal tipo di tumore che viene trattato: i ATC rispondono meglio all'immunoterapia a causa del loro elevato grado di mutagenesi, al contrario i tumori differenziati sono più refrattari all'immunoterapia (Forma, et al. 2025).

Tipo di Tumore	Terapie di Prima Linea	Terapie di Seconda Linea
PCT	- Operazioni chirurgiche: emitiroidectomia o tiroidectomia totale - Trattamento con ^{131}I	- TKIs (in caso di farmaco resistenza)
FTC	- Operazioni chirurgiche: emitiroidectomia o tiroidectomia totale - Trattamento con ^{131}I - Soppressione TSH	- TKIs (in caso di farmaco resistenza)
MTC	- Operazioni chirurgiche: tiroidectomia totale e dissezione dei linfonodi del collo	- TKIs
ATC	- Operazioni chirurgiche (se operabile) - Trattamento con ^{131}I	- Chemioterapia - Immunoterapia

Tabella 1. *Confronto tra terapie di prima e seconda linea nel trattamento dei vari tipi di tumore della tiroide* (Forma, et al. 2025)

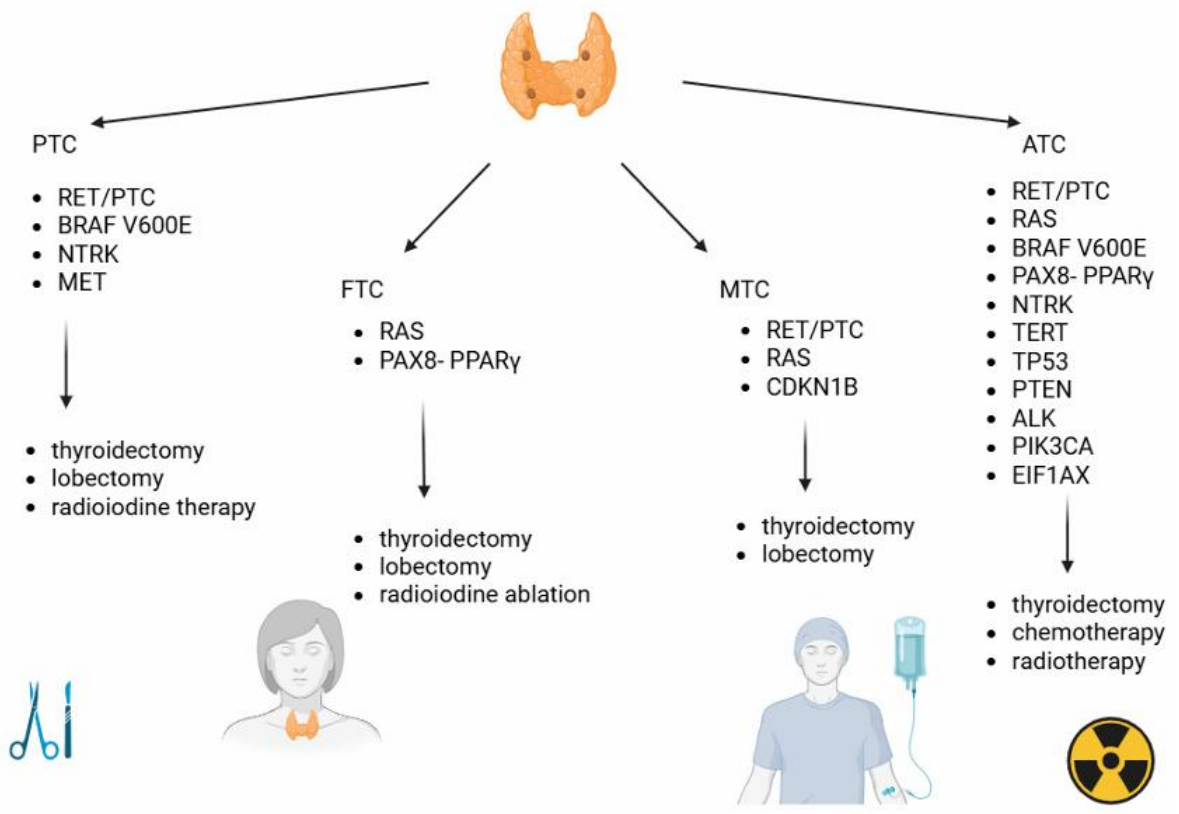


Figura 6. *Tumori della tiroide, mutazioni genetiche e terapie risolutive* (Forma, et al. 2025)

CAPITOLO 2

2. IL MICROAMBIENTE TUMORALE

2.1 Che cos'è e da cosa è composto

In generale, qualsiasi formazione tumorale può essere distinta tra il parenchima tumorale, che rappresenta la massa vera e propria delle cellule cancerose, e lo stroma tumorale o microambiente tumorale, l'insieme di componenti che circondano il tumore e che interagiscono con esso (de Visser e Joyce 2023). Il microambiente è un sistema complesso composto da cellule di diversa origine, dalla matrice extracellulare tumorale (TEM) e da molecole di segnalazione secrete dalle cellule stesse, tumorali e stromali. Si può suddividere il tumore in una componente solida, composta dalle cellule e dalle strutture di sostegno che lo compongono, e in una componente solubile, rappresentata da tutte le molecole di segnalazione secrete dalle stesse cellule (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

2.1.1. Componente Solida

I tipi cellulari che si possono isolare dal microambiente tumorale includono diverse cellule immunitarie linfoidi e mieloidi, fibroblasti associati al tumore (*Cancer-Associated Fibroblasts* CAF), cellule endoteliali, macrofagi associati al tumore (*Tumor-Associated Macrophages* TAM), periciti, neuroni e adipociti (de Visser e Joyce 2023) ma anche le cellule normali. Questa eterogeneità è dovuta alla capacità delle cellule tumorali di reclutare e riprogrammare cellule non-cancerose per rimodellare la vascolarizzazione tissutale e la TEM. Di seguito si analizzano alcune componenti cellulari e le rispettive funzioni.

I CAF sono cellule fondamentali per la sopravvivenza del tumore in quanto costituiscono la quota maggioritaria dello stroma tumorale (Sinkarevs, et al. 2024). Permettono una costante e diretta comunicazione tra il tumore e i tessuti extra-stromali (Anderson e Simon 2020). I CAF si formano a partire da fibroblasti presenti nel sito tumorale stimolati dalla secrezione di PGDF, FGF e dal fattore di crescita trasformante β (TGF-β), prodotti dalle cellule tumorali primarie. I CAF secernono a loro volta TGF-β e la metalloproteasi della matrice 3 (MMP3) che permettono di modellare la nicchia tumorale promuovendo proliferazione cellulare, transizione epitelio-mesenchimale con metastasi, neoangiogenesi e immunosoppressione tramite il rilascio di citochine come l'interleuchina 6 (IL-6) (Anderson e Simon 2020).

È ampiamente noto come i macrofagi siano una delle sottoclassi della famiglia delle cellule leucocitarie e, in particolare, questi si originerebbero a partire dai monociti indifferenziati secondo un meccanismo non completamente caratterizzato (Toledo, et al. 2024). I macrofagi svolgono un ruolo duale nelle risposte immunitarie secernendo citochine e alimentato l'infiammazione per una più

rapida riparazione dei tessuti e, allo stesso tempo, possono sostenere la progressione tumorale e avere un ruolo attivo nelle patologie autoimmuni. In particolare, i TAM sono reclutati a livello del parenchima tumorale durante le prime fasi di formazione del tumore grazie a gradienti osmotici di citochine e chemochine prodotte dalle stesse cellule cancerose: alcuni esempi di queste molecole sono, come descritto successivamente, le chemochine della classe C-C (Toledo, et al. 2024). Il comportamento dei TAM nei diversi stadi del tumore dipende dalla loro origine citologica, dal microambiente tumorale e dall'attivazione di specifiche vie di segnalazione: queste influenze generano quella che viene definita la "polarizzazione dei macrofagi". La polarizzazione è il processo attraverso cui i macrofagi modificano il proprio fenotipo e le proprie funzioni in risposta ai segnali presenti nel microambiente. Questa trasformazione ha inizio a seguito di stimoli specifici che hanno come risultato finale la secrezione di diverse citochine e chemochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNFα) e diverse classi di interleuchine (Toledo, et al. 2024).

Tutti i tipi cellulari presenti nel microambiente contribuiscono a due tipi di stimolazioni: una mitogenica (stimolare la propagazione e proliferazione delle cellule tumorali) e una motogenica (stimolare l'associazione di cellule non cancerose al microambiente e stimolare le cellule tumorali a dirigersi verso i vasi sanguigni per l'invasione dei tessuti secondo il processo di chemiotassi) (Sinkarevs, et al. 2024).

Nei tumori solidi, una componente fondamentale per l'organizzazione della massa cancerosa è composta dalla TEM che rappresenta il mezzo fisico in cui vengono secrete le molecole chemiotattiche. La TEM occupa circa il 60% della massa tumorale ed è composta principalmente da collageni, proteoglicani, glicosamminoglicani, fibronectina, elastina e laminina, tutti polimeri additi alla stabilità della formazione neoplastica (Henke, Nandigama e Ergun 2020). La produzione di questi polimeri è sostenuta dalla secrezione paracrina di fattori di crescita da parte delle cellule tumorali e dei CAF (Henke, Nandigama e Ergun 2020).

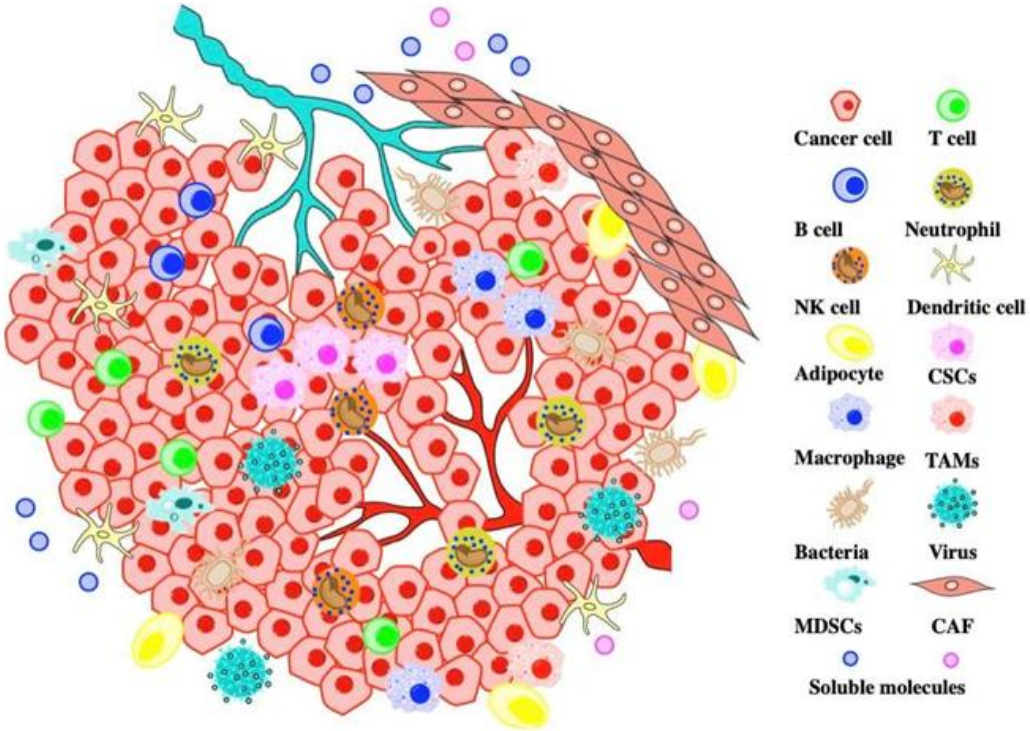


Figura 7. *Diversi tipi di componenti nel TME delle malignità solide. La composizione cellulare del TME è principalmente costituita da CAF, cellule tumorali, cellule immunitarie e dal microbioma. Tutte le cellule interagiscono tra loro tramite molecole solubili come citochine o chemochine e attraverso il traffico mediato da vasi sanguigni o vasi linfatici.* (Han, et al. 2021)

2.1.2 Componente Solubile

La TEM, oltre a sostenere fisicamente lo sviluppo e l'espansione tumorale, permette lo scambio della componente solubile del microambiente tumorale. Queste molecole si distinguono in citochine, chemochine, fattori di crescita e metaboliti di varia natura (Coperchini, Greco e Rotondi 2023) (de Visser e Joyce 2023).

Le citochine sono molecole proteiche prodotte e secrete da diversi tipi cellulari che permettono la comunicazione tra le cellule del sistema immunitario e quelle che compongono il tessuto di riferimento, principalmente attraverso una secrezione di tipo autocrino e/o paracrino (Kureshi e Dougan 2025). Le citochine, in generale regolano le funzioni, la differenziazione, la proliferazione, l'apoptosi e la sopravvivenza delle cellule interessate (Yi, et al. 2024). Quando le citochine si legano ai recettori delle cellule bersaglio, attivano vie di segnalazione intracellulare per modulare la

trascrizione genica, modificando così le diverse attività cellulari (Yi, et al. 2024). Le citochine, nel contesto di un tumore, possono svolgere un duplice ruolo, pro- e antitumorale, a seconda della pletora di recettori che le cellule espongono. Attualmente, la FDA ha approvato l'impiego dell'interferone α (IFN-α) e dell'interleuchina 2 (IL-2) per il trattamento di un'ampia gamma di tumori. Dall'altro lato, numerose citochine favoriscono la progressione tumorale. Alcuni esempi sono: EGF, VEGF, TGF-β, TNF-α, il ligando della chemochina con motivo C-C 2 (CCL2) e il ligando della chemochina con motivo C-X-C 8 (CXCL8). Queste ed altre citochine supportano lo sviluppo tumorale contribuendo attivamente alla crescita, alla metastatizzazione, al rimodellamento della TEM e alla resistenza ai trattamenti (Yi, et al. 2024).
Le citochine possono essere raggruppate in famiglie sulla base dell'omologia strutturale e delle subunità recettoriali condivise. Tra le citochine più note vi sono la classe degli interferoni e quella delle chemochine.

Le chemochine, o citochine chemiotattiche, in particolare, sono utilizzate per il reclutamento dei leucociti nei siti infiammatori. Queste molecole verranno analizzate nel paragrafo successivo.
Tra i fattori di crescita secreti nel microambiente si possono ricordare i fattori che sostengono l'angiogenesi (VEGF e FGF) necessari per la formazione di nuovi vasi sanguigni a sostegno della crescita tumorale, i fattori per la proliferazione che contrastano l'apoptosi e stimolano la divisione delle cellule cancerose, i fattori per il rimodellamento del microambiente e i fattori per la Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT) per l'innesco della formazione di sedi metastatiche. Zhang *et al.* (2012) ne analizzano alcuni con le rispettive funzioni (Zhang, Nie e Chakrabarty 2012):

- Un asse fondamentale è quello rappresentato da EGF/EGFR che, in condizioni fisiologiche, regola proliferazione, differenziamento, migrazione e sopravvivenza cellulare. In un contesto tumorale, questo recettore risulta spesso iperespresso e iperattivato provocando una disregolazione delle vie metaboliche neoplastiche e favorendo la EMT con lo sviluppo di un comportamento maligno e invasivo delle cellule tumorali. EGFR promuove anche il rilascio di fattori angiogenici per lo sviluppo di nuovi vasi a sostegno del tumore;
- Un secondo asse preponderante è FGF/FGFR che regola lo sviluppo embrionale, la riparazione tissutale e l'angiogenesi. Nei tumori, questo asse permette la comunicazione tra le cellule tumorali e le cellule stromali favorendo l'acquisizione da parte di queste ultime di un fenotipo aggressivo e migratorio. In particolare, la funzione principale di FGF è a supporto dell'angiogenesi tumorale mediando la secrezione di VEGF e PDGF;
- Il terzo sistema di segnalazione analizzato è composto da PDGF/PDGFR che agisce principalmente sulle cellule stromali mesenchimali come CAF e periciti. Uno dei principali effetti mediati da questo asse è l'attivazione dei CAF per la produzione di matrice e citochine

varie per il sostegno della crescita tumorale. PDGF agisce anche sul reclutamento, sulla maturazione e sull'organizzazione dei periciti per la formazione di nuovi vasi.

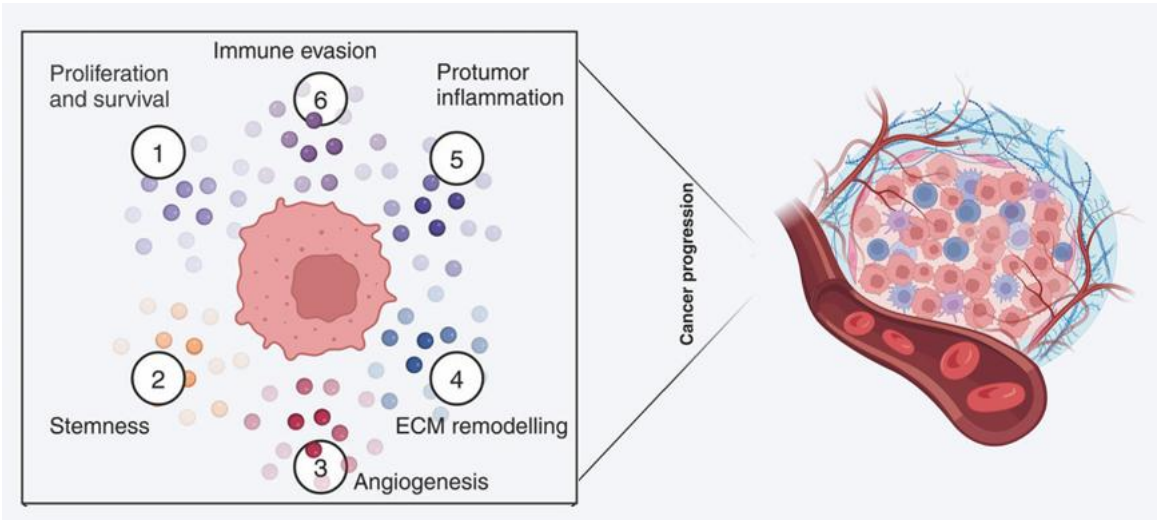


Figura 8. *Meccanismi d'azione delle citochine che contribuiscono alla progressione tumorale* (Yi, et al. 2024)

2.2 Le Chemochine

Come introdotto precedentemente, le chemochine sono una grossa classe di citochine infiammatorie con la funzione di attrazione chemiotattica dei leucociti che vengono secrete dalla quasi totalità delle cellule, sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni di infiammazione (Mempel, Lill e Altenburger 2024). Queste sono piccole molecole proteiche solubili dal peso di 10kDa secrete da cellule differenti del microambiente tumorale che espletano la loro funzione attraverso il loro legame con specifici recettori. È necessario sottolineare come ciascuna chemochina sia in grado di legarsi a diversi recettori: questo permette una ridondanza funzionale caratteristica dell'ampia plasticità delle risposte immunitarie che queste giostrano (Mempel, Lill e Altenburger 2024).

A seconda della loro natura, le chemochine si possono suddividere tra quelle di tipo infiammatorio e quelle chemiotattiche (Coperchini, Greco e Rotondi 2023) (Laing e Secombes 2004). Le chemochine chemiotattiche vengono prodotte e secrete costitutivamente e sono le responsabili della mobilitazione dei linfociti mentre le chemochine infiammatorie sono prodotte solamente a seguito di stimoli pro-infiammatori per il reclutamento dei leucociti (Laing e Secombes 2004).
I recettori delle chemochine appartengono alla classe dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs) con 7 domini transmembrana, sottogruppo A (Coperchini, Greco e Rotondi 2023) (Zlotnik e Yoshie 2012).

Le chemochine sono suddivise in quattro famiglie a seconda dell'organizzazione del loro motivo ricco in residui di cisteina (C o Cys) all'estremità N-terminale della sequenza: CC, CXC, C e CX_3C. Tutte condividono una struttura altamente conservata dove un *core* di tre foglietti β è affiancato all'estremità N-terminale dal motivo ricco in Cys e all'estremità C-terminale da una catena a α elica che permette il legame al recettore 7 domini transmembrana accoppiato alle proteine G (Zlotnik e Yoshie 2012) (Mempel, Lill e Altenburger 2024).
Allo stesso modo, si possono suddividere i recettori delle chemochine in altrettante quattro famiglie a seconda della classe di chemochine che riconoscono.

Nel contesto del microambiente tumorale, le chemochine permettono il reclutamento e l'organizzazione spaziale delle cellule del sistema immunitario, facilitando una risposta immunitaria antitumorale. Allo stesso tempo, però, le chemochine contribuiscono alla formazione di un microambiente protumorigenico (Yi, et al. 2024). L'equilibrio tra l'attività protumorigenica e antitumorigenica delle chemochine dipende da numerosi fattori come lo stadio del tumore, lo stato di attivazione del compartimento immunitario e dall'espressione dei rispettivi recettori di membrana (Yi, et al. 2024). Avendo questa duplice natura, si è osservato che le cellule tumorali prediligono mutazioni genetiche ed epigenetiche per l'attivazione di chemochine protumorigeniche e la soppressione di quelle antitumorigeniche (Mempel, Lill e Altenburger 2024) (Rotondi, et al. 2018).

Le cellule tumorali esprimono un ampio range di recettori per le chemochine. Si è visto recentemente che questi recettori svolgono un ruolo fondamentale anche nel mantenimento delle cellule staminali tumorali e nella creazione della nicchia metastatica primaria del tumore (Vilgelm e Richmond 2019). Recenti studi hanno osservato, inoltre, la correlazione tra la presenza/assenza di determinate citochine e la capacità di infiltrazione del tumore dei linfociti T: nel melanoma, l'assenza di ligandi dei recettori delle chemochine CCR5 e CXCR3 è associata ad una ridotta infiltrazione dei linfociti T $CD8^+$ citotossici, una sottopopolazione di leucociti che secernono determinate molecole citotossiche, come perforina e granzimi, per eradicare specifiche cellule disregolate e/o infette e salvaguardare l'integrità del tessuto circostante (Vilgelm e Richmond 2019).

Le chemochine rappresentano uno dei principali regolatori del microambiente tumorale, controllando e reclutando diversi tipi di cellule, e presentando un'attività antitumorale o di immunosoppressione a sostegno della massa tumorale (Abdul-Rahman, et al. 2024). Si citano degli esempi:

- L'asse CCL2/CCR2 rappresenta uno dei principali meccanismi di reclutamento delle cellule mieloidi immunosoppressive nel microambiente tumorale ed è frequentemente associato a progressione neoplastica;

- L’asse CXCL12/CXCR4 è contemporaneamente coinvolto nel reclutamento delle cellule immunitarie, nell’angiogenesi e nella formazione delle metastasi. Si è osservato che cellule di carcinoma mammario che presentano in superficie elevate quantità del recettore CXCR4 vengono chemiotatticamente attratte da organi e tessuti che esprimono la chemochina CXCL12, ne sono esempi il tessuto osseo, il fegato e i linfonodi;
- L’asse CXCL9-CXCL10/CXCR3 è uno dei più importanti nel contesto dell’immunità antitumorale. Questo asse promuove l’infiltrazione di essudato immunitario all’interno della massa tumorale secondo un gradiente chemiotattico. CXCL9 e CXCL10 potrebbero rappresentare l’anello mancante per aumentare l’infiltrazione linfocitaria nella conversione da tumori *cold phenotype* a *hot phenotype*.

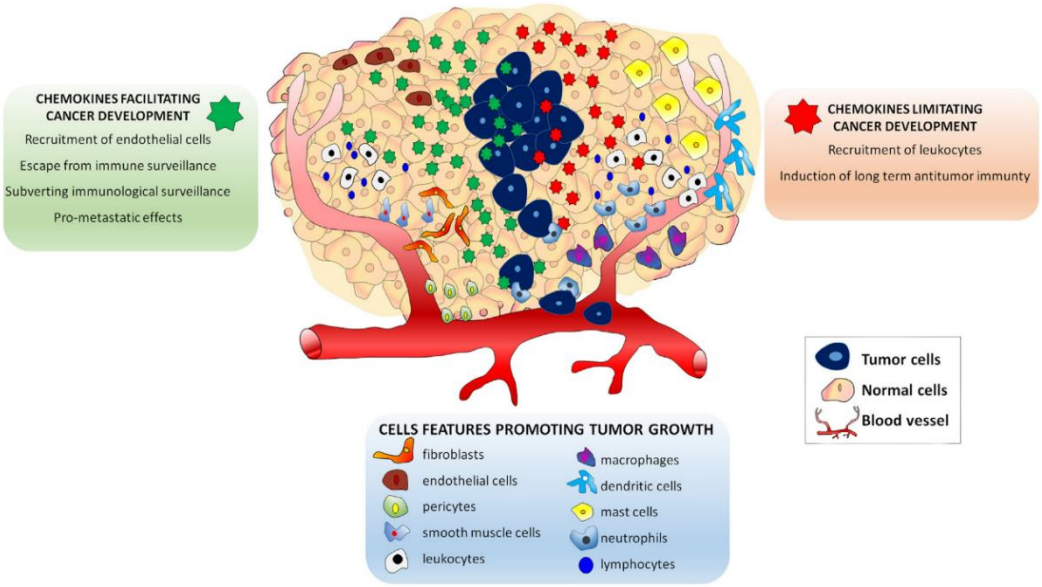


Figura 9. *Effetti delle chemochine nel microambiente tumorale.*
La presenza di diversi tipi cellulari attratti da specifiche chemochine influenza la crescita tumorale. Le chemochine secrete nel microambiente tumorale svolgono un ruolo duale nel processo oncogenico. Alcune chemochine (verde) possono facilitare la crescita delle cellule tumorali mentre altre (rosso) possono limitare lo sviluppo neoplastico (Rotondi, et al. 2018).

2.2.1 CXCL8

CXCL8, conosciuta anche come interleuchina 8 (IL-8), è stata una delle prime chemochine ad essere scoperta e, ad oggi, è sicuramente una delle più studiate in associazione con vari tipi di tumore (Rotondi, et al. 2018). Questa molecola ha la funzione di attrarre neutrofili e cellule infiammatorie, che esprimono i recettori CXCR1 e/o CXCR2, verso siti di infiammazione ed è prodotta da moltissimi

tipi cellulari differenti, come macrofagi, cellule epiteliali ed endoteliali (Rotondi, et al. 2018) (Yi, et al. 2024).
CXCL8 e i suoi recettori svolgono un ruolo cruciale promuovendo la crescita tumorale, il comportamento metastatico delle cellule e l'angiogenesi: è, infatti, una chemochina protumorigenica. I neutrofili seguono il gradiente chemiotattico di CXCL8 e, una volta *in situ*, rilasciano enzimi come le MMP che rimodellano la TEM. CXCL8 stimola le cellule endoteliali a secernere VEGF favorendo la neoangiogenesi (Bazzichetto, et al. 2026). Questo facilita la migrazione delle cellule tumorali verso i vasi sanguigni.
CXCL8 è, inoltre, responsabile della formazione, del mantenimento e dell'invasione delle cellule staminali tumorali in tumori come quello al colon, al seno e al pancreas (Xiong, et al. 2022).

Il legame tra CXCL8 e CXCR1/2 può attivare cascate di segnalazione differenti a seconda della proteina G coinvolta. La cascata di segnalazione attivata da CXCL8 può, inoltre, trans-attivare indirettamente anche i recettori di alcuni fattori di crescita come EGFR e VEGFR che a loro volta attiveranno le rispettive cascate di segnalazione, amplificando il segnale (Xiong, et al. 2022).
La secrezione di CXCL8 è principalmente regolata dal fattore di trascrizione nucleare kB (NF-kB) e dalla proteine attivatrice 1 (AP1) (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).
I pathway di segnalazione che coinvolgono maggiormente CXCL8 sono quelli delle MAPK e di PI3K (Bazzichetto, et al. 2026). PI3K è attivato dalla subunità βγ della proteina G e permette l'attivazione di Akt e mTOR che promuovono la proliferazione, la migrazione e l'invasione cellulare. L'attivazione della proteina G monomerica Ras e, successivamente, della cascata delle MAPK porta, invece, a proliferazione, sopravvivenza e infiammazione dei tessuti (Bazzichetto, et al. 2026) (Coperchini, Greco e Rotondi 2023). Un'altra segnalazione che riguarda CXCL8 è quella coinvolta nella EMT regolata da JAK2/STAT3. CXCL8 promuove anche la secrezione di MMP che permettono il rimodellamento dei tessuti metastatici (Liu, et al. 2016).
CXCL8, in condizioni fisiologiche, è quasi o del tutto assente nei tessuti sani mentre è over-espressa in moltissimi tumori solidi ed ematici (Rotondi, et al. 2018). È, infatti, possibile utilizzare i livelli ematici di CXCL8 come marker prognostico in pazienti affetti da tumore.
Oltre a CXCL8, anche i recettori CXCR1/2 sono over-espressi in infiammazioni croniche o acute e in vari tipi di tumore. Questo comportamento fa di questi elementi degli ottimi bersagli teorici per il trattamento di queste condizioni. Inibire l'asse CXCL8-CXCR1/2 con *small molecules* o anticorpi rappresenterebbe una buona terapia contro l'immunosoppressione del microambiente tumorale (Han, et al. 2021).

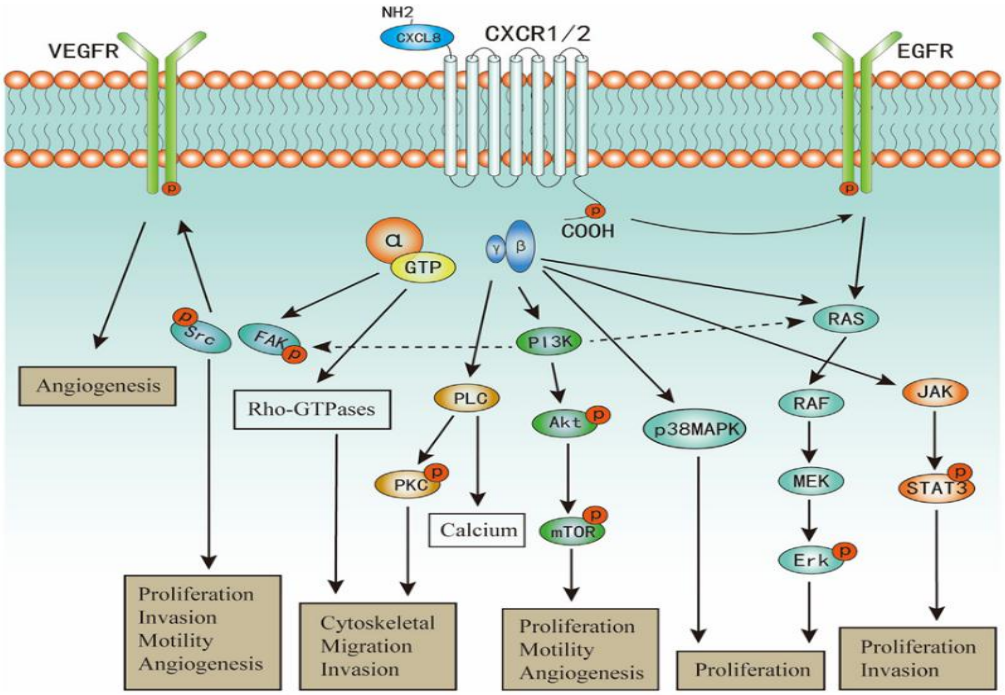


Figura 10. *Le principali cascate di segnalazione coinvolte nell'attivazione di CXCL8* (Xiong, et al. 2022)

2.2.2 CCL2

CCL2, o *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, è una chemochina monomerica espressa in moltissimi tipi cellulari differenti, con lo scopo di reclutare monociti, linfociti T e cellule Natural Killer (NK) attraverso il legame con CCR2, il suo recettore principale (Kadomoto, Izumi e Mizokami 2021).

I monociti vengono prodotti dal midollo osseo e rilasciati continuamente nel torrente circolatorio dove, quelli che presentano CCR2 sulla membrana, vengono attratti chemiotatticamente dalla secrezione di CCL2 da parte dei tessuti interessati: *in situ*, i monociti matureranno in macrofagi. Queste cellule immunitarie stimoleranno poi la produzione di citochine infiammatorie, come IL-6 e TNF (Kadomoto, Izumi e Mizokami 2021).

CCL2 è associato allo sviluppo di molte malattie di tipo infiammatorio causate dall'infiltrazione di monociti, come psoriasi, artrite reumatoide e aterosclerosi (Kadomoto, Izumi e Mizokami 2021).

In un contesto prettamente tumorale, invece, CCL2 è associato al rimodellamento del microambiente tumorale stimolando la secrezione di MMP. Se rilasciato dalle stesse cellule tumorali o dai CAF, CCL2 recluta monociti che vengono convertiti in macrofagi associati al tumore, *Tumor-Associated Macrophages* (TAMs), che supportano ulteriormente l'angiogenesi e il comportamento metastatico delle cellule tumorali. Viene, inoltre, soppressa l'attività di cellule T citotossiche riducendo l'attività

antitumorale: tutto questo permette di considerare CCL2 una chemochina pro-tumorigenica (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

Questa variabilità di comportamenti di CCL2 è dovuta, anche in questo caso, dall'ampia varietà di proteine G che CCR2 può attivare in risposta alla segnalazione. CCL2 può interagire con le cascate delle MAPK, di PI3K/AKT e di JAK/STAT, sostenendo la proliferazione delle cellule tumorali nel primo sito di annidamento, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), l'attecchimento di cellule cancerose metastatiche e la produzione di metalloproteasi (MMPs) come MMP2 e MMP9 che sostengono l'invasione dei tessuti e la neoangiogenesi (Xu, et al. 2021) (Pozzi e Satchi-Fainaro 2024). I livelli di espressione di CCL2 e/o di CCR2 possono essere utilizzati come marker prognostico in pazienti affetti da tumore (Xu, et al. 2021).
Molti tumori presentano una maggiore espressione del recettore CCR2 e una maggiore produzione e secrezione di CCL2. Queste caratteristiche hanno permesso di proporre e iniziare a testare diverse molecole inibitorie e anticorpi per l'immunoterapia che, in associazione con le terapie classiche, stanno dando promettenti risultati (Xu, et al. 2021) (Pozzi e Satchi-Fainaro 2024).

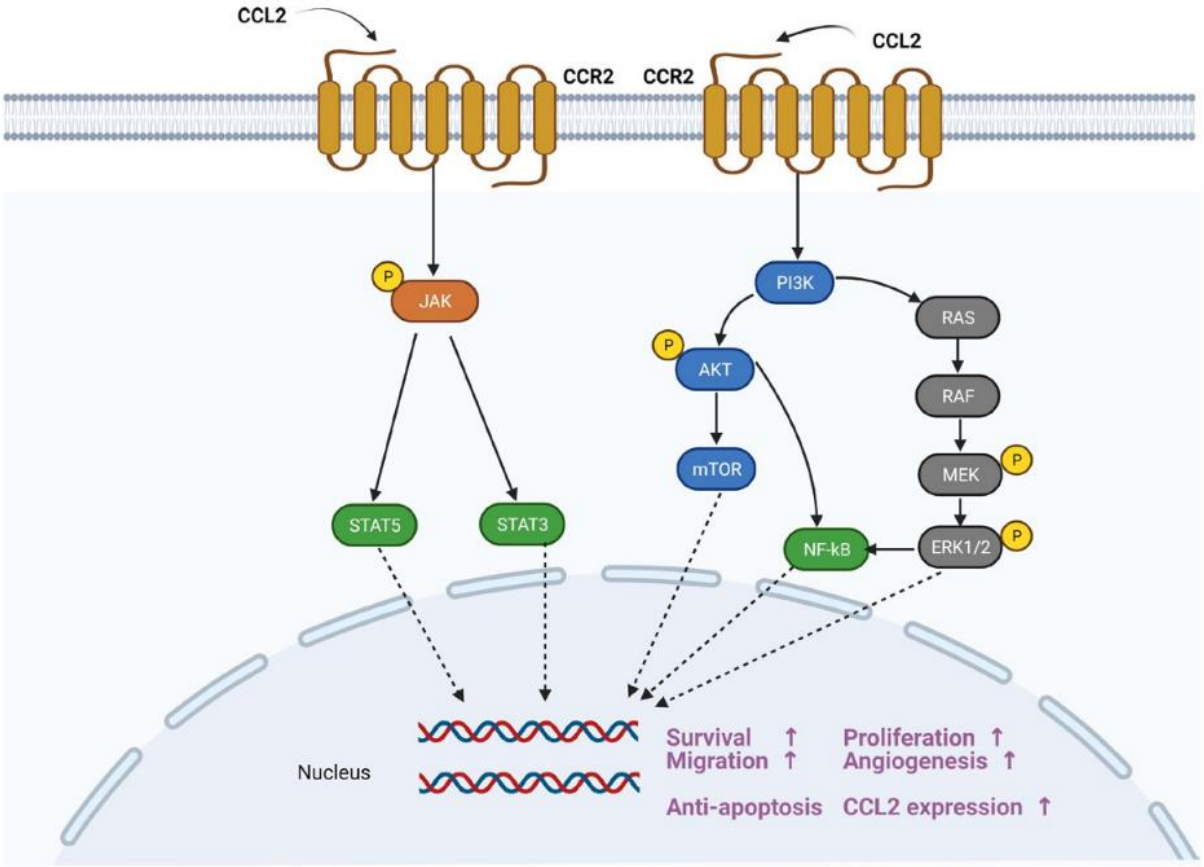


Figura 11. *L'asse CCL2-CCR2 e la via di trasduzione.*

Quando CCR2 si lega al suo ligando CCL2, viene attivata una serie di segnali a valle, come JAK/STAT, p38MAPK e PI3K/AKT. Successivamente, molteplici fattori di trascrizione e geni vengono mobilizzati, portando alla crescita, proliferazione, migrazione delle cellule tumorali e all'aumentata espressione di CCL2. (Xu, et al. 2021)

2.3 Il Microambiente Tumorale Tiroideo

Il microambiente tumorale tiroideo si differenzia dalle caratteristiche generali e comuni del microambiente tumorale grazie alle peculiarità proprie della tiroide. Questa ghiandola ha, infatti, un metabolismo unico di manipolazione degli ioni iodio, una concentrazione basale di specie reattive dell'ossigeno (ROS) molto più alta degli altri tessuti a causa dell'utilizzo di H_2O_2, ha una matrice extracellulare molto più compatta e ricca di collagene e fibronectina ed, essendo una ghiandola endocrina, è estremamente irrorata e ricca di capillari sanguigni.

In aggiunta a queste caratteristiche uniche, il microambiente infiammatorio tiroideo è estremamente ricco di cellule immunitarie, quali cellule NK, cellule dendritiche (DC), linfociti T e macrofagi (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

Le cellule tiroidee, sotto stimolazione attiva, producono e secernono una ampissima gamma di chemochine, in particolare della famiglia CXC, o di molecole infiammatorie di varia natura, come TNF e interferone γ (IFN-γ), che stimolano a loro volta la produzione di chemochine (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

Come anticipato, sono numerose le evidenze secondo cui le chemochine possono avere una differente inclinazione riguardo la crescita e lo sviluppo tumorale.

Nel contesto del tumore alla tiroide, la chemochina anti-tumorigenica più preponderante negli studi in letteratura è sicuramente CXCL10 che lega il recettore CXCR3 (Coperchini, Greco e Rotondi 2023). Questa chemochina viene prodotta da una moltitudine di tipi cellulari differenti del comparto tiroideo, come fibroblasti, cheratinociti, linfociti T, neutrofili e dalle stesse cellule tiroidee. CXCL10 è, in generale, associata ad una mediazione della risposta immunitaria tramite i linfociti T helper ma è anche ben dimostrata la sua evidenza come molecola anti-angiogenica in diversi tipi di tumore (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

Tra le chemochine con attività pro-tumorigenica nel cancro alla tiroide, invece, possiamo elencare CCL15, CXCL12, CXCL1, CCL20 e, come già anticipato, CCL2 e CXCL8 (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

CCL15 secreto dalle cellule follicolari del carcinoma tiroideo è in grado di reclutare i TAMs tramite legame con il recettore CCR1. La presenza dei TAMs incrementa la crescita e lo sviluppo delle cellule cancerose, del loro comportamento metastatico e una riduzione della sopravvivenza del paziente.

CXCL12 svolge un'importante attività nella regolazione dell'angiogenesi tumorale e nella migrazione delle cellule cancerose. In particolare, CXCL12 si trova altamente sovraespressa nei PTC mentre è completamente assente in altre neoplasie tiroidee.

CXCL16 viene secreto con maggiore evidenza dai macrofagi del PTC e lega il suo recettore CXCR6. Anche CXCL16 promuove la malignità del tumore, quindi stimola la migrazione e l'invasività delle cellule cancerose. Per questo motivo, viene associata l'espressione di CXCL16 e di CXCR6 con possibili metastasi a livello dei linfonodi (Mempel, Lill e Altenburger 2024) (Coperchini, Greco e Rotondi 2023).

CXCL1 è un fattore di crescita espresso sia dalle cellule tiroidee sane che da quelle patologiche e lega il recettore CXCR2. Uno studio ha evidenziato come CXCL1 potrebbe promuovere la proliferazione dei mastociti nel tessuto tumorale modulando, attraverso la secrezione di proteasi e citochine, fenomeni come angiogenesi e invasione della TEM.

Un'altra chemochina fortemente espressa dai PTC è CCL20 e, di conseguenza, è fortemente espresso anche il recettore CCR6 a cui si lega. CCL20 è anche estremamente presente nelle linee tumorali tiroidee TPC-1 e BCPAP. In generale, CCL20 promuove l'acquisizione di un comportamento più aggressivo del tumore.

CCL2 è fondamentale in tutte le fasi di formazione del tumore (attecchimento primario, sviluppo, organizzazione di metastasi) e nel traffico dei monociti infiammatori promuovendo l'infiltrazione di TAMs (Mempel, Lill e Altenburger 2024).

La prima chemochina scoperta è stata, come anticipato, CXCL8 che lega CXCR1 e CXCR2, creando un gradiente nel microambiente tumorale che attira i neutrofili e permette una migrazione verso i vasi sanguigni delle cellule tumorali con comportamento metastatico. CXCL8 viene espressa a livelli molto bassi e, a volte, non rilevabili nei tessuti normali in quanto è prevalentemente legata a quadri infiammatori e tumorali.
Nel 1992 viene provato che cellule tiroidee normali producono CXCL8 che viene regolato positivamente anche dal metabolismo dello iodio. È stato successivamente dimostrato che CXCL8 è la chemochina più abbondante nelle cellule dei tumori PTC e ATC.
Avendo appurato la capacità delle chemochine di influire sulla progressione tumorale, sia positivamente che negativamente, si è proposta la teoria secondo la quale, inducendo una minore secrezione delle chemochine pro-tumorigeniche o stimolando quelle anti-tumorigeniche, si potrebbe

rallentare lo sviluppo dei tumori. Il ruolo generale delle chemochine è quello di organizzare l'infiltrazione immunitaria nella massa tumorale, indispensabile per una buona riuscita delle immunoterapie. Tuttavia, molti tumori, detti tumori freddi, riescono a sfuggire all'attacco immunitario estromettendo le cellule del comparto immunitario dal loro microambiente. È necessario utilizzare terapie che inducano la secrezione di chemochine per permettere l'ingresso di cellule T all'interno della massa tumorale.

Altre terapie immunoterapiche possono utilizzare anticorpi, *small molecules* ed altri composti che mirano ad interferire con le chemochine circolanti o che permettono la stimolazione dell'immunità contro specifici antigeni tumorali (Tumor Specific Antigens TSA). Uno degli esempi più eclatanti di queste terapie è stato lo sviluppo di farmaci contro il recettore CXCR4 per mobilitare cellule staminali ematopoietiche in pazienti che necessitano di un autotrapianto. Inoltre, negli ultimi vent'anni, sono stati sviluppati numerosi inibitori di CXCR1/2, inibitori del rilascio di CXCL8 e anticorpi contro l'asse CXCL8-CXCR1/2, anche nel contesto del tumore alla tiroide.

2.4 Strategie Alternative e Innovative nella Cura del Tumore della Tiroide

Come precedentemente trattato, le terapie ordinarie per i tumori della tiroide sono la chirurgia e il trattamento con lo iodio radioattivo ^{131}I, la chemioterapia e la radioterapia.

Tuttavia, anche se in piccolissima percentuale, alcuni tumori non rispondono a dovere all'utilizzo di queste terapie. L'unica soluzione è, quindi, sviluppare nuove strategie per inibire il tumore e il suo microambiente. Queste terapie innovative si basano sull'utilizzo di particolari molecole farmacologiche, come anticorpi o *small molecules*, che sono attualmente in fase di trial clinico e che permettono di aggredire il tumore dall'interno: moltissimi inibitori di recettori e ligandi specifici, inibitori di check-point cellulari e anticorpi monoclonali di varia natura. Si elencano alcuni dei più promettenti.

- Coperchini *et al.* (2024) propongono l'asse CXCL8-CXCR2 come potenziale bersaglio terapeutico per il tumore della tiroide utilizzando la *small molecule* AZD5069, sviluppata da AstraZeneca S.p.A., quale antagonista del recettore CXCL2. Il trattamento con AZD5069, *in vivo*, inibisce il reclutamento dei TAMs nel microambiente tumorale. Coperchini *et al.* (2024) sviluppano esperimenti *in vitro* con cellule umane tiroidee normali (NHT) e tumorali (BCPAP, 8505C, 8305C e TPC-1) trattate con concentrazioni crescenti di AZD5069 per 24, 48 e 72 ore. La vitalità di tutti i tipi cellulari non viene compromessa dal trattamento, se non con il trattamento di 72 ore alle concentrazioni maggiori nelle cellule NHT, né viene compromessa la secrezione basale di CXCL8. L'attività di AZD5069 si basa su una down-regolazione del recettore CXCR2 in tutti i tipi cellulari e riduce, di conseguenza, il comportamento migratorio delle cellule trattate (Coperchini, Greco e Petrosino, et al. 2024).

- Coperchini *et al.* (2023) analizzano gli effetti antitumorali *in vitro* di Canagliflozin, un farmaco antidiabetico classificato come inibitore del co-trasportatore Na^+-Glu (SGLT-2). Vengono utilizzate cellule umane tiroidee normali (NHT) e tumorali (8505C e TPC-1) e cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC), trattate per 24 ore a concentrazioni crescenti di Canagliflozin. Le vitalità di tutti i tipi cellulari venivano ridotte e anche la capacità di formazione di colonie delle cellule tumorali. Nelle cellule HUVEC è stata, inoltre, osservata una riduzione della proliferazione cellulare indotta da CXCL8-CCL2 in associazione con Canagliflozin. Questo comportamento è stato poi valutato e confermato anche in entrambe le linee tumorali, quantificando anche CXCL10 e IL-6. Il trattamento con Canagliflozin induce anche una riduzione del comportamento migratorio delle cellule tumorali (Coperchini, Greco, et al. 2023).
- Coperchini *et al.* (2022) hanno verificato che l'utilizzo di vitamina D3 promuove numerosi benefici contro la progressione tumorale, intaccando diversi meccanismi come la proliferazione e la migrazione delle cellule cancerose. Due linee umane tiroidee (TPC-1 e 8505C) sono state trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti di vitamina D3. Questo trattamento non influisce sulla vitalità delle cellule ma ne riduce significativamente la spontanea migrazione nel tessuto inibendo la secrezione di chemochine: CXCL8 e CCL2 in TPC-1 e CCL2 in 8505C (Coperchini, Greco e Croce, et al. 2022).
- Il gruppo di Ravaud *et al.* (2017) ha proposto l'utilizzo di una molecola già in commercio per il trattamento del tumore della tiroide. Questo lavoro si basa sull'utilizzo del Sunitinib, una *small molecule* prescritta per via orale e utilizzata contro il carcinoma a cellule renali e il tumore stromale gastrointestinale resistente. Sunitinib è un inibitore delle TK di numerosi tipi cellulari, come VEGFR e PDGFR, che porta alla soppressione dell'angiogenesi e dello sviluppo tumorale, inibendo il microambiente. In questo studio 71 pazienti, 45 con PTC/FTC/ATC e 26 con MTC, sono stati sottoposti a trattamento con Sunitinib con 50mg/d per un periodo complessivo di 4 settimane, seguite da 2 settimane senza trattamento. Dai risultati, questa molecola è efficace nei carcinomi tiroidei differenziati (FTC e PTC) e nei carcinomi midollari avanzati (MTC) ma ha, tuttavia, una tossicità sistemica importante, soprattutto a livello cardiaco. Oggi il Sunitinib è stato sostituito da farmaci con una tossicità più sopportabile (Ravaud, et al. 2017).
- Come sostituto del Sunitinib, Subbiah *et al.* (2021) propongono uno studio su pazienti provenienti da più stati, tutti con un tumore della tiroide con mutazione del gene RET. RET codifica per un recettore tirosin-chinasico che, se portatore di mutazioni, funge da driver oncogenico nei tumori MTC e PTC. I farmaci come Sunitinib mostrano una tossicità estremamente elevata dovuta all'azione del farmaco non univoca. Utilizzando, invece, degli

inibitori di RET mutato si massimizza l'efficacia del trattamento riducendone tossicità ed effetti off-target. L'inibitore di RET utilizzato in questo studio è il Pralsetinib, somministrandolo ai pazienti con una dose media di 383mg/d per un trattamento medio di 11,8 mesi. Gli effetti indesiderati più comuni sono stati neutropenia, linfopenia e anemia, comuni anche nelle chemioterapie classiche. Tutti i pazienti hanno osservato una diminuzione delle masse tumorali ed è considerato altamente efficace sia nei tumori MTC che PTC. Il suo profilo di tossicità limitato potrebbe condurre i farmaci inibitori selettivi di RET a sostituire gli inibitori delle multichinasi come standard di cura (Subbiah, et al. 2021).

- Liotti *et al.* (2017) propone, sulla stessa linea del precedente studio, la sperimentazione sul tumore della tiroide di una molecola già in utilizzo. Viene utilizzato il Reparixin, un inibitore allosterico non competitivo dei recettori CXCR1/2. Questo farmaco viene testato sia su cellule normali di tiroide (PC CL3 di ratto e Nthy-ori 3.1 umane) che su cellule ATC umane (8505C, CAL62 e SW1736), utilizzando concentrazioni crescenti della molecola e analizzando le colture ogni giorno per 10 giorni. I risultati sono estremamente promettenti in quanto, Reparixin, riduce proliferazione e sopravvivenza delle linee tumorali, senza alcun effetto sulle cellule sane di tiroide, inibisce la EMT e la chemioresistenza agendo selettivamente su CXCR1 e CXCR2. (Liotti, et al. 2017)
- Negli ultimi anni l'impiego di agenti in grado di potenziare la capacità del sistema immunitario del paziente di riconoscere ed eliminare le cellule neoplastiche ha registrato una rapida espansione grazie all'introduzione degli inibitori dei checkpoint immunitari. In questo modo il sistema immunitario è in grado di riconoscere epitopi tumore-specifici e neoantigeni espressi dalle cellule neoplastiche, favorendone l'eliminazione.

  Febrero *et al.* (2024) propongono l'analisi dello studio ATLEP (*Anaplastic Thyroid Carcinoma Lenvatinib Pembrolizumab*) dove viene valutata l'attività sinergica di lenvatenib e pembrolizumab nei tumori ATC nei pazienti dove vengono somministrati lenvatenib 14-24 mg/d e pembrolizumab 200mg ogni tre settimane, osservando una remissione completa nel 66% dei casi (Febrero, et al. 2024).

  Sempre il gruppo di Febrero *et al.* (2024) analizzano l'utilizzo di spartalizumab, un anticorpo monoclonale (mAb) umanizzato diretto contro il recettore PD-1 (*Programmed Death-1*). Questo recettore in condizioni fisiologiche frena i linfociti T dall'attivazione involontaria causativa delle patologie autoimmuni. I tumori sfruttano questa via iperproducendo i ligandi di PD-1 in modo che l'attivazione del recettore sia costitutiva e che venga inibito il richiamo leucocitario all'interno del tumore (Keir, et al. 2008). Spartalizumab si lega competitivamente con alta affinità a PD-1 sulle cellule immunitarie, riattivando la risposta dei linfociti T contro le cellule tumorali (Febrero, et al. 2024). Si è, tuttavia, notato come l'inibizione di checkpoint

immunitari possa causare disfunzioni della ghiandola tiroidea che sfocerebbero in ipertiroidismo, ipotiroidismo o tiroiditi generalizzate (MacDonald, et al. 2020).

CAPITOLO 3

3. RIPOSIZIONAMENTO DEI FARMACI

3.1 Perché è importante

Negli ultimi vent'anni, i brevetti presentati e approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per nuove molecole terapeutiche e/o nuove applicazioni sono diminuiti drasticamente e, allo stesso tempo, i costi delle ricerche e delle materie prime sono sempre più in rialzo (Wieder e Adam 2022). Il successivo calo delle produzioni dei farmaci oncologici ha portato, quindi, all'esplorazione di farmaci non oncologici per il trattamento di queste patologie. La logica alla base di questo ragionamento sta nel processo intrinseco della produzione dei farmaci: oltre alla realizzazione della molecola in sé, sono necessari numerosi test *in vitro* e *in vivo*, le fasi I-II-III del trial clinico in popolazioni sempre più ampie ed eterogenee per verificarne l'efficacia e la sicurezza e l'approvazione da parte della FDA per la messa in commercio del farmaco. Tutti questi passaggi richiedono circa 2 miliardi di dollari e 10-15 anni per ciascun nuovo farmaco che, utilizzando molecole già presenti in commercio, vengono drasticamente ridotti, necessitando solo di nuovi test sulla sicurezza e sull'efficacia del farmaco (Ashburn e Thor 2004).

In aggiunta a questo, molto spesso i farmaci antitumorali in uso diventano completamente inutilizzabili una volta che il tumore ne diventa resistente, imponendo al mercato di farmaci oncologici un *turn over* estremamente rapido (Florent, Poulain e N'Diaye 2020). Moltissimi farmaci non arrivano neanche all'approvazione a causa di test non superati *in vivo* e *in vitro* e di effetti collaterali nella popolazione non tollerabili.

Si stima che solo un farmaco antitumorale su 5.000-10.000 proposti venga approvato dalla FDA (Florent, Poulain e N'Diaye 2020)

Nel 2004, Ashburn e Thor propongono il concetto di "riposizionamento dei farmaci" definendolo come la strategia per identificare nuovi utilizzi di molecole terapeutiche già approvate con l'obiettivo di accelerare lo sviluppo di nuovi farmaci e diminuirne i costi.

Nel riposizionamento dei farmaci è fondamentale condurre un'analisi accurata della relazione tra farmaco e malattia (Greco, et al. 2023). Questa analisi può essere svolta con approcci differenti, ciascuno basato su specifiche strategie, da metodi computazionali a studi sperimentali, fino all'integrazione di dati clinici.

Un approccio sicuramente innovativo che permetterà di velocizzare la ricerca di queste molecole è quello proposto da Wieder e Adam (2022) ovvero l'utilizzo sinergico di Intelligenza Artificiale (IA), delle scienze omiche e dei cosiddetti *real-world data* (RWD), cioè dati clinici reali provenienti dai distretti ospedalieri. Questa metodica permetterebbe di individuare potenziali associazioni farmaco-malattia anche complesse da identificare con i normali trial clinici rialzo (Wieder e Adam 2022).

3.2 Casi principali

Secondo Florent, Poulain e N'Diaye (2020), la letteratura scientifica abbonda di studi atti a dimostrare l'efficacia di un farmaco in un altro ambito e afferma che, al momento della pubblicazione dell'articolo, già 94 farmaci riposizionati sono arrivati effettivamente alla vendita.
Il caso più antico e famoso di riposizionamento farmacologico è sicuramente l'acido acetilsalicilico. Nato come analgesico a fine Ottocento, negli anni 80 del Novecento inizia ad essere utilizzato come farmaco anticoagulante, basato sul lavoro di John Vane che gli valse il Premio Nobel per la Medicina nel 1982.

Nel contesto del tumore della tiroide, molti studi suggeriscono una possibile correlazione tra farmaci antidiabetici e il trattamento di queste neoplasie, *in vivo* e *in vitro* (Greco, et al. 2023). I farmaci contro il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) agiscono attraverso diversi meccanismi: alcuni riducono il glucosio ematico inducendo una secrezione maggiore di insulina in circolo mentre altri rallentano l'assorbimento intestinale di glucosio. La correlazione primaria tra il T2DM e il tumore della tiroide si basa sul fatto che il T2DM è riconosciuto universalmente come un fattore di rischio per lo sviluppo di un'ampia varietà di tumori, come quelli colon-rettali. Inoltre, molti autori suggeriscono che iperinsulinemia, iperglicemia e l'infiammazione cronica derivata dal T2DM possano essere fattori di rischio per lo sviluppo e la progressione di tumori della tiroide (Greco, et al. 2023). In secondo luogo, le cellule tumorali tiroidee mostrano una riprogrammazione metabolica complementare all'attività di alcuni farmaci antidiabetici. Un esempio di questo comportamento è una maggiore richiesta di glucosio da parte delle cellule tumorali per la sopravvivenza con un metabolismo anaerobio e l'utilizzo di farmaci inibitori dell'*uptake* del glucosio come le gliflozine.
Il gruppo di Greco et al. (2023) hanno analizzato il comportamento di alcune classi di farmaci antidiabetici:

- I Biguanidi, come metformina e fenformina, sono farmaci ipoglicemizzanti per uso orale derivati dalla pianta *Galega officinalis*. La metformina è stata brevettata alla fine degli anni Sessanta ed è tutt'oggi uno dei farmaci ipoglicemizzanti più usati mentre la fenformina, più potente della metformina, è stata ritirata dal mercato alla fine degli anni Settanta per acidosi lattica.

  Le proprietà antitumorali dei biguanidi si basano sull'interazione del farmaco con diverse vie metaboliche, come l'attivazione della via AMPK con riduzione della proliferazione cellulare e della produzione di molecole infiammatorie, come la secrezione di CXCL8 indotta da TNFα. Nel contesto del tumore alla tiroide, i biguanidi stimolano l'espressione di NIS migliorando la captazione dello I e, di conseguenza, questo comportamento potrebbe migliorare la risposta dei tumori tiroidei nei trattamenti con ^{131}I.

- Le Gliflozine sono farmaci inibitori del simporto Na^+/Glu (SGLT) sulle membrane cellulari. Questa classe di molecole inibisce l'uptake renale del glucosio aumentandone la secrezione nelle urine. Nelle cellule cancerose questi farmaci inibiscono l'isoforma SGLT2 del trasportatore. Un farmaco in particolare, il Canagliflozin, inibisce la respirazione mitocondriale e la proliferazione cellulare, sempre attraverso la via AMPK. Questo provoca induzione dell'apoptosi, riduzione della crescita tumorale e attivazione della risposta al danno del DNA.
- I Tiazolidinedioni (TZDs) agiscono principalmente attivando il recettore nucleare PPAR-γ coinvolto in processi metabolici, proliferativi e infiammatori delle cellule. I farmaci appartenenti a questa classe agiscono sulle cellule tumorali inibendone la proliferazione e favorendo l'attivazione di meccanismi apoptotici. In particolare, aumentano l'espressione del NIS che potrebbe contribuire, come visto in precedenza, ad una migliore sensibilità delle cellule tumorali ai trattamenti con ^{131}I. Tra i vari composti, il pioglitazone appare il candidato più interessante dal punto di vista clinico grazie alle evidenze ottenute nei tumori con fusione PAX8-PPARγ dove si sono osservate riduzione delle metastasi e riduzione del volume tumorale. Inoltre, è stata osservata una maggiore infiltrazione di macrofagi e linfociti T nel tumore. Il rosiglitazone, studiato nei tumori differenziati e negli ATC, induce apoptosi, aumenta l'espressione del NIS, ma si distingue per le sue proprietà di ri-differenziazione e di inibizione dell'EMT. Il farmaco ostacola, infatti, l'attivazione di TGF-β e riduce l'espressione di MMP-2 e della via MAPK, limitando la capacità invasiva delle cellule tumorali.

3.3 Clofoctol

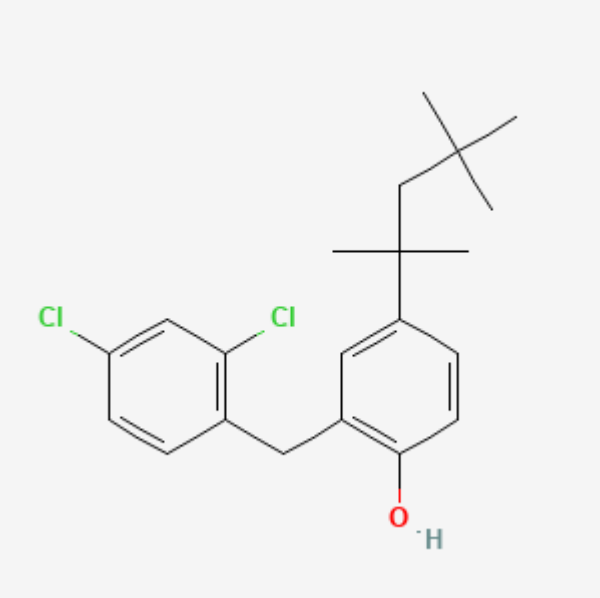


Figura 12. *Struttura di Clofoctol*

https://www.pharmacompass.com

Clofoctol è un farmaco sintetico antimicrobico attivo soprattutto nel trattamento contro i batteri positivi alla colorazione di Gram e utilizzato per la cura di patologie delle vie respiratorie superiori e inferiori (Bailly e Vergoten 2021). Clofoctol agisce sui batteri interferendo sulla sintesi del peptidoglicano e, quindi, sull'integrità della parete batterica agendo anche come agente lisante. È estremamente indicato contro la farmaco-resistenza sviluppata dai batteri avendo un assorbimento molto rapido, in 30 min dall'assunzione rettale, infatti, si arriva ad un picco ematico del 98% (Scaglione, et al. 2013).

Nel 2007, Clofoctol è stato notato come inibitore tumorale nella sintesi proteica e nella crescita cellulare, osservando sia un'attività diretta che indiretta del farmaco (Bailly e Vergoten 2021).
L'attività indiretta di Clofoctol si basa sull'attivazione dei sensori UPR (Unfolded Protein Response) a seguito di uno stress del Reticolo Endoplasmatico (RE) che causa un aumento delle proteine mal ripiegate. I sensori UPR attivati avviano le cascate di segnalazione corrispondenti che portano ad una riduzione della sintesi proteica nella cellula (Bailly e Vergoten 2021).
L'attività diretta di Clofoctol si basa, invece, sul legame diretto a due molecole distinte: il complesso Cdc7/Dbf4 e la proteina CSDE1. Il complesso Cdc7/Dbf4 è un enzima fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare: questo si attiva durante la fase S del ciclo e guida la corretta duplicazione del DNA. Clofoctol interrompe questa attività sinergica, obbligando l'arresto del ciclo cellulare tumorale in fase G1. CSDE1 è, invece, una proteina regolatrice che agisce sulla traduzione e sulla stabilità degli mRNA. Clofoctol lega direttamente CSDE1 inibendone la degradazione proteolitica e aumentando l'espressione del gene oncosoppressore KLF13, che CSDE1 regola (Bailly e Vergoten 2021).

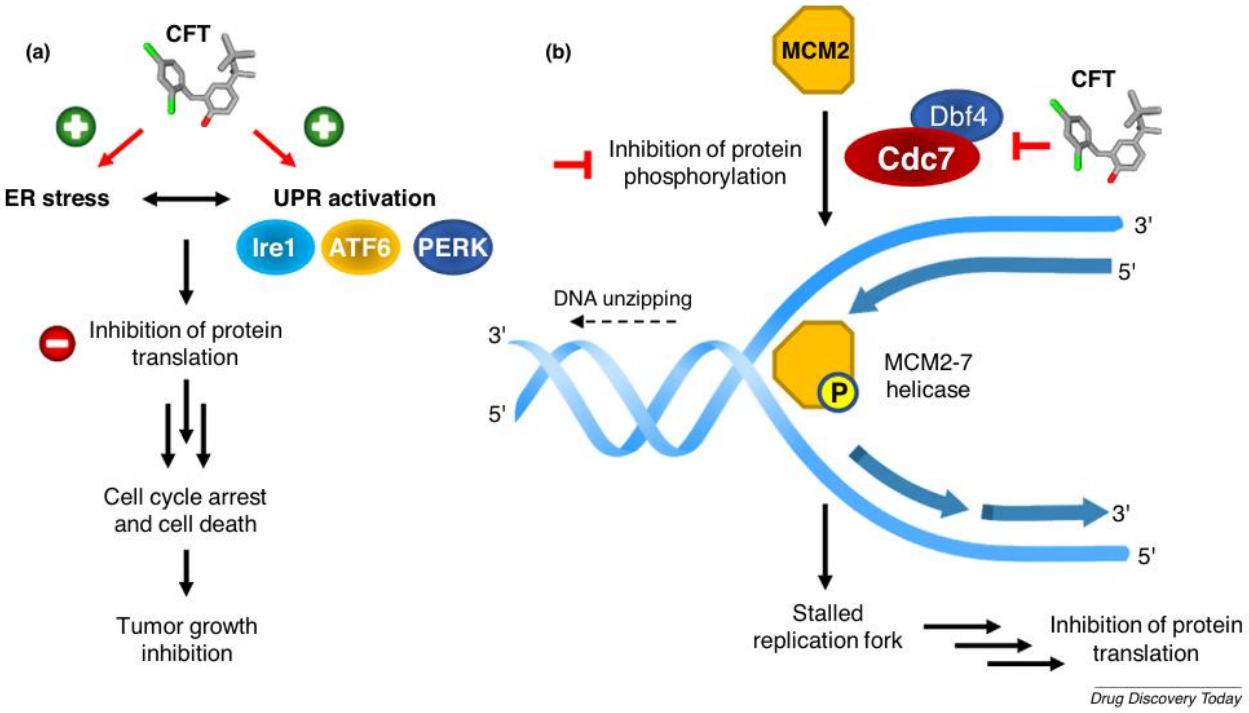


Figura 13. *Meccanismo d'azione di Clofoctol.*

(a) Meccanismo indiretto tramite attivazione dei sensori UPR e

(b) meccanismo diretto tramite il legame con il complessoCdc7/Dbf4 (Bailly e Vergoten 2021)

L'utilizzo di Clofoctol come farmaco antitumorale ha avuto successo nel trattamento del glioma (Hu, et al. 2019), del tumore al seno triplo negativo (Wang, et al. 2025), del cancro gastrico (Liu, et al. 2025) e del tumore alla prostata (Fan, et al. 2018) (Sekhoacha, et al. 2022).

I gliomi sono tumori primari del Sistema Nervoso Centrale (SNC) che originano dalle cellule della glia. Tra i gliomi si annoverano gli astrocitomi, gli oligodendrogliomi e gli ependimomi, derivati dalle rispettive famiglie cellulari gliali. La forma più aggressiva, il glioblastoma, copre più del 55% dei casi di questa famiglia di tumori e la sua prognosi è molto spesso infausta anche a seguito di trattamento (Hu, et al. 2019). Questo comportamento si pensa sia dovuto alla presenza delle cellule staminali gliomali (Glioma Stem Cells GSC) che, anche a seguito di radio- e chemioterapia, permettono una ricomparsa rapida del tumore. Le GSC sono a tutti gli effetti cellule staminali tumorali e mantengono, quindi, la loro capacità di autorinnovamento, dando origine a cellule tumorali progenitrici e a cellule tumorali differenziate che accrescono la massa del parenchima tumorale (Hu, et al. 2019). È stato dimostrato che le GSC sono anche responsabili in parte della neoangiogenesi tumorale, della risposta all'ipossia e dell'invasione dei tessuti sani circostanti (Hu, et al. 2019). Nei glioblastomi, il trattamento con Clofoctol ha avuto un buon riscontro, dimostrando buona efficacia antitumorale e bassa tossicità, essendo in grado di attraversare la barriera ematoencefalica grazie alla sua lipofilicità. Il meccanismo di Clofoctol nei glioblastomi riprende quelli citati in precedenza:

all'interno delle GSC il farmaco lega la proteina UNR, una RNA-binding protein che regola la stabilità e la traduzione di specifici mRNA. UNR induce l'aumento dell'espressione del gene oncosoppressore KLF13 che induce apoptosi nelle cellule tumorali (Hu, et al. 2019).

Il tumore al seno, dal punto di vista clinico-istologico, può essere distinto tra tumore duttale, se origina dall'epitelio che costituisce i dotti lattiferi, o lobulare, se origina dalle ghiandole lattifere vere e proprie (Barzaman, et al. 2020). Dal punto di vista molecolare, invece, il carcinoma al seno viene suddiviso in 3 forme distinte (Barzaman, et al. 2020):

- ER/PR+ HER2- dove le mutazioni sono a carico dei recettori per gli estrogeni (ER) e/o per il progesterone (PR) e non a carico del recettore per il fattore di crescita epidermico 2 (HER2); questo tumore copre il 50-60% dei carcinomi al seno
- ER/PR+/- HER2+ dove le mutazioni sono a carico di HER2 e possono o non possono esserci mutazioni a carico di ER/PR; questo tumore copre il 20-30% dei carcinomi al seno
- Triplo negativo dove nessuno dei recettori ER/PR/HER2 è coinvolto nello sviluppo del carcinoma ma comprende tutte le altre possibili mutazioni (es. BRCA1/2); questo è il tumore più raro tra quelli al seno coprendo il 10% dei casi ed è la forma ereditaria di questi tumori con un comportamento altamente metastatico

Nel trattamento di questo terzo tipo di carcinoma al seno, Clofoctol si propone di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali e del comportamento invasivo di questo tipo di tumore. Clofoctol, in particolare, agisce sia direttamente che indirettamente contro il tumore triplo negativo (Wang, et al. 2025). Come azione diretta, Clofoctol provoca una perdita del potenziale della membrana mitocondriale, un aumento dei ROS e il rilascio del citocromo C nel citoplasma della cellula. Il rilascio del citocromo C provoca l'attivazione della via apoptotica intrinseca regolata dalle caspasi effettrici e risultante con la morte della cellula tumorale (Wang, et al. 2025).
Indirettamente, invece, a seguito della fuoriuscita del citocromo C, Clofoctol causa il rilascio del DNA mitocondriale (mtDNA) che viene rilevato da cGAS, un sensore citosolico di DNA batterico e virale che attiva la sua cascata di segnalazione: cGAS produce cGAMP (guanosina monofosfato-adenosina monofosfato ciclico) da ATP e GTP che permette l'attivazione di STING; quest'ultimo è una proteina effettrice posta sulla membrana del RE che, una volta attivata, trasloca a livello dell'apparato di Golgi e fosforila TBK1 e IRF3 (Wang, et al. 2025). Questi attivano la produzione di citochine pro-infiammatorie e di interferoni rendendo il tumore più immunogenico e visibile alle cellule del sistema immunitario, più reattive contro il tumore (Wang, et al. 2025).

Il carcinoma gastrico rientra tra i tumori più diffusi a livello globale ed è la terza causa di mortalità oncologica nel mondo (Liu, et al. 2025). Un ruolo fondamentale nella progressione e nella malignità

di questo tumore è sicuramente attribuibile alle cellule staminali tumorali gastriche (GCSCs), caratterizzate da una elevata capacità di autorinnovamento e da una marcata resistenza ai trattamenti antitumorali tradizionali. In questo contesto, il gruppo di Liu *et al.* (2025) ha identificato Clofoctol come potenziale farmaco antitumorale in grado di colpire selettivamente le GCSCs.

Attraverso uno screening farmacologico tra 206 farmaci approvati dalla FDA, Clofoctol è risultato come il composto più efficace nell'inibire l'espressione della β-catenina, molecola effettrice nella via di segnalazione Wnt/β-catenina, fondamentale per il mantenimento delle proprietà staminali tumorali. Il trattamento ha determinato, infatti, una riduzione dell'espressione dei geni associati alla staminalità cellulare: in particolare, l'analisi trascrittomica ha identificato l'asse SerpinE1/β-catenina come principale bersaglio (Liu, et al. 2025).

In parallelo, Clofoctol induce una evidente morte cellulare nelle GCSCs attraverso il meccanismo di necroptosi mediata da TNF-α. Il trattamento stimola la produzione e il rilascio di TNF-α e l'attivazione delle proteine RIPK1, RIPK3 e MLKL che compongono il pathway canonico della necroptosi.

La necroptosi è una forma regolata di morte cellulare programmata che combina caratteristiche della necrosi e dell'apoptosi (Yan, et al. 2023). La necroptosi determina la perdita dell'integrità della membrana plasmatica e il rilascio di segnali pro-infiammatori capaci di attivare la risposta immunitaria (Yan, et al. 2023). L'attivazione della necroptosi avviene frequentemente in seguito alla stimolazione del TNF-α che permette la formazione di un complesso molecolare RIPK1-RIPK3 e che porta alla fosforilazione della proteina effettrice MLKL. MLKL permeabilizza la membrana plasmatica della cellula e la successiva lisi (Yan, et al. 2023).

Il cancro alla prostata colpisce uomini tra i 45 e i 60 anni appartenenti a tutte le etnie e mostra tassi di mortalità più elevati tra coloro che appartengono ad una fascia socioeconomica inferiore a causa della mancanza di controlli medici e della diagnosi tardiva della patologia (Sekhoacha, et al. 2022). Gli uomini che vanno incontro a recidiva o che presentano un tumore della prostata metastatico vengono sottoposti a terapia di deprivazione androgenica (ADT), radioterapia di salvataggio e chemioterapia. Attualmente, le terapie disponibili risultano più efficaci se impiegate in combinazione; tuttavia, nonostante tali opzioni, il tumore della prostata rimane una malattia incurabile (Sekhoacha, et al. 2022).

Tra le terapie alternative, il gruppo di Fan *et al.* (2018) ha proposto un'analisi sinergica degli effetti di Clofoctol in associazione con Sorafenib nel trattamento del tumore alla prostata (Fan, et al. 2018). Attraverso uno screening della *Johns Hopkins Drug Library* (JHDL) su circa 3.000 farmaci approvati, Clofoctol è emerso come un potente inibitore della proliferazione delle cellule tumorali prostatiche. In particolare, Clofoctol è stato testato su sei diverse linee cellulari tumorali della prostata e ha

riscontrato in tutti i casi valori di *half-maximal inhibitory concentration* (IC_{50}) tra 10-15 μM, nettamente inferiori ai valori plasmatici di 104 μM che altri farmaci mostrano (Wang, et al. 2013).
Trattando le cellule tumorali con Clofoctol, si osserva una massiccia vacuolizzazione citoplasmatica e l'attivazione della risposta alle UPR, inibendo la sintesi proteica della cellula (Wang, et al. 2013) (Fan, et al. 2018).
Ulteriori screening effettuati combinando Clofoctol con 40 diversi inibitori della libreria JHDL hanno identificato Sorafenib un partner fortemente sinergico (Fan, et al. 2018). L'associazione a basse dosi dei due farmaci (Clofoctol 10 μM + Sorafenib 6 μM) determina un blocco del 78% delle cellule in fase G1 del ciclo cellulare e porta un ulteriore 22% ad attivare la morte per apoptosi: al contrario, le singole terapie mostrano un tasso apoptotico ridotto (Fan, et al. 2018). Clofoctol provoca l'accumulo di proteine ubiquitinate e l'aggiunta di Sorafenib potenzia marcatamente la vacuolizzazione citoplasmatica indotta dal Clofoctol.
Questi dati mostrano una forte efficacia delle molecole in assenza di rilevante tossicità sistemica, inquadrando questa combinazione farmacologica come un promettente regime terapeutico (Fan, et al. 2018).

CAPITOLO 4

4. SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso l'Istituto Clinico Maugeri IRCCS (PV) nel Laboratorio per lo studio di Distruttori Endocrini.

Questo lavoro di tesi si propone di analizzare l'attività del farmaco Clofoctol, già antibatterico contro infezioni alle vie aeree causate dall'infezione di batteri Gram positivi, anche se oggi quasi in disuso, e ora rivalutato come possibile farmaco antitumorale in vari modelli sperimentali, sia *in vivo* che *in vitro* (Bailly e Vergoten 2021). Recenti evidenze hanno dimostrato la presenza di un'attività antiproliferativa nelle cellule tumorali di carcinoma prostatico, glioblastoma e glioma mentre comprometterebbe le proprietà staminale delle cellule tumorali nel carcinoma gastrico (Fan, et al. 2018) (Hu, et al. 2019) (Liu, et al. 2025). Clofoctol ha, inoltre, presentato un effetto duale immunomodulatorio e citotossico nel carcinoma mammario triplo-negativo (Wang, et al. 2025). Questi risultati suggeriscono che Clofoctol potrebbe essere un buon candidato per il riposizionamento farmacologico nel trattamento di diversi tipi di cancro.

In questo lavoro, viene studiata l'attività antitumorale di Clofoctol nel contesto del carcinoma tiroideo, il più comune tumore endocrinologico globale. In particolare, Clofoctol è proposto come terapia aggiuntiva alla tiroidectomia e al trattamento con ^{131}I (RAI) nel contesto di tumori refrattari a queste prime terapie d'urto.

Lo scopo di questo studio è indagare se Clofoctol possa esercitare effetti citotossici o antiproliferativi su linee cellulari normali e tumorali della tiroide e se possa modulare alcuni aspetti fondamentali del microambiente tumorale, indagando la secrezione di chemochine a livello extracellulare. In particolare, è stato notato che concentrazioni elevate della chemochina CXCL8, protumorigenica, sono spesso associate a masse tumorali di maggiori dimensioni, ad una prognosi maggiormente infausta e ad una maggiore incidenza nello sviluppo di metastasi (Xiong, et al. 2022).

Numerosi studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che la regolazione del microambiente tumorale tiroideo, in particolare con il controllo e la secrezione di chemochine protumorigeniche come CXCL8 e CCL2, influisce sulla progressione tumorale: l'inibizione di questi fattori rallenta e riduce la proliferazione tumorale e la formazione di metastasi (Yi, et al. 2024).

Ad oggi, l'attività antitumorale di Clofoctol non è ancora stata testata sulle cellule di carcinoma tiroideo. L'obiettivo di questo lavoro di tesi è, pertanto, quello di valutare gli effetti citotossici e antiproliferativi del farmaco su linee cellulari normali e tumorali della tiroide, verificare se Clofoctol possa esercitare degli effetti sul reticolo endoplasmatico e analizzare l'influenza di questo sulla secrezione di chemochine protumorigeniche quali CXCL8 e CCL2, valutando, di conseguenza, la capacità del farmaco di alterare l'equilibrio del microambiente tumorale tiroideo.

CAPITOLO 5

5. MATERIALI E METODI

5.1 Linee Cellulari di Tiroide in coltura

Le cellule normali di tiroide che sono state usate sono le Nthy-ori 3-1, una linea immortalizzata derivata da cellule follicolari tiroidee di una donatrice di 35 anni.

Le cellule tumorali utilizzate appartengono a due linee distinte: BCPAP e TPC-1. La linea BCPAP deriva dal PTC di una donatrice di 76 anni mentre la linea TPC-1 deriva dal PTC di una donatrice adulta.

Tutte le linee cellulari hanno origine umana e provengono da tessuto tiroideo.

Prima dell'uso negli esperimenti, l'identità delle linee cellulari è stata confermata dall'analisi del profilo delle short tandem repeats (STR) messe a confronto con STR di riferimento e ottenendo il 100% di compatibilità.

Tutte le linee cellulari sono state testate per contaminazioni da micoplasma con kit specifico.

Le linee BCPAP e TPC-1 sono state coltivate con terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mentre la linea Nthy-ori 3-1 è stata coltivata con terreno RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, dove è stato sviluppato nel 1966). A entrambi i terreni sono stati aggiunti i supplementi necessari, come da riferimento: da entrambe le soluzioni stock di terreno sono stati prelevati 60 mL e sostituiti con 50 mL di FBS (Fetal Bovine Serum), 5 mL di L-Glutammina e 5 mL di Penicillina/Streptomicina.

5.2 WST-1 come Saggio della Vitalità

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio WST-1, un metodo colorimetrico basato sulla conversione del sale di tetrazolio idrosolubile WST-1 in formazano da parte delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive. L'intensità del segnale colorimetrico risultante è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel campione (Riss, et al. 2016).

Le cellule sono state coltivate nel terreno completo fino ad una confluenza dell'80% per poi essere staccate e riseminate in piastre 96-well flat ad una densità di 20.000 cellule a pozzetto.

Clofoctol è stato utilizzato nei trattamenti a concentrazioni crescenti (0, 5, 10, 15, 30, 100 μM). La scelta delle concentrazioni è stata fatta in accordo con precedenti pubblicazioni.

Dopo un periodo di incubazione di 24, 48 o 72 ore, le cellule sono state trattate per 30 minuti con WST-1 ad una temperatura di 37°C. È stata poi misurata l'assorbanza a 450nm utilizzando un lettore *Victor NIVO Multimode Plate Reader*.

Tutti i risultati sono stati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti, ciascuno effettuato in triplicato.

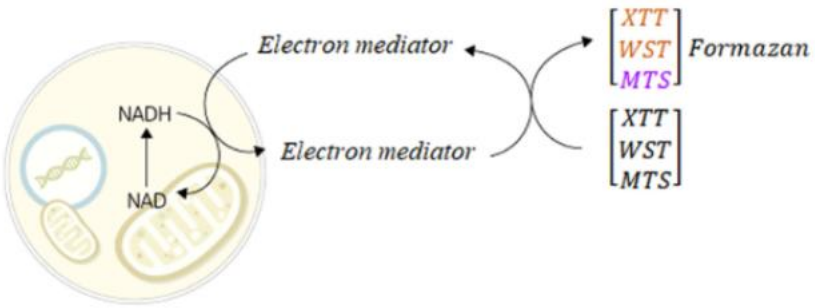


Figura 14. *Saggio con Sali di Tetrazolio*
Nelle cellule metabolicamente attive, il NADH prodotto dal metabolismo cellulare fornisce equivalenti riducenti che vengono trasferiti ai sali di tetrazolio XTT, MTS e WST. La riduzione di questi composti porta alla formazione di prodotti di formazano idrosolubili, la cui quantità è proporzionale all'attività metabolica e al numero di cellule vitali presenti nel campione, misurabile direttamente nel terreno di coltura mediante spettrofotometria (Khalef, et al. 2024).

5.3 Saggio di Proliferazione

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante il saggio Crystal Violet, un metodo colorimetrico basato sulla capacità del colorante di legare DNA e proteine delle cellule aderenti. Dopo la rimozione delle cellule non vitali o distaccate, la quantità di colorante trattenuta è proporzionale alla biomassa cellulare e rappresenta una misura indiretta della proliferazione e della sopravvivenza cellulare (Khalef, et al. 2024).

Le cellule sono state coltivate nel terreno completo fino ad una confluenza dell'80% per poi essere staccate e riseminate in piastre 96-well flat ad una densità di 20.000 cellule a pozzetto.
Clofoctol è stato utilizzato nei trattamenti a concentrazioni crescenti (0, 5, 10, 15, 30, 100 μM), in accordo con precedenti pubblicazioni.
Dopo un periodo di incubazione di 24, 48 o 72 ore, le cellule sono state fissate con metanolo freddo per 20 minuti e colorate con *Crystal Violet* 0.5% per 5 minuti. È stato, poi, aggiunto alle cellule del sodio dodecil solfato (SDS) 1% per rilasciare il *Crystal Violet* presente in eccesso.
È stata misurata la densità ottica (OD) ad una lunghezza d'onda pari a 570nm.

Tutti i risultati sono stati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti, ciascuno effettuato in triplicato.

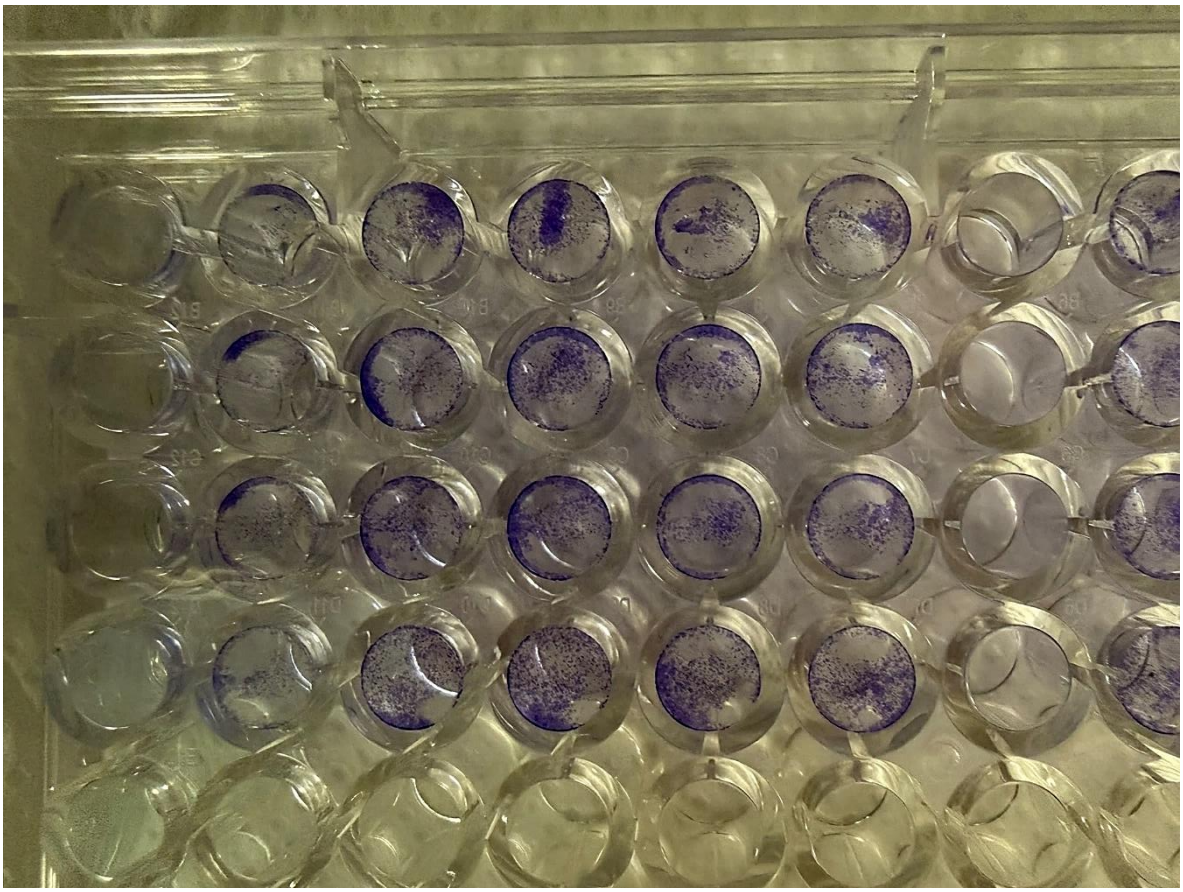


Figura 15. *Piastra 96-well sottoposta a saggio di proliferazione con Crystal Violet*

5.4 Saggio di Formazione delle Colonie

Le linee TPC-1 e BCPAP sono state trattate con Clofoctol per 24, 48 o 72 ore. Le cellule sono state, poi, staccate e riseminate in 24-wells ad una densità di 5.000 cellule per ciascuna e lasciate proliferare per 6 giorni.

Le cellule sono state colorate con il *Cristal Violet* 0.5% e incubate con SDS 1% prima della misurazione della OD a 570nm.

Il numero e le dimensioni delle colonie rappresentano una misura della capacità clonogenica e della sopravvivenza proliferativa delle cellule trattate. Si definisce colonia la formazione raggruppata di almeno 50 cellule (Franken, et al. 2006).

5.5 Analisi immunofluorescente di Stress del RE e Vacuolizzazione

L'immunofluorescenza utilizza anticorpi (Ab) marcati con una molecola fluorescente, detta fluoroforo, per visualizzare specifici target molecolari noti come antigeni (Ag) (Odell e Cook 2013). Un Ab è un complesso proteico prodotto da linfociti B maturi in risposta all'esposizione di uno specifico Ag. Gli Ab possono essere suddivisi tra cinque classi funzionali di immunoglobuline (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) a seconda dell'organizzazione strutturale ma nelle analisi immunocitochimiche vengono prevalentemente usati Ab appartenenti alle IgG o alle IgM (Odell e Cook 2013). Ogni Ab può essere distinto in due segmenti: il segmento Fab (Fragment having the Antigen Binding site), caratterizzato dalla presenza del sito di riconoscimento dell'Ag, e il segmento Fc (Fragment that Crystallizes), riconosciuto dalle cellule immunitarie effettrici. Questa struttura permette la rilevazione diretta degli Ag tramite un singolo Ab marcato (metodo costoso e poco pratico, spesso l'interazione Ab-fluoroforo può provocare problemi di ingombro sterico causando legami Ab-Ag poco efficienti) ma permette anche la rilevazione indiretta di Ag attraverso l'utilizzo di un Ab primario (Ab I) che lega direttamente Ag e di un Ab secondario (Ab II) marcato con il fluoroforo che riconosce i domini Fc dell'Ab I (metodo molto più economico e funzionale della marcatura diretta) (Odell e Cook 2013).

Il reticolo endoplasmatico (RE) è un organello cellulare fondamentale nel metabolismo e, in particolare il reticolo ruvido (RER) costituisce la sede di sintesi, ripiegamento e modifiche delle proteine (Chen e Cubillos-Ruiz 2021). Sebbene questo processo sia finemente regolato, molteplici fattori interni ed esterni alla cellula possono compromettere la qualità del ripiegamento proteico effettuato dal RE. Questi mal ripiegamenti causano l'accumulo di proteine mal ripiegate o non ripiegate affatto provocando la Unfolded Protein Response (UPR), un pathaway attivato dalla cellula stessa a seguito di stress causato da queste proteine in accumulo (Chen e Cubillos-Ruiz 2021) (Flindris, et al. 2025). La UPR, inizialmente, mira a ripristinare la corretta proteostasi, riducendo la traduzione proteica, inducendo l'espressione di proteine chaperon e stimolando il catabolismo proteico. Tuttavia, quando lo stress del RE è cronico o grave, la UPR indurre la vacuolizzazione e attivare programmi di fine-vita della cellula (Flindris, et al. 2025).

La vacuolizzazione citoplasmatica è un'alterazione morfologica cellulare causata da numerosi fattori e caratterizzata dalla presenza di spazi otticamente vuoti visibili al microscopio, detti vacuoli, che si originano da vari organelli cellulari (Wen e Ma 2025). Il fenomeno della vacuolizzazione si osserva spesso in contesti fisiopatologici e in diversi trattamenti antitumorali che, se associati anche ad una perdita del potenziale elettrochimico della membrana mitocondriale, porta alla paraptosi, una morte cellulare programmata non apoptotica (Wen e Ma 2025). A differenza dell'apoptosi classica, la paraptosi non comporta la frammentazione del DNA o la formazione di corpi apoptotici, ed è indipendente dall'attivazione delle caspasi (Kunst, et al. 2024).

Una quantità di 50.000 cellule di Nthy-ori 3-1, BCPAP e TPC-1 è stata posta su vetrini coprioggetto e dopo 24 ore sono stati trattati in presenza o assenza di Clofoctol a 15 o 30 μM per altre 24 ore. Le cellule sono, poi, state lavate con tampone fosfato salino (PBS) e fissate con paraformaldeide (PFA) 4% per 10 minuti a temperatura ambiente, rilavate con PBS e incubate con Hoechst 33258 1:2000, rilavate con PBS e incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con *ER-Tracker-Green* 1μM.
I campioni sono stati montati su vetrini portaoggetti con il *Prolong Gold Antifade Reagent* per effettuare microscopia confocale con Leica TCS-SP8.

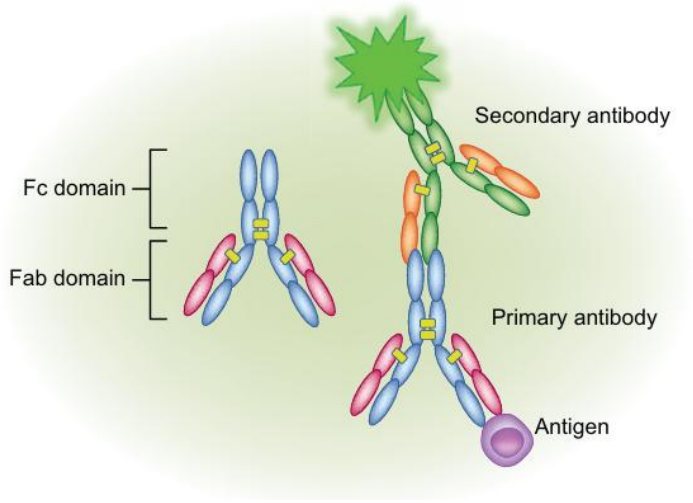


Figura 16. *Struttura di un Ab (sx) e l'interazione che ne risulta per l'immunofluorescenza (dx)*
In blu e verde si caratterizzano le catene pesanti mentre in magenta e arancione le catene leggere. In viola è rappresentato l'antigene e, coniugato all'Ab secondario, in verde il fluoroforo (Odell e Cook 2013)

5.6 ELISA per CXCL8 e CCL2

La tecnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) è un metodo immunocitochimico rapido e sensibile per la determinazione quantitativa di Ag e Ab presenti in un substrato (Reen 1994). Gli ELISA possono essere classificati in due categorie principali: competitivi e non competitivi (sandwich). Nel formato sandwich, l'antigene viene catturato da un anticorpo immobilizzato su una fase solida e successivamente rilevato mediante un secondo anticorpo coniugato a un enzima. Il rilevamento enzimatico produce un segnale misurabile con l'utilizzo di uno spettrofotometro correlato alla quantità di Ag presente (Reen 1994) (Aydin, et al. 2025).

3.000 cellule per CXCL8 e 30.000 per CCL2 sono state seminate in piastre 96-well e dopo 24 ore le cellule sono state incubate con terreno *serum-free* con concentrazioni di Clofoctol crescenti (0, 5, 10, 15 μM). La differenza nella semina si rende necessaria per la differenza di secrezione delle due chemochine.

Questi trattamenti sono stati effettuati sia in condizioni basali che sotto stimolazione di TNFα ad una concentrazione di 10 ng/mL.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in tre replicati.

I livelli di CXCL8 e CCL2 sono stati misurati come secrezione nel surnatante utilizzando kit ELISA predefiniti (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). I campioni sono stati testati come duplicati.

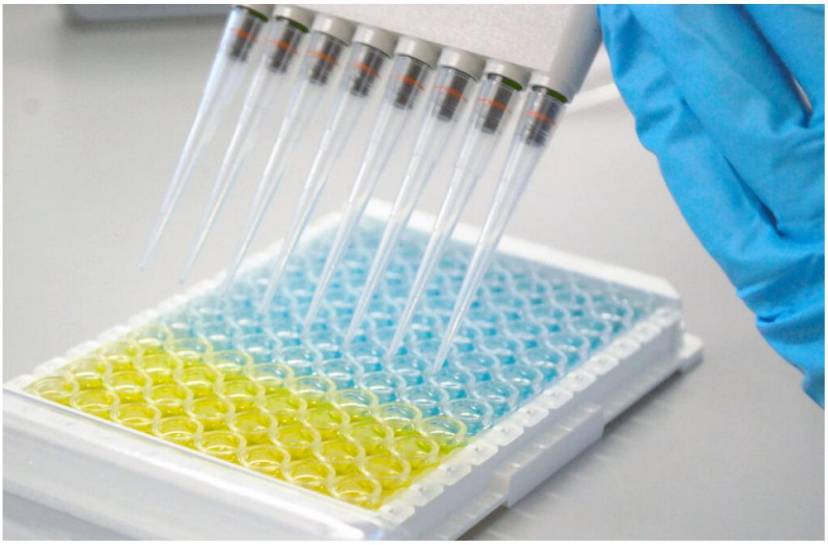


Figura 17. *Piastra 96 well sottoposta a saggio ELISA*
https://www.lattenews.it/iscreen-afla-m1-milk-e-il-primo-kit-approvato-da-aoac-internatioal-come-ptm/

5.7 Real-time PCR

La reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR) o quantitativa (RT-qPCR) è un adattamento della PCR classica che consente di monitorare l'andamento della reazione in tempo reale sfruttando l'analisi dei cicli di reazione (Artika, et al. 2022). La PCR è, in generale, un processo enzimatico utilizzato in vitro per amplificare frammenti casuali di DNA e generarne migliaia di copie. Per la RT-qPCR sono necessari il DNA stampo, spesso DNA complementare (cDNA) generato per retro-trascrizione, i primer, una sonda fluorescente, una miscela di nucleotidi (dNTPs) e una polimerasi termoresistente, di solito purificata dal batterio ipertermofilo *Thermus aquaticus* (Artika, et al. 2022).

Le cellule sono state incubate con Clofoctol per 24 ore ad una concentrazione di 15µM, concentrazione non tossica del farmaco derivata dal saggio di vitalità. L'RNA è stato estratto utilizzando il *Norgen Biotek* kit e 1µg/µL è stato utilizzato per effettuare reverse trascrittasi con un kit specifico per la sintesi di cDNA (*SensiFast, Bioline, London, UK*). Le RT-PCR sono state eseguite utilizzando come sonda la *SYBR Green* e su un supporto per *real time PCR*.

I primer per i geni sono stati derivati e verificati da altri esperimenti del gruppo di ricerca.

I livelli di espressione genica sono stati quantificati in relazione all'espressione del gene *house keeping* GAPDH. Di seguito si riportano le sequenze dei primer utilizzati per l'analisi.

		Geni Analizzati		
		CXCL8	CCL2	GAPDH
Primer	Forward	CAGTGCATAAAGACATACTC	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC	AAATCCCATCACCATCTTCC
	Reverse	CTCTTCAAAAACTTCTCCAC	CAGATCTCCTTGGCCACAAT	GGTTCACACCCATGACGAAC

Figura 18. *Sequenze Forward e Reverse dei primer dei geni CXCL8, CCL2 e GAPDH per l'analisi*

5.8 Analisi Statistica

I risultati sono stati inseriti in analisi della varianza separate (Kruskall-Wallis, per valori non distribuiti normalmente, oppure ANOVA per valori distribuiti normalmente) per il confronto dei valori medi di gruppo. Per l'analisi dell'mRNA è stato utilizzato un test t-Student per dati appaiati. La significatività statistica è stata considerata prendendo in esame un valore di $p < 0,05$.

Il software SPSS Versione 30.0 (SPSS Inc., Evanston, IL, USA) è stato utilizzato per le analisi statistiche.

CAPITOLO 6

6. RISULTATI

6.1 Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la vitalità cellulare

La linea cellulare normale Nthy-ori 3-1 e le due linee tumorali TPC-1 e BCPAP sono state trattate a concentrazioni crescenti di Clofoctol (0, 5, 10, 15, 30, 100 μM).

La vitalità della linea Nthy-ori 3-1 **(Fig. 19A)** è stata ridotta nel trattamento con la concentrazione maggiore di Clofoctol a 100 μM in tutte le finestre temporali di 24, 48 e 72 ore (Kruskal-Wallis 24 hours: H=16.062, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$; 48 hours: H=46.066, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM $p<0.05$; 72 hours: H=49.056, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$).

Un risultato simile è stato ottenuto anche nelle linee tumorali BCPAP **(Fig. 19B)** (Kruskal-Wallis 24 hours: H=30.820, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$; 48 hours: H=38.712, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM $p<0.05$; 72 hours: H=33.095, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$) e TPC-1 **(Fig. 19C)** (Kruskal-Wallis 24 hours: H=28.614, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$; 48 hours: H=20.553, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 μM vs. 0 μM $p<0.05$; 72 hours: H=31.997, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 μM vs. 0 μM, $p<0.05$) dove la vitalità è stata inibita con il trattamento alla concentrazione maggiore di Clofoctol 100 μM a 24, 48 e 72 ore.

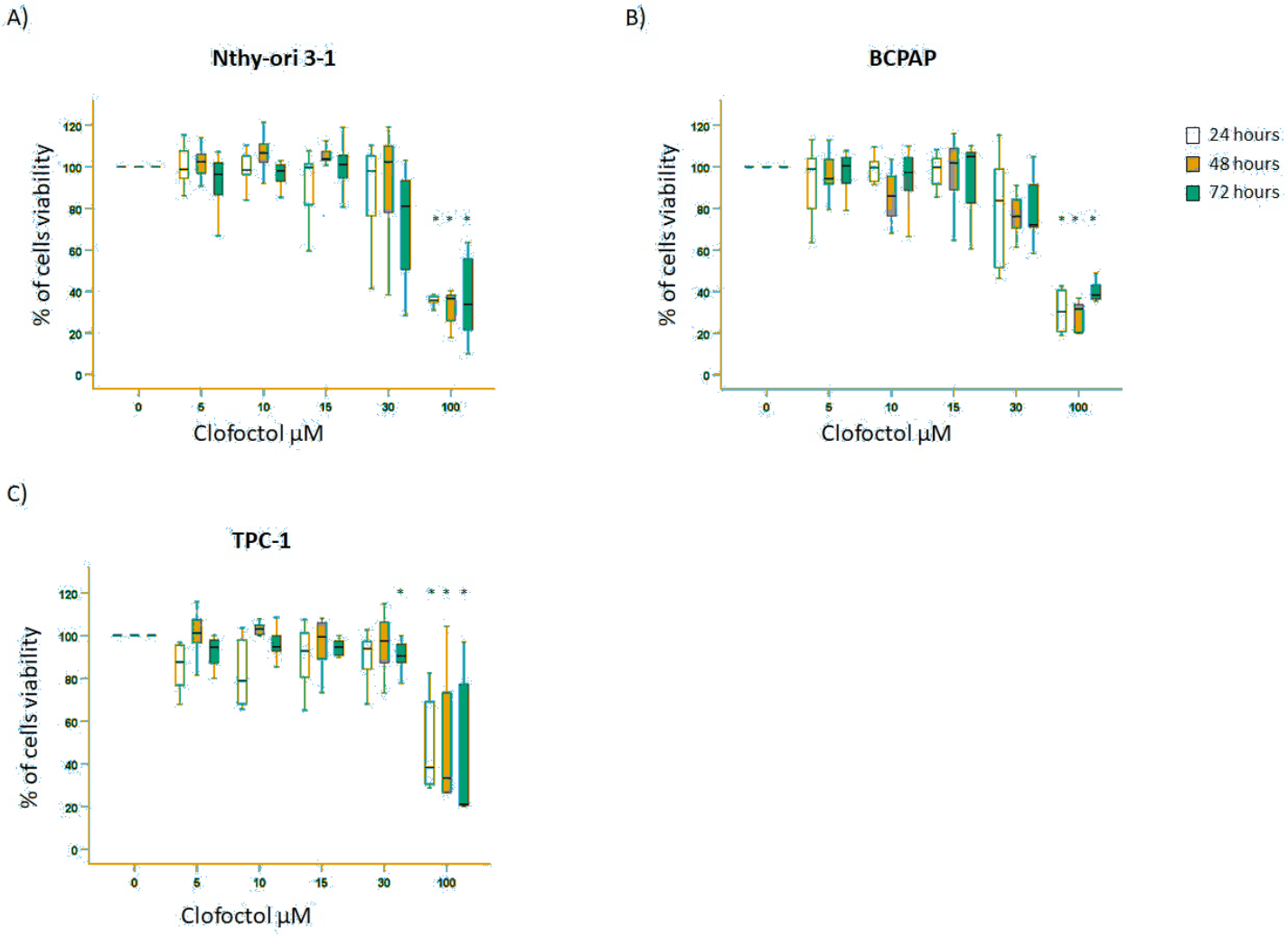


Figura 19. *Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la vitalità cellulare. Il trattamento con Clofoctol 100 µM inibisce la vitalità cellulare delle linee Nthy-ori 3-1 (A), BCPAP (B) e TPC-1 (C) a 24, 48 e 72 ore dopo il trattamento.*

6.2 Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la proliferazione cellulare

Nell'analisi della proliferazione cellulare, si è notata una esatta sovrapposizione nel comportamento delle linee cellulari analogo a quello osservato per la vitalità. Le cellule trattate con Clofoctol a concentrazioni crescenti per 24, 48 e 72 ore hanno seguito tutte lo stesso andamento: Nthy-ori 3-1 **(Fig. 20A)** (Kruskal-Wallis 24 hours: H=36.485, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$; 48 hours: H=32.291, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$; 72 hours: H=33.431, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$), BCPAP **(Fig. 20B)** (Kruskal-Wallis 24 hours: H=37.768, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$; 48 hours: H=42.365, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$; 72 hours: H=42.673, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$) e TPC-1 **(Fig. 20C)** (Kruskal-Wallis 24 hours: H=45.020, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$; 48 hours: H=48.056, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$; 72 hours: H=56.298, $p<0.05$; *post hoc* by Bonferroni Clofoctol 30 and 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$)hanno mostrato una diminuzione della proliferazione cellulare in tutte e tre le scansioni orarie a seguito del trattamento con Clofoctol 100 µM.

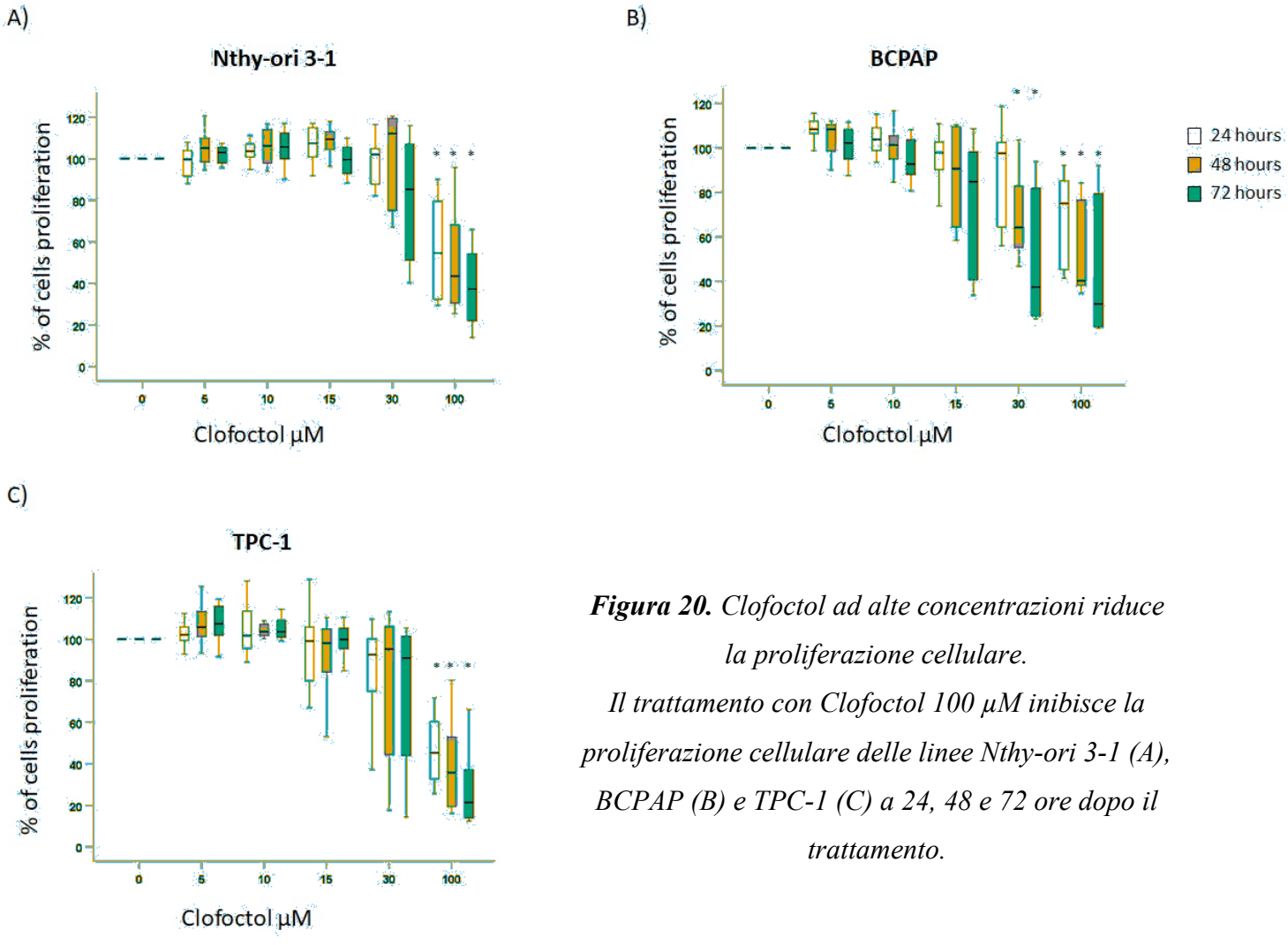


Figura 20. *Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la proliferazione cellulare.*
Il trattamento con Clofoctol 100 µM inibisce la proliferazione cellulare delle linee Nthy-ori 3-1 (A), BCPAP (B) e TPC-1 (C) a 24, 48 e 72 ore dopo il trattamento.

6.3 Clofoctol riduce la formazione di colonie in linee cellulari tumorali tiroidee

Per valutare se le linee cellulari tumorali avessero recuperato la capacità di proliferazione e formazione di colonie dopo il trattamento con Clofoctol, è stato eseguito un saggio di formazione di colonie.

Le cellule BCPAP e TPC-1 sono state riseminate dopo il trattamento con concentrazioni di Clofoctol crescenti per 24, 48 e 72 ore e lasciate proliferare per 1 settimana. Nelle BCPAP **(Fig. 21A)** (ANOVAs: 24 hours: F=3.817, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$; 48 hours: F=11.993, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 30 and 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$; 72 hours: F=6.932, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$) si è osservato che le cellule non riuscissero a ripristinare la loro capacità di proliferazione e di formazione delle colonie in nessuna finestra temporale con Clofoctol 100 µM. A minori concentrazioni del farmaco questo comportamento non è stato osservato, per cui BCPAP ripristinava la formazione di colonie.

Nelle TPC-1 **(Fig. 21B)** (ANOVAs: 24 hours: F=4.000, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 100 µM vs. 0 µM, $p<0.05$; 48 hours: F=16.524, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 30 and 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$; 72 hours: F=15.438, $p<0.05$; post hoc by Bonferroni clofoctol 100 µM vs. 0 µM $p<0.05$) è stato osservato un comportamento simile dove il trattamento con Clofoctol 100 µM ha inibito la formazione di colonie ma non alle concentrazioni inferiori.

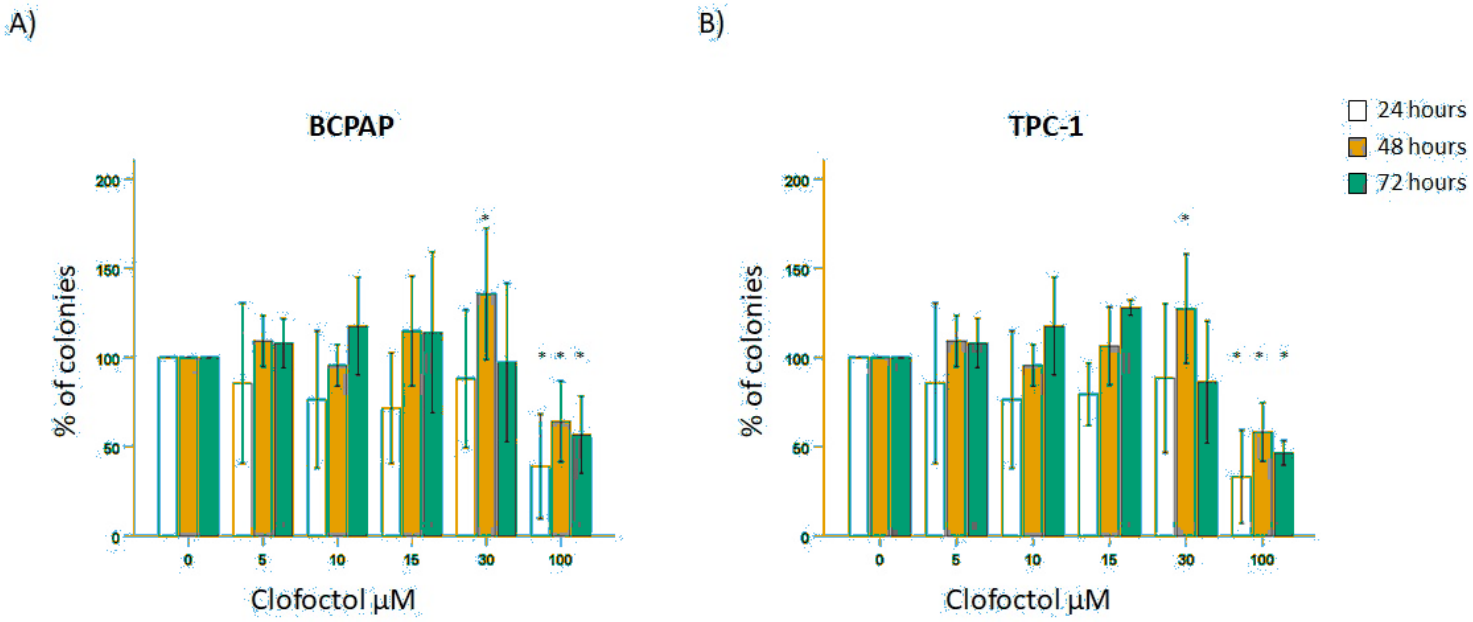
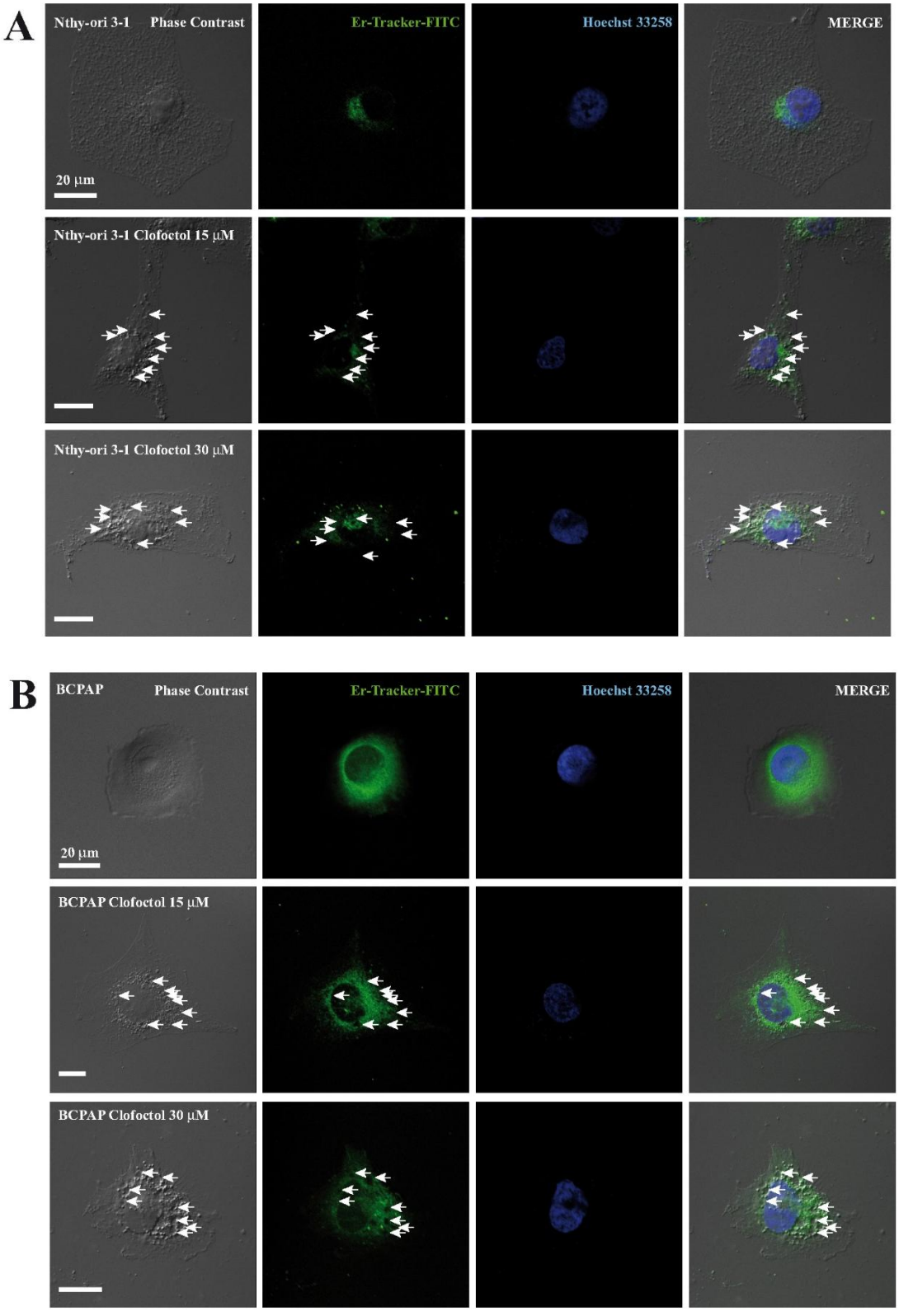


Figura 21. *Clofoctol ad alte concentrazioni riduce la formazione di colonie nelle linee tumorali. Il trattamento con Clofoctol 100 µM inibisce la formazione di colonie nelle linee BCPAP (A) e TPC-1 (B) a 24, 48 e 72 ore dopo il trattamento.*

6.4 Clofoctol induce vacuolizzazione e stress associato al RE in linee cellulari tiroidee

La vacuolizzazione e lo stresso associato al RE sono stati valutati a seguito di 24 ore di trattamento con Clofoctol 15 μM e 30 μM in Nthy-ori 3-1 **(Fig. 22A)**, BCPAP **(Fig. 22B)** e TPC-1 **(Fig. 22C)**. Clofoctol ha indotto una massiccia vacuolizzazione in tutti i tipi cellulari. Per verificare che la vacuolizzazione derivasse da stress indotto sul RE, le cellule sono state colorate con ER-tracker dopo il trattamento con Clofoctol.



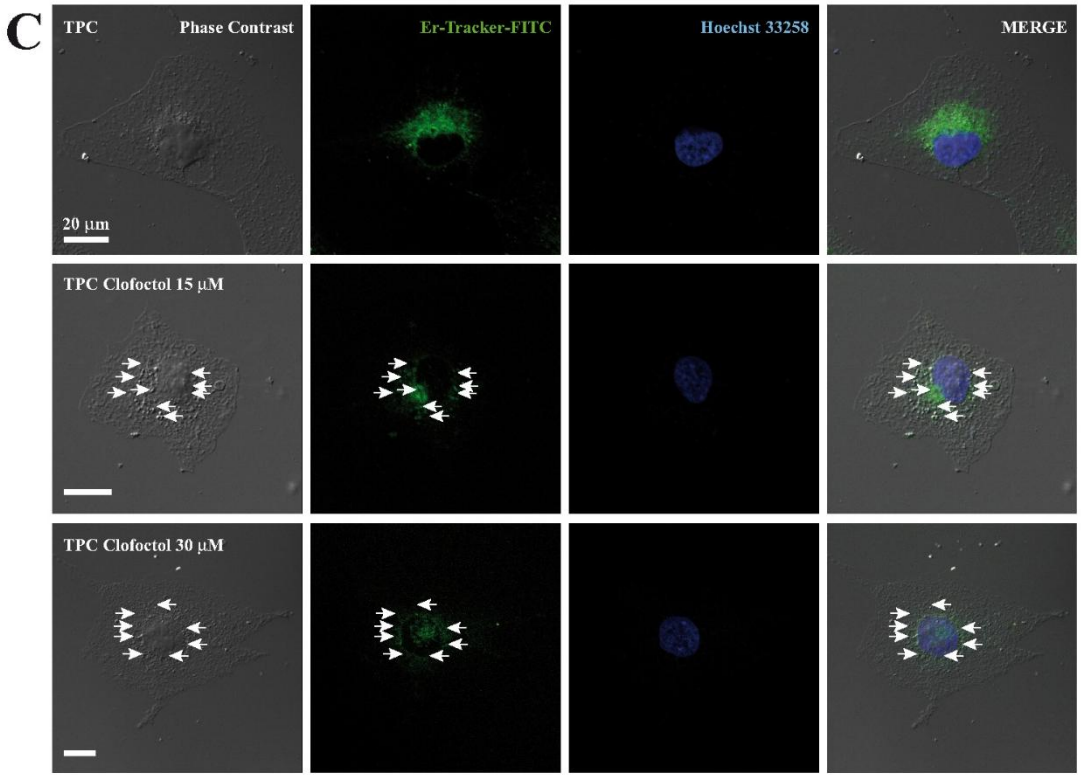


Figura 22. *Clofoctol induce vacuolizzazione e stress associato al RE.*
I trattamenti con Clofoctol 15 µM e 30 µM la vacuolizzazione e stress associato al RE nelle linee Nthy-ori 3-1 (A), BCPAP (B) e TPC-1 (C) 24 ore dopo il trattamento.

6.5 Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CXCL8 in cellule tiroidee

Il dosaggio di CXCL8 nei supernatanti delle colture cellulari ha rilevato che nella linea Nthy-ori 3-1 la sua secrezione è ridotta da tutte le concentrazioni non tossiche di Clofoctol, sia in condizioni basali **(Fig. 23A)** (ANOVA: F=55.778, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni clofoctol 5, 10, 15 μM vs. 0 μM, $p<0.05$) che stimolata da TNFα (Fig. 12B) (ANOVA: F=119.341, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni TNFα + clofoctol 5, 10, 15 μM vs. TNFα + 0 μM, $p<0.05$).

Nelle BCPAP e nelle TPC-1 si sono osservati gli stessi risultati, sia in condizioni basali **(BCPAP Fig. 23C e TPC-1 Fig. 23E)** che stimolate da TNFα **(BCPAP Fig. 23D e TPC-1 Fig. 23F)**.

BCPAP basali (ANOVA: F=24.571, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni clofoctol 5, 10, 15 μM vs. 0 μM, $p<0.05$) e TNFα-indotte (ANOVA: F=169.718, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni TNFα + clofoctol 5, 10, 15 μM vs. TNFα + 0 μM, $p<0.05$)

TPC-1 basali (ANOVA: F=210.654, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni clofoctol 5, 10, 15 μM vs. 0 μM, $p<0.05$) e TNFα-indotte (ANOVA: F=60.189, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni TNFα + clofoctol 5, 10, 15 μM vs. TNFα + 0 μM, $p<0.05$)

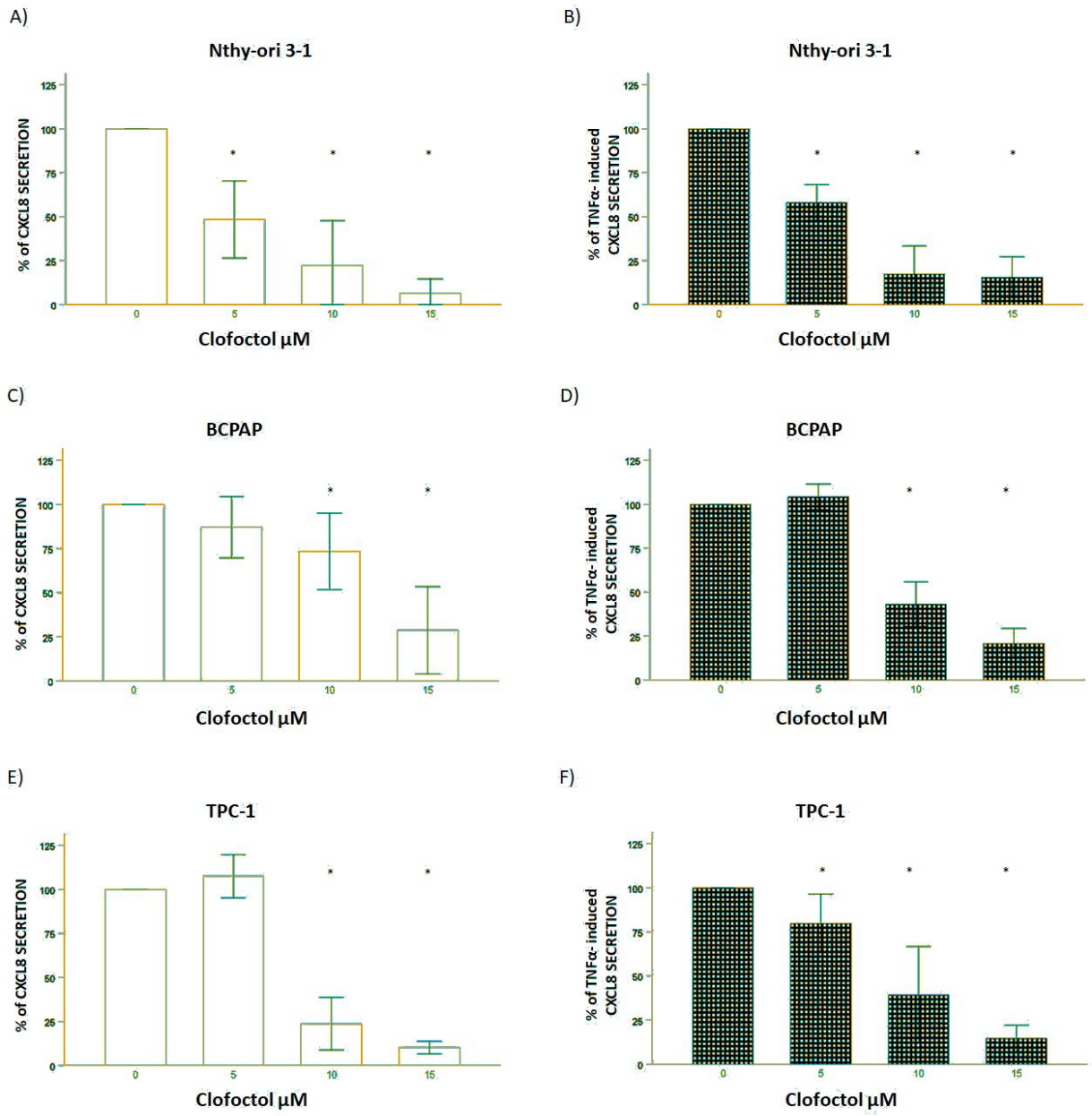


Figura 23. *Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CXCL8 nelle linee cellulari tiroidee. I trattamenti con Clofoctol a concentrazioni non tossiche crescenti riducono la secrezione di CXCL8 nelle linee Nthy-ori 3-1 (A-B), BCPAP (C-D) e TPC-1 (E-F) 24 ore dopo il trattamento.*

6.6 Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CCL2 in cellule tiroidee

La secrezione basale di CCL2 è stata rilevata nel supernatante di Nthy-ori 3-1 e TPC-1 ma non in quello della linea BCPAP.

Nelle cellule della linea Nthy-ori è stato rilevato che Clofoctol, in tutte le concentrazioni non tossiche, riduce la secrezione di CCL2, sia basale **(Fig. 24A)** (ANOVA: F=51.628, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni clofoctol 5, 10, 15 µM vs. 0 µM, $p<0.05$) che indotta da TNFα **(Fig. 24B)** (ANOVA: F=18.030, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni TNFα + clofoctol 5, 10, 15 µM vs. TNFα + 0 µM, $p<0.05$). Lo stesso comportamento è stato rilevato con la secrezione basale **(Fig. 24C)** (ANOVA: F=210.654, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni clofoctol 5, 10, 15 µM vs. 0 µM, $p<0.05$) e indotta da TNFα **(Fig. 24D)** (ANOVA: F=36.437, $p<0.05$, post hoc by Bonferroni TNFα + clofoctol 5, 10, 15 µM vs. TNFα + 0 µM, $p<0.05$) nella linea cellulare TPC-1.

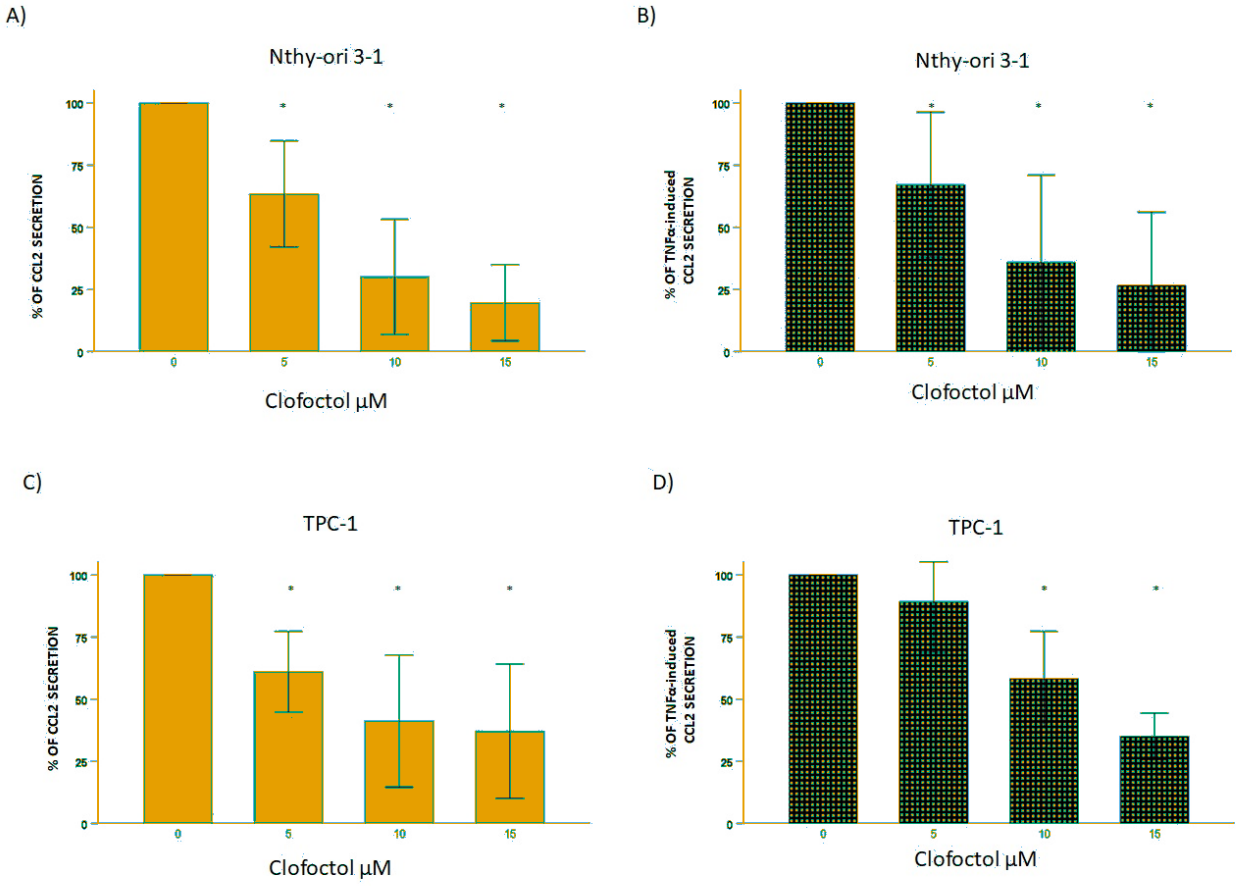


Figura 24. *Clofoctol riduce la secrezione basale e indotta da TNFα di CCL2 nelle linee cellulari tiroidee. I trattamenti con Clofoctol a concentrazioni non tossiche crescenti riducono la secrezione di CCL2 nelle linee Nthy-ori 3-1 (A-B) e TPC-1 (C-D) 24 ore dopo il trattamento. Non sono rilevabili nella linea BCPAP.*

6.7 Clofoctol riduce i livelli di espressione degli mRNA di CXCL8 e CCL2 in linee cellulari tiroidee

Il trattamento con Clofoctol 15 µM induce una inibizione della trascrizione dei geni di CXCL8 e CCL2, diminuendone la quantità di mRNA prodotto rispetto alle cellule non trattate di controllo. Questo comportamento è stato osservato in Nthy-ori 3-1 **(Fig. 25A)**, BCPAP **(Fig. 25B)** e TPC-1 **(Fig. 25C)** per entrambe le chemochine.

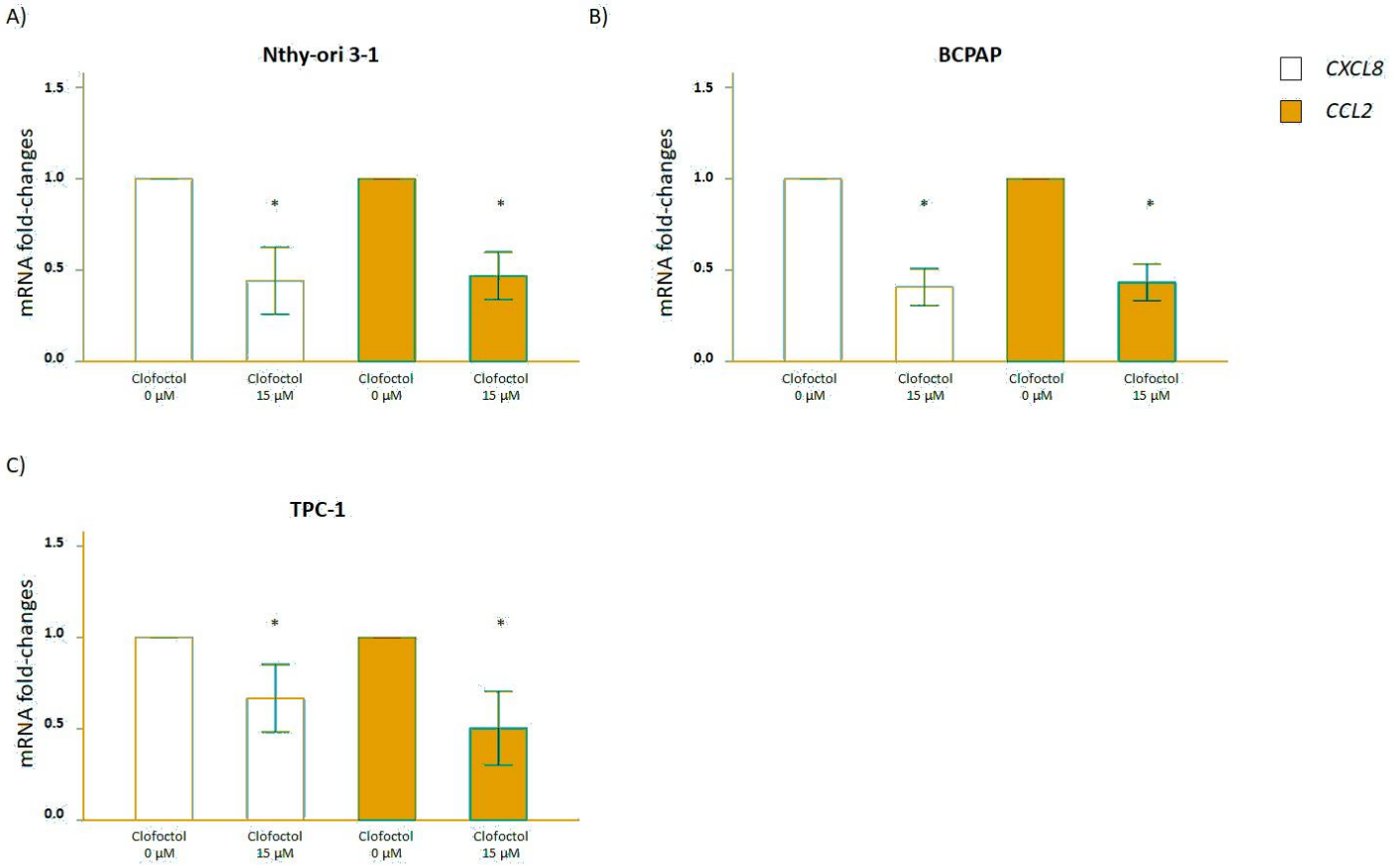


Figura 25. *Clofoctol riduce i livelli di espressione degli mRNA di CXCL8 e CCL2. Il trattamento con Clofoctol 15 µM riduce i livelli di mRNA di CXCL8 e CCL2 nelle linee Nthy-ori 3-1 (A), BCPAP (B) e TPC-1 (C) 24 ore dopo il trattamento, a confronto con cellule non trattate.*

CAPITOLO 7

7. DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi ha indagato l'attività dell'antibiotico Clofoctol su cellule tiroidee, normali e tumorali, *in vitro*. I risultati ottenuti permettono una prima caratterizzazione degli effetti di questo farmaco su vitalità, crescita cellulare, morfologia intracellulare e modulazione chemochinica.

Si è osservato che l'utilizzo di Clofoctol, ad una concentrazione 100 μM, induce una riduzione della vitalità delle linee cellulari tiroidee normali Nthy-ori 3-1 e tumorali BCPAP e TPC-1 dopo il trattamento effettuato in tutti e tre i tempi testati. Non sono stati osservati risultati statisticamente significativi con l'utilizzo di concentrazioni inferiori, stabilendo i 100 μM del farmaco come effettiva quantità citotossica.

Si è osservato che l'utilizzo di Clofoctol induce una riduzione della proliferazione in cellule tiroidee normali Nthy-ori 3-1 e tumorali BCPAP e TPC-1 alla concentrazione di 100 μM dopo il trattamento nei tre tempi testati. Nelle BCPAP sono stati osservati risultati statisticamente significativi anche con l'utilizzo di Clofoctol a concentrazione di 30 μM con 48 h e 72 h di trattamento.

Allo stesso modo, Clofoctol 100 μM riduce la ri-formazione di colonie vitali nelle linee BCPAP e TPC-1 dopo 24 h, 48 h e 72 h di trattamento. Questo comportamento è caratteristico delle cellule tumorali, pertanto non è stato necessario procedere con lo studio della linea normale Nthy-ori 3-1.
Si è anche osservata una riduzione statisticamente significativa in entrambe le linee tumorali utilizzando Clofoctol 30 μM unicamente dopo 48 h di trattamento. Questo suggerisce come questo composto potrebbe produrre effetti solo parzialmente reversibili o, addirittura, irreversibili nelle cellule tiroidee.

È stata, inoltre, analizzata l'attività di Clofoctol nell'induzione di stress legato al RE e conseguente vacuolizzazione di questo in risposta allo stress. Questa caratteristica è in linea con quello già osservato in precedenti studi sul tumore alla prostata dove, la produzione di ROS, induceva la vacuolizzazione nel RE (Fan, et al. 2018). L'aumento nel numero e nella dimensione di questi vacuoli è stato osservato indipendentemente dalla linea cellulare utilizzata. Si sono analizzate tre condizioni di queste cellule: non trattate (NT), Clofoctol 15 μM e Clofoctol 30 μM, evitando concentrazioni citotossiche. Aumentando la concentrazione del farmaco, si è notato un aumento nel numero e nelle dimensioni dei vacuoli prodotti.

Un ulteriore aspetto evidenziato da questo studio è l'abilità di Clofoctol di modulare la secrezione di CXCL8 e CCL2, due chemochine protumorigeniche secrete nel microambiente tumorale e responsabili dell'induzione di comportamenti quali la proliferazione tumorale, il reclutamento dei neutrofili e la metastatizzazione. Questo studio ha osservato che il trattamento con Clofoctol inibisce la secrezione, sia basale che stimolata, di queste due chemochine in tutte le linee cellulari analizzate, a concentrazioni non citotossiche del farmaco quali 5, 10 e 15 μM.
Analizzando CXCL8, sono stati osservati risultati significativi alle concentrazioni di 10 e 15 μM nelle due linee tumorali BCPAP e TPC-1, mentre nella linea normale Nthy-ori 3-1 si è osservata una riduzione significativa anche ad una concentrazione di Clofoctol di 5 μM.
La secrezione di CXCL8 è stata valutata anche a seguito di stimolazione con TNF-α. TNF-α è una citochina proinfiammatoria prodotta da macrofagi e monociti durante episodi di infiammazione acuta e secreta nel microambiente tumorale che induce, a sua volta, la secrezione di diverse citochine e chemochine nel microambiente (Idriss e Naismith 2000).
La secrezione mediata da TNF-α di CXCL8 viene inibita da tutte le concentrazioni di Clofoctol analizzate in tutte le linee cellulari utilizzate. L'unica eccezione è stata la linea tumorale BCPAP dove si sono osservate inibizioni statisticamente significative solo alle concentrazioni di 10 μM e 15 μM.
Nell'analisi della secrezione di CCL2, sono stati osservati risultati significativi nelle linee TPC-1 e Nthy-ori 3-1 trattate con Clofoctol a tutte le concentrazioni. CCL2 stimolato da TNF-α viene inibito nella linea normale Nthy-ori 3-1 da tutte le concentrazioni di Clofoctol utilizzate mentre nella linea tumorale TPC-1 solo a concentrazioni significative di 10 μM e 15 μM.
Nella linea BCPAP non è stata rilevata alcuna secrezione, basale o stimolata, di CCL2 nel surnatante cellulare a seguito di trattamento. Questo comportamento rappresenta una caratteristica intrinseca della linea dove CCL2 viene prodotto ma non secreto nell'ambiente circostante.

Si è, infine, andati ad analizzare la trascrizione degli mRNA di *CXCL8* e *CCL2* confrontandoli con la trascrizione basale di *GAPDH*, gene *house keeping* costitutivamente espresso.
Dalle analisi è emerso che l'espressione dell'mRNA sia di *CXCL8* che di *CCL2* in tutte le linee cellulari analizzate, tumorali e normali, viene drasticamente ridotta dal trattamento con Clofoctol.

CAPITOLO 8

8. CONCLUSIONE

In conclusione, questo lavoro di tesi, svolto presso l'Istituto Clinico Maugeri IRCCS (PV) nel Laboratorio per lo studio di Distruttori Endocrini, in linea con precedenti osservazioni di altri gruppi di ricerca sopracitati, ha confermato che il farmaco antibiotico Clofoctol:

- Riduce la vitalità di cellule tiroidee e normali della tiroide ad alte concentrazioni
- Riduce la proliferazione di cellule tiroidee tumorali e normali della tiroide ad alte concentrazioni
- Riduce la capacità di cellule tiroidee tumorali e normali della tiroide di ri-formare colonie ad alte concentrazioni
- Promuove lo stress del RE e la conseguente vacuolizzazione a concentrazioni non citotossiche del farmaco in cellule tiroidee tumorali e normali
- Inibisce la secrezione, anche stimolata, e la trascrizione degli mRNA delle chemochine protumorigeniche CXCL8 e CCL2 nelle cellule tiroidee tumorali e normali

I risultati proposti da questo studio verificano ulteriormente l'attività antitumorale di Clofoctol inducendo nelle cellule di tiroide, tumorali e normali, citotossicità e aumento dello stress ossidativo. Ciò conferma precedenti osservazioni tratte da altri studi su differenti tipi di tumore e osservando, in aggiunta a questi, l'inibizione effettuata dal farmaco sulla produzione e secrezione di chemochine protumorigeniche.

CAPITOLO 9

9. BIBLIOGRAFIA

Abdul-Rahman, Toufik, et al. «The paradoxical role of cytokines and chemokines at the tumor microenvironment: a comprehensive review.» *European Journal of Medical Research*, 2024: 19.

Almandoz, Jaime, e Hossein Gharib. «Hypothyroidism: Etiology, Diagnosis, and Management.» *Medical Clinics of North America*, 2012: 19.

Anderson, Nicole, e Celeste Simon. «Tumor Microenvironment.» *Curr Biol*, 2020: 9.

Artika, Made, Yora Permata Dewi, Ita Margaretha Nainggolan, Josephine Elizabeth Siregar, e Ungke Antonjaya. «Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis.» *Genes*, 2022: 21.

Ashburn, Ted, e Karl Thor. «Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs.» *Nature Portfolio*, 2004: 10.

Aydin, Suleyman, et al. «An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids.» *International Medical Research*, 2025: 18.

Bailly, Christian, e Gerard Vergoten. «A new horizon for the old antibacterial drug clofoctol.» *Drug Discovery Today*, 2021: 9.

Barbatelli, Giorgio, Laura Bertoni, Michela Bosetti, Francesco Carini, e Terenzio Congiu. *Anatomia Umana - Fondamenti.* EdiErmes, 2021.

Barzaman, Khadijeh, et al. «Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments.» *International Immunopharmacology*, 2020: 10.

Bazzichetto, Chiara, et al. «Interleukin-8 in health and disease.» *Molecular Biomedicine*, 2026: 30.

Bharti, Jayhind, Priyadharshini Gogu, Prateek Pathak, Pradeep Kumar, e Amita Verma. «BRAF V600E in cancer: Exploring structural complexities, mutation profiles, and pathway dysregulation.» *Experimental Cell Research*, 2024: 16.

Boucai, Laura, e Glenn Braunstein. *Manuali MSD per professionisti.* Gennaio 2026. https://www.msdmanuals.com/it/professionale/malattie-endocrine-e-metaboliche/disturbi-tiroidei/tumori-della-tiroide.

Boucai, Laura, Mark Zafereo, e Maria Cabanillas. «Thyroid Cancer - A Review.» *JAMA - Journal of American Medical Association*, 2024: 11.

Brose, Marcia, et al. «Sorafenib in locally advanced or metastatic, radioactive iodinerefractory, differentiated thyroid cancer: a randomized, doubleblind, phase 3 trial.» *Lancet*, 2014: 19.

Cabanillas, Maria, David McFadden, e Cosimo Durante. «Thyroid Cancer.» *The LAncet*, 2016: 13.

Chen, Xi, e Juan Cubillos-Ruiz. «Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment.» *Nat Rev Cancer*, 2021: 45.

Chiamolera, Maria Izabel, e Fredric Wondisford. «Minireview: Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism.» *Endocrinology*, 2009: 6.

Cocco, Emiliano, Maurizio Scaltriti, e Alexander Drilon. «NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy.» *Nat Rev Clin Oncol*, 2019: 34.

Coperchini, Francesca, Alessia Greco, e Mario Rotondi. «Ruolo delle chemochine nel microambiente tumorale tiroideo.» *L'Endocrinologo*, 2023: 6.

Coperchini, Francesca, et al. «Canagliflozin reduces thyroid cancer cells migration in vitro by inhibiting CXCL8 and CCL2: An additional anti-tumor effect of the drug.» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023: 10.

Coperchini, Francesca, et al. «Selective anti-CXCR2 receptor blockade by AZD5069 inhibits CXCL8-mediated pro-tumorigenic activity in human thyroid cancer cells in vitro.» *Journal of Endocrinological Investigation*, 2024: 13.

Coperchini, Francesca, et al. «Vitamin D Reduces Thyroid Cancer Cells Migration Independently From the Modulation of CCL2 and CXCL8 Chemokines Secretion.» *Frontiers in Endocrinology*, 2022: 7.

de Visser, Karin, e Johanna Joyce. «The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth.» *Cancer Cell - Cell Press*, 2023: 30.

Devdhar, Madhuri, Yasser Ousman, e Kenneth Burman. «Hypothyroidism.» *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2007: 21.

Elisei, Rossella, et al. «Cabozantinib in progressive Medullary Thyroid Cancer.» *Journal of Clinical Oncology*, 2013: 9.

Fan, Lixia, et al. «Clofoctol and sorafenib inhibit prostate cancer growth via synergistic induction of endoplasmic reticulum stress and UPR pathways.» *Cancer Management and Research*, 2018: 13.

Febrero, Beatriz, Juan Jose Ruiz-Manzanera, Inmaculada Ros-Madrid, Antonio Miguel Hernandez, Esteban Orenes-Pinero, e Jose Manuel Rodriguez. «Tumor microenvironment in thyroid cancer: Immune cells, patterns and novel treatments.» *Wiley Periodicals*, 2024: 14.

Flindris, Stefanos, et al. «The Role of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Gynecological Cancers: A Narrative Review.» *Springer Nature*, 2025: 8.

Florent, Romane, Laurent Poulain, e Monique N'Diaye. «Drug Repositioning of the α1-Adrenergic Receptor Antagonist Naftopidil: A Potential New Anti-Cancer Drug?» *Molecular Sciences*, 2020: 21.

Fondazione Veronesi. s.d. https://www.fondazioneveronesi.it/educazione-alla-salute/guida-ai-tumori/tumore-della-tiroide?origine=2025_AL_GOEDU01&gad_source=1&gad_campaignid=22786564449&gbraid=0AAAADyhIFJWxHNpCzfE1uk4TKcHtdSMs&gclid=CjwKCAjwwL_UBhAjEiwAEhuT5F13wTWYc_smh8O23XBuQKTF9.

Forma, Alicja, et al. «Thyroid Cancer: Epidemiology, Classification, Risk Factors, Diagnostic and Prognostic MArkers, and Current Treatment Strategies.» *Molecular Sciences*, 2025: 44.

Franken, Nicolaas, Hans Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, e Chris van Bree. «Clonogenic assay of cells in vitro.» *Nature*, 2006.

Fresno-Vara, Juan Angel, Enrique Casado, Javier de Castro, Paloma Cejas, Cristobal Belda-Iniesta, e Manuel Gonzalez-Baron. «PI3K/Akt signalling pathway and cancer.» *Cancer Treatment Reviews*, 2003: 12.

Greco, Alessia, Francesca Coperchini, Laura Croce, Flavia Magri, Marsida Teliti, e Mario Rotondi. «Drug repositioning in thyroid cancer treatment: the intriguing case of anti-diabetic drugs.» *Frontiers in Pharmacology*, 2023: 16.

Han, Zhi-Jian, Yang-Bing Li, Lu-Xi Yang, Hui-Juan Cheng, Xin Liu, e Hao Chen. «Roles of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in the Tumor Microenvironment and Immunotherapy.» *Molecules*, 2021: 21.

Hansen, Mackenzie, Abigail Cheever, Scott Weber, e Kim O'Neill. «Characterizing the Interplay of Lymphocytes in Graves' Disease.» *Molecular Sciences*, 2023: 13.

Henke, Erik, Rajender Nandigama, e Suleyman Ergun. «Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy.» *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020: 24.

Hu, Yan, et al. «The antibiotic clofoctol suppresses glioma stem cell proliferation by activating KLF13.» *The Journal of Clinical Investigation*, 2019: 14.

Inman, Brannon, e Brit Long. «Thyrotoxicosis.» *Emergency Medicine Clinics*, 2026: 16.

Kadomoto, Suguru, Kouji Izumi, e Atsushi Mizokami. «Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment.» *Molecular Sciences*, 2021: 15.

Kalogeraki, Alexandra, et al. «Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Review.» *Romanian Journal of Internal Medicine*, 2015: 9.

Keir, Mary, Manish Butte, Gordon Freeman, e Ariene Sharpe. «PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity.» *Annu Rev Immunol*, 2008: 32.

Khalef, Lefsih, Radja Lydia, Khettar Filicia, e Berkoud Moussa. «Cell viability and cytotoxicity assays Biochemical elementsand cellular compartments.» *Cell Biochemistry & Function*, 2024: 23.

Kunst, Claudia, Deniz Tumen, Martha Ernst, Hauke Christian Tews, Martina Muller, e Karsten Gulow. «Paraptosis—A Distinct Pathway to Cell Death.» *Molecular Sciences*, 2024: 25.

Kureshi, Courtney, e Stephanie Dougan. «Cytokines in cancer.» *Cancer Cell*, 2025: 40.

Laing, Kerry, e Christopher Secombes. «Chemokines.» *Developmental & Comparative Immunology*, 2004: 18.

Liotti, Federica, Maria De Pizzol, Marcello Allegretti, Nella Prevete, e Rosa Marina Melillo. «Multiple anti-tumor effects of Reparixin on thyroid cancer.» *Oncotarget*, 2017: 16.

Liu, Qian, et al. «The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer.» *Cytokine Growth Factor Review*, 2016: 27.

Liu, Yi, et al. «Clofoctol impairs the stemness of gastric cancer and induces TNF-mediated necroptosis by directly binding to RanBP2.» *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2025: 20.

MacDonald, Laura, Jonathan Jenkins, Grace Purvis, Joshua Lee, e Aime Franco. «The Thyroid Tumor Microenvironment: Potential Targets for Therapeutic Intervention and Prognostication.» *Hormones and Cancer*, 2020: 13.

Martinez-Quintero, Beatriz, Cynthia Yazbeck, e Lori Sweeney. «Thyroiditis: Evaluation and Treatment.» *American Family Physician*, 2021.

McKeown, Nathanael, Matthew Tews, Ved Gossain, e Sid Shah. «Hyperthyroidism.» *Emergency Medicine Clinics of North America*, 2005: 17.

Mempel, Thorsten, Julia Lill, e Lukas-Matthaeus Altenburger. «How Chemokines Organize the Tumor Microenvironment.» *Nat Rev Cancer*, 2024: 47.

Mirabile, Ilaria. *Tumore della tiroide avanzato: In cosa consiste la terapia medica oncologica?* 8 Settembre 2026. https://www.tumoredellatiroide.it/terapie/terapia-per-il-tumore-della-tiroide-avanzato/.

Nguyen, Quang, Joo Lee Eun, Melinda Gingman Huang, Young In Park, Aashish Khullar, e Raymond Plodkowski. «Diagnosis and Treatment of Patients with Thyroid Cancer.» *Americam Health & Drug Benefits*, 2015: 11.

Nikiforov, Yuri. «RET/PTC Rearrangement in Thyroid Tumors.» *Endocrine Pathology*, 2002: 14.

Odell, Ian, e Deborah Cook. «Immunofluorescence Techniques.» *Journal of Investigative Dermatology*, 2013: 4.

Ortiga-Carvalho, Tania, Maria Chiamolera, Carmen Pazos-Moura, e Fredric Wondisford. «Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis.» *Comprehensive Physiology*, 2016: 42.

Pearce, Elizabeth, Alan Farwell, e Lewis Braverman. «Thyroiditis.» *The new england journal of medicine*, 2003: 10.

Pozzi, Sabina, e Ronit Satchi-Fainaro. «The role of CCL2/CCR2 axis in cancer and inflammation: The next frontier in nanomedicine.» *Advanced Drug Delivery Reviews* , 2024: 11.

Prete, Alessandro, Patricia Borges de Souza, Simona Censi, Marina Muzza, Nicole Nucci, e Marialuisa Sponziello. «Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer.» *Frontiers of Endocrinology*, 2020: 10.

Raman, Priyadarshini, e Ronald Koenig. «PAX8-PPARγ fusion protein in thyroid carcinoma.» *Nat Rev Endocrinol*, 2015: 18.

Randi, Ilaria. *Doxorubicina.* 25 Febbraio 2020. https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/doxorubicina.html.

Ravaud, Alain, et al. «A multicenter phase II study of sunitinib in patients with locally advanced or metastatic differentiated, anaplastic or medullary thyroid carcinomas: mature data from the THYSU study.» *Europeam Journal of Cancer*, 2017: 8.

Reen, Denis. «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.» In *Methods in Molecular Biology - Basic Protein and Peptide Protocols*, di Walker, 476. Humana Press, 1994.

Riss, Terry, et al. «Cell Viability Assays.» In *ssay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

Rosa, Marilin. «Fine-Needle Aspiration Biopsy: A Historical Overview.» *Diagnostic Cytopathology*, 2008: 3.

Rotondi, Mario, Francesca Coperchini, Francesco Latrofa, e Luca Chiovato. «Role of Chemokines in Thyroid Cancer Microenvironment: Is CXCL8 the Main Player?» *Frontiers in Endrocrinology*, 2018: 14.

Rousset, Bernard, Corinne Dupuy, Francoise Miot, e Jacques Dumont. «Chapter 2 - Thyroid Hormone Synthesis and Secretion.» In *Thyroid Disease Manager*, di Bernard Rousset, Corinne Dupuy, Francoise Miot e Jacques Dumont, 60. South Dartmouth: MDText, 2015.

Rowell, Nicholas. «Radioactive iodine in the management of medullary carcinoma of the thyroid.» *British Institute of Radiology*, 2023: 8.

Scaglione, Francesco, Silvana Dugnani, Valeria Lucini, Marilou Pannacci, e Luca Paraboni. «In vitro and in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic activity of clofoctol.» *Journal of Chemotherapy*, 2013: 7.

Sekhoacha, Mamello, Keamogetswe Riet, Paballo Motloung, Lemohang Gumenku, Ayodeji Adegoke, e Samson Mashele. «Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches.» *Molecules*, 2022: 33.

Sinkarevs, Stanislavs, Boriss Strumfs, Svetlana Volkova, e Ilze Strumfa. «TumourMicroenvironment: The General Principles of Pathogenesis andImplications in Diffuse Large B Cell Lymphoma.» *Cells*, 2024: 19.

Subbiah, Vivek, et al. «Pralsetinib for patients with advanced or metastatic RET-altered thyroid cancer: results from a multi-cohort, open-label, registrational, phase 1/2 study (ARROW).» *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021: 22.

Toledo, Belen, Linrui Zhu-Chen, Maria Paniagua-Sancho, Juan Antonio Marchal, Macarena Peran, e Elisa Giovannetti. «Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment: a call for precision immunotherapy.» *Journal of Hematology & Oncology*, 2024: 34.

Vilgelm, Anna, e Ann Richmond. «Chemokines modulate immune surveillance in tumorigenesis, metastasis and response to immunotherapy.» *Frontiers in Immunology*, 2019: 14.

Vuga, Michela, e Sofia Corradin. *Scintografia tiroidea.* 12 Luglio 2024. https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-agli-esami/scintigrafia-tiroidea.

Wang, Lusheng, et al. «Activation of the cGAS–STING pathway by clofoctol through mitochondrial damage in triple-negative breast cancer.» *Journal of Translational Medicine*, 2025: 17.

Wang, Minghua, et al. «Identification of an old antibiotic clofoctol as a novel activator of unfolded protein response pathways and an inhibitor of prostate cancer.» *British Journal of Pharmacology*, 2013: 12.

Wells, Samuel, et al. «Vandetanib in patients with Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial.» *Journal of Clinical Oncology*, 2011: 9.

Wen, Xiaoxu, e Hongru Ma. «Cytoplasmic Vacuolization: A Fascinating Morphological Alteration From Cellular Stress to Cell Death.» *Cancer Science*, 2025: 12.

Wieder, Robert, e Nabil Adam. «Drug repositioning for cancer in the era of AI, big omics, and real-world data.» *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 2022: 8.

Wiersinga, Wilmar, Kris Poppe, e George Effraimidis. «Hyperthyroidism: aetiology, pathogenesis, diagnosis, management, complications, and prognosis.» *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2023: 17.

Xiong, Xingu, et al. «CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation.» *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022: 13.

Xu, Maosen, Yang Wang, Ruolan Xia, Yuquan Wei, e Xiawei Wei. «Role of the CCL2- CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting.» *Cell Proliferation*, 2021.

Yan, Jiong, Peixing Wan, Swati Choksi, e Zheng-Gang Liu. «Necroptosis and Tumor Progression.» *Trends Cancer*, 2023: 13.

Yi, Ming, et al. «Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy.» *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024: 48.

Zhang, Xuejing, Daotai Nie, e Subhas Chakrabarty. «Growth factors in tumor microenvironment.» *Front Biosci*, 2012: 22.

Zlotnik, Albert, e Osamu Yoshie. «The Chemokine Superfamily Revisited.» *Immunity*, 2012: 22.