

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche e Sperimentali

Curriculum in Scienze Endocrino-Metaboliche, Nefrologiche E Dell'esercizio Fisico

XXXVI ciclo

**EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI MIR-21 NEL
CARCINOMA MIDOLLARE DELLA TIROIDE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Alberto Ferlin

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Caterina Mian

Collaboratori: Dott.ssa Susi Barollo, Dott. Loris Bertazza

Dottorando: Alberto Mondin

Anno Accademico: 2022-2023

Sommario

Abstract	- 1 -
Riassunto	- 3 -
Introduzione	- 5 -
La ghiandola tiroidea.....	- 5 -
I carcinomi tiroidei	- 6 -
Il Carcinoma midollare della tiroide	- 6 -
Oncogene RET	- 7 -
Trattamento del MTC	- 8 -
Il pathway di miR-21 e PDCD4 nell'MTC	- 9 -
MicroRNA	- 9 -
PDCD4	- 10 -
miR-21 e PDCD4	- 11 -
Modulazione del miR-21 con EF-24	- 11 -
Scopo del progetto	- 13 -
Materiali e Metodi	- 15 -
Colture cellulari e mantenimento	- 15 -
miRNA inhibitor	- 15 -
Farmaci.....	- 15 -
Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA.....	- 16 -
Efficacia del silenziamento dell'anti-miR-21	- 17 -
Real time PCR per PDCD4 e CT	- 18 -
Vitalità cellulare.....	- 20 -
Western blot.....	- 21 -
Dosaggio della Calcitonina.....	- 23 -
Wound healing assay	- 23 -
Analisi del ciclo cellulare	- 24 -

Apoptosi.....	- 25 -
Analisi statistica	- 26 -
Risultati	- 27 -
Efficacia del silencing di miR-21	- 27 -
Western Blot.....	- 30 -
Effetti sui livelli di calcitonina nelle linee cellulari MTC.....	- 33 -
Effetti dei composti sulla migrazione delle cellule MZ-CRC-1 e TT	- 34 -
Analisi della vitalità cellulare e dell'apoptosi.....	- 35 -
Analisi del ciclo cellulare	- 37 -
Discussione	- 39 -
Conclusioni.....	- 43 -
Bibliografia	- 45 -

Abstract

Introduction: Medullary thyroid cancer (MTC) is a rare type of neuroendocrine tumor that produces a hormone called calcitonin (CT). Thyroidectomy is the preferred treatment for MTC, as chemotherapy has been shown to have limited effectiveness. Targeted therapy approaches are currently being used for patients with advanced, metastatic MTC. Several studies have identified microRNAs, including miR-21, as playing a role in the development of MTC. Programmed cell death 4 (PDCD4) is a tumor suppressor gene that is an important target of miR-21. Our previous research has shown that elevated levels of miR-21 are associated with low PDCD4 nuclear scores and high CT levels. The aim of this study was to investigate the potential of this pathway as a novel therapeutic target for MTC.

Methods: We used a specific process to silence miR-21 in two human MTC cell lines. We studied the effect of this anti-miRNA process alone and in combination with Cabozantinib and Vandetanib, two drugs used in targeted therapy for MTC. We analyzed the effect of miR-21 silencing on cell viability, PDCD4 and CT expression, phosphorylation pathways, cell migration, cell cycle, and apoptosis.

Results: Silencing miR-21 alone resulted in a reduction of cell viability and an increase in PDCD4 levels at both mRNA and protein levels. It also led to a reduction in CT expression at both mRNA and secretion levels. When combined with Cabozantinib and Vandetanib, miR-21 silencing did not affect cell cycle or migration but was able to enhance apoptosis.

Conclusion: Silencing miR-21, although not showing synergistic activity with TKIs (tyrosine kinase inhibitors), represents a potential alternative worth exploring as a therapeutic target for MTC.

Riassunto

Introduzione: Il cancro midollare della tiroide (MTC) è un raro tipo di tumore neuroendocrino che produce un ormone chiamato calcitonina (CT). La tiroidectomia è il trattamento d'elezione per l'MTC, poiché la chemioterapia ha dimostrato una efficacia limitata. Attualmente, sono in corso approcci terapeutici mirati per i pazienti affetti da MTC avanzato e metastatico. Diversi studi hanno identificato i microRNA, incluso miR-21, come attori nello sviluppo dell'MTC. Il gene soppressore tumorale Programmed cell death 4 (PDCD4) è un importante bersaglio di miR-21. Le nostre ricerche precedenti hanno dimostrato che alti livelli di miR-21 si associano a bassi score nucleari di PDCD4 e alti livelli di CT. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare il potenziale di questa via come un nuovo bersaglio terapeutico per l'MTC.

Materiali e Metodi: Abbiamo utilizzato una specifica molecola per silenziare miR-21 in due linee cellulari umane di MTC. Abbiamo studiato l'effetto di questo processo da solo e in combinazione con Cabozantinib e Vandetanib, due farmaci utilizzati nella terapia mirata per l'MTC. Abbiamo analizzato l'effetto del silenziamento di miR-21 sulla vitalità cellulare, l'espressione di PDCD4 e CT, le vie di fosforilazione, la migrazione cellulare, il ciclo cellulare e l'apoptosi.

Risultati: Il silenziamento di miR-21 da solo ha comportato una riduzione della vitalità cellulare e un aumento dei livelli di PDCD4 sia a livello di mRNA che di proteina. Ha inoltre portato a una riduzione dell'espressione di CT sia a livello di mRNA che di secrezione. Quando combinato con Cabozantinib e Vandetanib, il silenziamento di miR-21 non ha influenzato il ciclo cellulare o la migrazione cellulare, ma è stato in grado di potenziare l'apoptosi.

Conclusioni: Il silenziamento di miR-21, sebbene non mostri attività sinergica con gli inibitori della tirosin-chinasi (TKI), rappresenta un'alternativa potenziale meritevole di esplorazione come bersaglio terapeutico per l'MTC.

Introduzione

La ghiandola tiroidea

La ghiandola tiroidea è una ghiandola endocrina situata nella regione anteriore inferiore del collo, di fronte e lateralmente alla laringe e ai primi anelli tracheali. Morfologicamente, è composta da due lobi laterali, l'istmo e il lobo piramidale. Dal punto di vista istologico, è composta da due tipi principali di cellule parenchimali: le cellule follicolari e le cellule parafollicolari.

Le cellule follicolari, che sono riempite di una sostanza gelatinosa chiamata colloide, immagazzinano lo iodio e producono gli ormoni tiroidei triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). La T3 è la forma attiva dell'ormone tiroideo, mentre la T4 funge da precursore. (Figura 1)

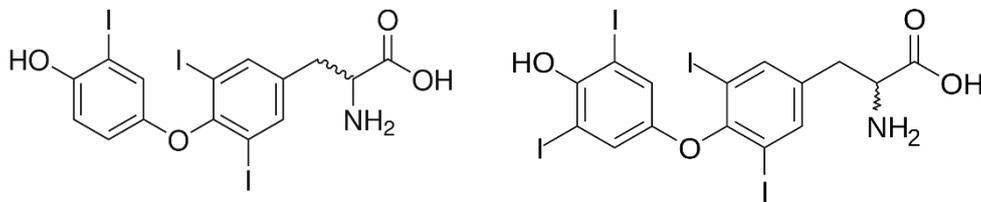


Figura 1: Struttura chimica degli ormoni tiroidei T3 e T4

La secrezione di questi ormoni è regolata dal sistema simpatico e dall'ormone tireostimolante (TSH). La T3 e la T4 agiscono attraverso recettori nucleari e svolgono un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi termogenica e metabolica dell'individuo.

Il secondo tipo di cellula, la cellula C o parafollicolare, produce l'ormone calcitonina (CT). Le cellule parafollicolari (cellule C) si trovano all'interno dei follicoli e sono responsabili della secrezione di calcitonina, un ormone che regola l'omeostasi del calcio. La secrezione di calcitonina è regolata dalla concentrazione di Calcio (Ca^{2+}) nel sangue. [1]

La calcitonina è un peptide di 32 amminoacidi che, insieme alle ghiandole paratiroidi, ai reni, all'intestino e alle ossa, partecipa all'omeostasi del calcio e del fosforo. Il gene che codifica per la calcitonina si trova sul braccio corto del cromosoma 11. Diversi tessuti possono esprimere il gene in risposta a stimoli infiammatori, portando alla sintesi della pre-procalcitonina, alla sua trasformazione in procalcitonina e alla successiva secrezione. Solo nel tessuto parafollicolare avviene il clivaggio definitivo, che porta alla produzione della molecola finale.

I carcinomi tiroidei

Il cancro della tiroide è la neoplasia più comune del sistema endocrino e rappresenta circa il 2% di tutte le nuove diagnosi di cancro. Nel 2017, sono stati diagnosticati negli Stati Uniti 14.400 nuovi casi tra gli uomini e 42.470 tra le donne. I carcinomi della tiroide hanno un'incidenza tre volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini.

I tumori della tiroide possono essere classificati in tumori benigni, principalmente adenomi iperplastici, e lesioni maligne, che sono spesso associate al carcinoma e possono originarsi sia dalle cellule follicolari che dalle cellule C.

I carcinomi della tiroide sono suddivisi in tre tipi in base alle loro caratteristiche istologiche e considerazioni cliniche:

- Carcinomi differenziati: carcinoma papillare (75%) e carcinoma follicolare (15%)
- Carcinoma scarsamente differenziato: carcinoma midollare (5-10%)
- Carcinoma indifferenziato: carcinoma anaplastico (2-5%)

I carcinomi differenziati rappresentano la maggior parte dei carcinomi della tiroide e generalmente hanno una prognosi favorevole. La rimozione chirurgica della ghiandola è spesso sufficiente per ottenere la guarigione, con rari casi di malattia residua. In caso di recidiva, sono disponibili trattamenti farmacologici e radioterapia efficaci. Il carcinoma indifferenziato o anaplastico, la forma più aggressiva di carcinoma della tiroide, è caratterizzato da cellule indifferenziate che hanno poco somiglianza con il tessuto tiroideo normale. La prognosi in questo caso non è favorevole, con un tasso di mortalità del 90% entro un anno dalla diagnosi.

L'ultima forma di carcinoma della tiroide è il carcinoma midollare della tiroide, che origina dalle cellule parafollicolari. È generalmente più aggressivo dei carcinomi differenziati ma non quanto il carcinoma anaplastico. Il tasso di sopravvivenza a cinque anni per il carcinoma midollare della tiroide è di circa l'86%.

Il Carcinoma midollare della tiroide

Il cancro midollare della tiroide (MTC) è un raro tipo di tumore neuroendocrino che origina dalle cellule C parafollicolari della ghiandola tiroidea. Rappresenta il 2% di tutte le neoplasie tiroidee e costituisce una piccola percentuale (0,4-1,4%) dei noduli tiroidei [2]. L'MTC è noto per essere un tumore aggressivo, spesso diagnosticato in uno stadio avanzato, con coinvolgimento dei linfonodi e presenza di metastasi a distanza già in una proporzione significativa dei casi (circa il 35% e il 13%, rispettivamente) [2].

Derivando dalle cellule C, il cancro midollare della tiroide mostra un comportamento biologico diverso rispetto ad altri tipi di tumori tiroidei: non ha la capacità di captare lo iodio e non secreta tireoglobulina. Tuttavia, mantiene la capacità di secernere calcitonina indipendentemente dai livelli di ormone stimolante la tiroide (TSH).

La perdita di capacità di regolare la secrezione di calcitonina rende i livelli sierici della stessa un marcatore diagnostico specifico.

Pertanto, la calcitonina risulta essere il marcatore più importante per l'MTC, utilizzato per la diagnosi, la valutazione della tiroidectomia e il successivo follow-up. Inoltre, il livello sierico di calcitonina è uno strumento utile per valutare la progressione e l'aggressività del tumore.

La prognosi per i pazienti con MTC varia a seconda dello stadio al momento della diagnosi. I tassi di sopravvivenza a 10 anni per gli stadi I, II, III e IV del MTC sono riportati essere rispettivamente del 100%, 93%, 71% e 21% [3]. Queste statistiche mettono in evidenza l'importanza della diagnosi precoce e dell'intervento nel migliorare la cura del paziente.

L'MTC può manifestarsi come tumore sporadico (sMTC) o ereditario (hMTC). La forma sporadica rappresenta circa il 75-80% dei casi di MTC, mentre la forma ereditaria è associata alla sindrome della neoplasia endocrina multipla 2 (MEN2), che deriva da una mutazione germinale nel gene *REarranged during Transfection (RET)* [2]. La comprensione delle basi genetiche del MTC ha fornito preziose informazioni sulla sua patogenesi e ha portato allo sviluppo di terapie mirate che affrontano specificamente le alterazioni molecolari sottostanti.

Oncogene RET

Il recettore tirosin-chinasico a transmembrana RET, codificato dal proto-oncogene *RET* situato sul cromosoma 10, svolge un ruolo nello sviluppo precoce dei reni e del sistema nervoso enterico. La proteina RET, nella sua struttura, è composta da un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e un dominio tirosin-chinasico intracellulare. Il dominio extracellulare contiene quattro domini simili alle caderine (CLD1-4), un sito di legame al calcio e un dominio ricco in cisteina. La regione intracellulare contiene invece un dominio tirosin-chinasico e siti di fosforilazione per la tirosina situati vicino alla regione C-terminale.

Le caderine sono proteine che regolano l'adesione tra le cellule, e la loro capacità adesiva è determinata da una sequenza ripetuta di circa 110 aminoacidi. Il legame del dominio caderinico con il calcio (Ca^{2+}) induce una linearizzazione della porzione extracellulare, proteggendola dalla degradazione proteolitica e stabilizzando i cambiamenti conformazionali necessari per l'interazione con i ligandi e i co-recettori. [4]

L'omodimerizzazione di RET, mediata da un complesso ligando-recettore, porta infine l'attivazione di diverse vie di segnalazione a valle, tra cui le vie RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT, PKA e PKC.

Il proto-oncogene *RET*, nella sua forma mutata costitutivamente attiva, è il principale gene coinvolto nella patogenesi delle diverse forme di carcinoma midollare della tiroide. Le mutazioni che interessano *RET* sono solitamente mutazioni puntiformi che coinvolgono "hot spots" nella sequenza nucleotidica.

Sulla base della caratterizzazione molecolare del sMTC mediante sequenziamento mirato di nuova generazione (NGS), circa il 56% dei pazienti presenta una mutazione somatica del gene *RET*, il 24% ha una mutazione del gene *RAS* e il 2% ha mutazioni che coinvolgono altri geni noti, ma circa il 18% risulta negativo per qualsiasi driver genetico noto [5]. È stata stabilita un'associazione tra il tipo di mutazione coinvolta nel sMTC e la prognosi del paziente: questa è peggiore nei pazienti con una mutazione somatica *RET*, *Met918Thr (M918T)*, rispetto a quelli con altre mutazioni *RET*, ed è migliore in quelli con mutazioni del gene *RAS* [6]. È quindi utile valutare lo stato di mutazione genetica dei pazienti per scopi prognostici, ma anche e in modo per orientare la scelta di nuovi trattamenti mirati per le forme avanzate, come gli inibitori altamente selettivi del RET pralsetinib e selpercatinib, ora approvati per il trattamento del MTC mutato nel gene *RET* [7], o crizotinib per l'uso nei rari casi di MTC con riarrangiamento del gene *ALK* [8]. Purtroppo, il driver genetico rimane sconosciuto in uno su cinque pazienti con MTC, rendendo difficile stabilire la prognosi e identificare eventuali terapie mirate possibili.

Tattamento del MTC

L'approccio primario al trattamento del MTC prevede generalmente una tiroidectomia totale, che comporta la rimozione della ghiandola tiroidea, insieme alla dissezione dei linfonodi centrali del collo. Sebbene la chirurgia sia efficace nelle fasi precoci del MTC, spesso sono necessarie ulteriori modalità di trattamento, specialmente per i pazienti con metastasi a distanza. Purtroppo, la chemioterapia tradizionale e la radioterapia hanno mostrato una limitata efficacia nel trattamento dell'MTC [9]. Per questo motivo, c'è un grande bisogno di trattamenti alternativi e più efficaci, specialmente per i casi avanzati.

Il trattamento dell'MTC avanzato rimane quindi una sfida. Gli inibitori della tirosin-chinasi (TKI) (Cabozantinib e Vandetanib) attualmente impiegati per il trattamento dell'MTC avanzato hanno mostrato un grado variabile di efficacia [10], ma non hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza complessiva [11]. Inoltre, l'MTC diventa spesso resistente ai TKI, riducendo la loro efficacia e

peggiorando di conseguenza l'esito dei pazienti. Infine, i TKI sono spesso scarsamente tollerati dai pazienti, portando frequentemente a interrompere il trattamento o ridurre la dose a causa degli effetti collaterali [3]. La necessità di protocolli di trattamento a lungo termine, a causa degli effetti collaterali non trascurabili che alcuni pazienti sperimentano, ed il problema dei meccanismi di resistenza ai farmaci, che virtualmente tutti i pazienti sperimentano nel tempo, rimangono questioni irrisolte. C'è quindi un urgente bisogno di nuove molecole efficaci o di combinazioni sinergiche per affrontare questi problemi. La nostra conoscenza incompleta dei meccanismi molecolari alla base di tutti i casi di sMTC impedisce la progettazione di un trattamento più efficace per la malattia avanzata, in particolare nei casi senza driver genetici noti.

Il pathway di miR-21 e PDCD4 nell'MTC

MicroRNA

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA endogeni non codificanti, a singolo filamento, di 20-23 nucleotidi che regolano negativamente l'espressione dei geni coinvolti nei processi biologici fondamentali come la differenziazione cellulare, la proliferazione o l'apoptosi. Sono stati identificati oltre 1600 miRNA umani, la maggior parte dei quali è altamente conservata tra diverse specie di mammiferi. Ogni miRNA può regolare contemporaneamente l'espressione di centinaia di geni, contribuendo a circa il 30% dell'espressione proteica totale umana. I miRNA sono prodotti dalle cellule attraverso la scissione da parte di una famiglia di enzimi chiamati RNasi III. Due membri essenziali della famiglia di enzimi RNasi III, Drosha e Dicer, svolgono ruoli distinti nel processo di elaborazione dei miRNA: Drosha è coinvolto nell'elaborazione nucleare dell'pri-miRNA, mentre l'enzima citoplasmatico Dicer è responsabile esclusivamente della generazione di miRNA e di RNA interferenti simili (siRNA) coinvolti nell'interferenza dell'RNA (RNAi).

Il miRNA viene trascritto come un pri-miRNA (pri-miRNA) dall'RNA polimerasi II nel nucleo, che possiede una struttura a doppio filamento con un cap 5' e una poliadenilazione 3'. La RNasi Drosha cliva quindi il pri-miRNA, producendo il pre-miRNA. Il pre-miRNA viene esportato nel citoplasma da una proteina chiamata Exportin 5. Infine, la RNasi Dicer cliva ulteriormente il pre-miRNA, generando un RNA a doppio filamento con un filamento "passeggero" e il miRNA maturo. L'RNA a doppio filamento può associarsi al complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC) per formare il complesso di silenziamento indotto da miRNA (miRISC), che guida il complesso verso l'mRNA bersaglio, portando alla sua degradazione o all'inibizione della traduzione. (Figura 2)

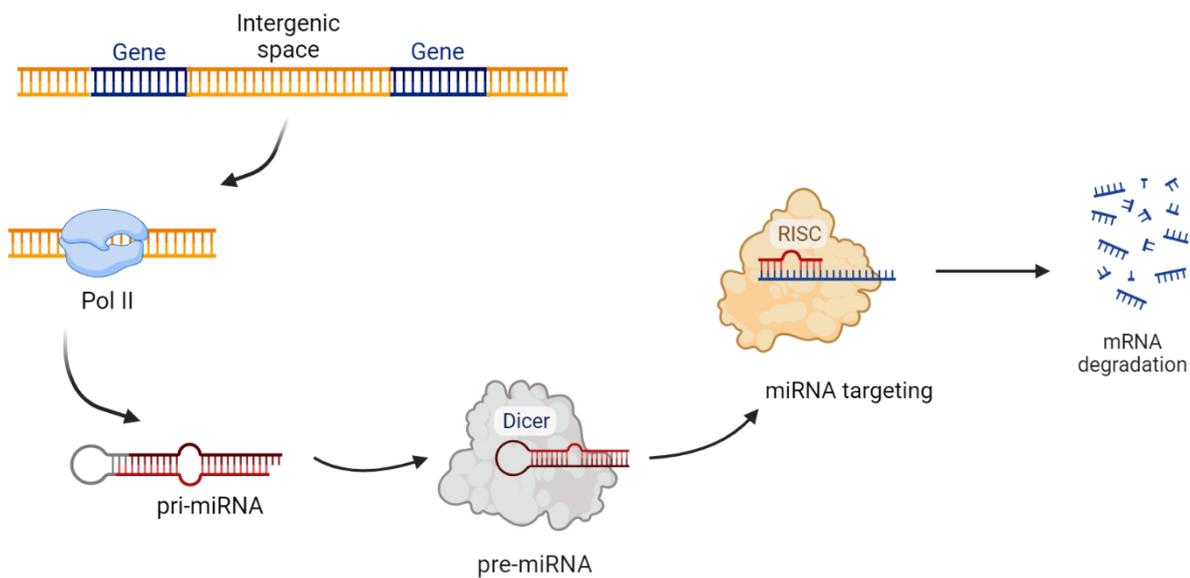


Figura 2: Schema rappresentativo della maturazione e funzionamento di un microRNA

Questo processo si applica anche ai siRNA, che possono essere introdotti artificialmente per sopprimere specificamente l'espressione genica mediante interferenza dell'RNA. L'accoppiamento miRNA-mRNA può avvenire in modo perfetto o imperfetto, portando rispettivamente alla degradazione dell'mRNA o al blocco trascrizionale. I miRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale legandosi alle regioni non tradotte (UTR) dell'mRNA, portando al silenziamento della traduzione. A causa del loro coinvolgimento nella regolazione della traduzione, i miRNA hanno attirato l'attenzione nella ricerca oncologica, poiché la loro deregolazione è spesso associata allo sviluppo di neoplasie. Il miR-21 è un oncogene miRNA particolarmente importante implicato in vari carcinomi umani, tra cui il cancro tiroideo midollare, dove è sovra espresso. Negli esseri umani, miR-21 si trova nel cromosoma 17q23.2, sovrappoendosi a un gene che codifica per una proteina transmembrana (TMEM 49), anche se la loro espressione sembra essere regolata in modo indipendente.

La deregolazione dei miRNA è stata implicata in varie malattie, tra cui il cancro, e numerosi studi hanno evidenziato il loro coinvolgimento nella patogenesi dei tumori endocrini, compreso il cancro tiroideo midollare [12][13]. Per questo motivo, il ruolo dei miRNA nell'MTC ha attirato sempre più attenzione.

PDCD4

PDCD4 è un gene oncosoppressore che codifica per la sua proteina proapoptotica, la Proteina di Morte Cellulare Programmata 4. Svolge un ruolo fisiologico nel bloccare le vie di segnalazione della

proliferazione cellulare inibendo l'elicasi dell'RNA eIF4A, un fattore essenziale per il legame dell'mRNA alla subunità ribosomiale 40S. PDCD4 è sotto espresso in alcuni tumori aggressivi ed è controllato dalla proteina chinasi S6K1 e dalla ligasi ubiquitinica SCF, con la degradazione di PDCD4 che è necessaria per la proliferazione e la crescita cellulare. PDCD4 si lega a due fattori di inizio della trascrizione eucariotica, eIF4A e eIF4G, dove eIF4A è un'elicasi dell'RNA che funziona come subunità del complesso eIF4F composto da eIF4G ed eIF4E. La funzione inibitoria di PDCD4 è esercitata mediante il suo legame con eIF4A, impedendo la successiva formazione del complesso con eIF4G. Ci sono diversi meccanismi che possono portare alla deregolazione di PDCD4, e tra di essi, si è dimostrato che il miR-21 regola negativamente e specificamente la sua espressione legandosi all'UTR 3' del trascritto.

miR-21 e PDCD4

Alcuni studi, principalmente condotti dal nostro gruppo [14–18] , hanno investigato il ruolo dei miRNA in questo tipo di tumore. Negli ultimi anni, il pathway miR-21/PDCD4 è stato studiato come possibile bersaglio terapeutico in vari tumori umani. Diversi farmaci antitumorali agiscono inibendo miRNA oncogeni come il miR-21, ripristinando così l'espressione di geni soppressori tumorali come il PDCD4 e esercitando effetti antitumorali [19,20]. Studi in vitro e in vivo [21,22] hanno anche associato la sovraespressione di miR-21 con la chemioresistenza in diversi tumori umani al cisplatino, ad esempio, nel carcinoma squamoso della lingua, e al gemcitabina nel cancro pancreatico. Al momento non sono disponibili dati sul possibile ruolo di miR-21 come bersaglio farmacologico nel cancro della tiroide e l'argomento è ancora relativamente poco esplorato. In uno studio traslazionale precedente condotto dal nostro gruppo su una serie di MTC sporadici ed ereditari, abbiamo dimostrato una significativa correlazione inversa tra la sovra espressione di miR-21 e la downregulation nucleare del PDCD4 a livello di tessuto. Il pathway miR-21/PDCD4 è stato associato alle variabili clinico-patologiche dei pazienti e alla loro prognosi. Elevati livelli di miR-21 sono stati correlati a: alti livelli di CT, metastasi linfonodali, MTC in stadio avanzato e persistenza della malattia al termine del follow-up. Allo stesso tempo, la downregulation nucleare del PDCD4 è stata associata a livelli più elevati di CT, MTC in stadio avanzato e persistenza della malattia al termine del follow-up.[18]

Modulazione del miR-21 con EF-24

Diversi studi condotti in vitro e in vivo hanno dimostrato l'attività antitumorale della curcumina, un composto presente nella curcuma. È stato dimostrato che la curcumina esercita i suoi effetti terapeutici riducendo l'espressione del miR-21 [23,24]. Ispirandosi a queste promettenti scoperte in

altri tipi di cancro, il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente investigato l'attività anticancro potenziale di EF-24, un analogo della curcumina, in linee cellulari di cancro della tiroide midollare [25] . I nostri risultati hanno indicato che il trattamento combinato di EF-24 e Cabozantinib, un inibitore della tirosin-chinasi comunemente usato per il trattamento del MTC, potenzialmente migliorava l'effetto terapeutico nelle linee cellulari MTC TT e MZ-CRC-1 in modo sinergico. Questo trattamento combinato ha portato a miglioramenti in vari aspetti, tra cui la riduzione della vitalità cellulare, la modulazione della fosforilazione del pathway MAPK come osservato nell'analisi mediante Western blot, la diminuzione della secrezione di calcitonina (CT) nel mezzo di coltura e l'inibizione della migrazione cellulare [25].

Scopo del progetto

L'obiettivo principale di questo studio è stato investigare il potenziale del miR-21 come nuovo bersaglio terapeutico nell'MTC. In particolare, abbiamo utilizzato un anti-miRNA specifico progettato per mirare e sopprimere l'espressione del miR-21. Abbiamo esaminato gli effetti di questo anti-miRNA da solo e in combinazione con Cabozantinib e Vandetanib, un altro inibitore della tirosin-chinasi comunemente usato nel trattamento dell'MTC. In particolare, abbiamo esaminato i possibili effetti su due linee cellulari di riferimento per l'MTC: le cellule TT che presentano una mutazione *RET C634W* e le cellule MZ-CRC-1 che presentano una mutazione *RET M918T*. L'effetto dell'anti-miRNA è stato studiato da solo e in combinazione con Cabozantinib e Vandetanib.

Materiali e Metodi

Colture cellulari e mantenimento

Per gli esperimenti sono state utilizzate due linee cellulari di MTC. La linea cellulare TT (RRID: CVCL_1774) è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection–LGC Standards S.r.l. (Milano, Italia) mentre la linea cellulare MZ-CRC-1 (RRID: CVCL_A656) è stata ottenuta dal Dr. Alessandro Antonelli (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa, Pisa, Italia). Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA), supplementato con il 10% di siero fetale bovino, 2 mM di L-glutammina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e penicillina/streptomina [26].

In breve, le cellule sono coltivate in monostrato in fiasche per coltura T-75 e mantenute in un incubatore a 37°C con 5% di CO₂ fino a raggiungere circa il 90% di confluenza. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule vengono staccate utilizzando 0,05% di tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) e seminate in una nuova T-75 alla densità desiderata.

miRNA inhibitor

L'anti-miR-21 (Anti-21) (Ambion, MH10206 - has-miR21-5p) e il Negative Control #1 (NEG1) (Ambion, AM17010) sono stati acquistati da Life Technologies Italia. Le cellule sono state trasfettate con la molecola anti-miR-21 (un inibitore di miR-21) e il Negative Control #1 per 6 ore utilizzando il reagente di trasfezione Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies Italia) secondo i protocolli del produttore. Il mix di silenziamento è stato quindi rimosso e le cellule sono state mantenute con RPMI 1640 supplementato con l'8% di FBS.

Farmaci

EF-24 (Figura 3) è stato acquistato da Sigma Aldrich, Italia. Cabozantinib (XL184) (Figura 4) è stato acquistato da Selleck Chemicals (Houston, TX). Vandetanib (ZD6474) (Figura 5) è stato acquistato da MERCK. Le polveri sono state disciolte in una soluzione stock al 10 mM in dimetilsolfossido (DMSO) secondo le istruzioni del produttore e conservate a -80°C. Durante gli esperimenti, ogni aliquota è stata scongelata e utilizzata una sola volta.

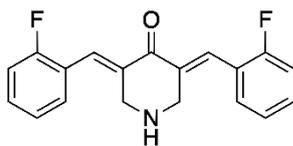


Figura 3: Struttura chimica di EF-24

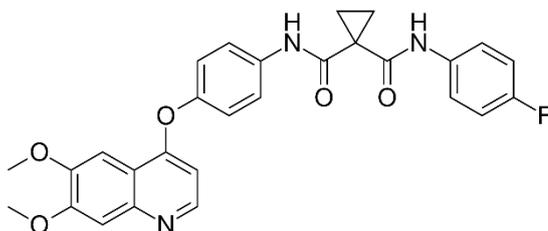


Figura 4: Struttura chimica di Cabozantinib

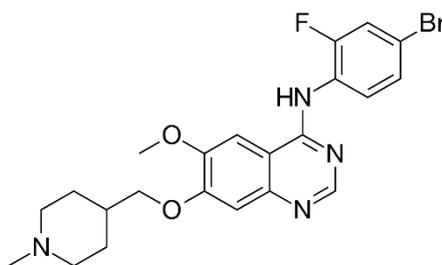


Figura 5: Struttura chimica di Vandetanib

Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule utilizzando il reagente TRIzol come tampone di lisi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e le estrazioni dell'RNA sono state eseguite utilizzando il kit Zymo DirectZol RNA Miniprep (Zymo Research, cat. no. R2052) secondo le istruzioni del produttore.

La solubilizzazione ed estrazione con TRIzol è un metodo relativamente recentemente sviluppato per la rimozione dell'RNA. Il TRIzol (o TRI Reagent) come tale è una soluzione monofasica di fenolo e guanidinio isotiocianato che è in grado di solubilizzare simultaneamente il materiale biologico e denaturare le proteine: ciò permette una separazione di fase (simile all'estrazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamile), in cui le proteine vengono estratte nella fase organica, il DNA si separa all'interfaccia e l'RNA rimane nella fase acquosa. Pertanto, RNA, DNA e proteine possono essere purificati da un unico campione (da qui il nome TRIzol). L'estrazione con TRIzol è anche un metodo efficace per isolare piccoli RNA, come i microRNA [27].

Infine, mediante l'impiego di colonne separatrici l'RNA è stato quindi legato selettivamente ed eluito con acqua. (Figura 6)



Figura 6: schema rappresentativo riportante il funzionamento del kit Zymo DirectZol RNA Miniprep. <https://zymoresearch.eu/>

L'RNA così ottenuto è stato quantificato utilizzando Nanodrop (Thermo-Fisher). La sintesi del cDNA è stata eseguita con il kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) e il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), a seconda del tipo di analisi da eseguire.

Efficacia del silenziamento dell'anti-miR-21

Il kit mirVana miRNA Inhibitors (ThermoFisher) è stato utilizzato per silenziare il miR-21 sulle due linee cellulari. Questo kit prevede l'uso di specifici inibitori di miRNA in grado di legarsi al miRNA di interesse (miR-21 nel nostro caso). Gli inibitori di miRNA sono acidi nucleici a singolo filamento chimicamente modificati per essere capaci a legarsi ed inibire specifici miRNA endogeni. Questi inibitori di miRNA sono molecole pronte all'uso che possono essere inserite nella cellula utilizzando un reagente di trasfezione liposomiale o un protocollo di elettroporazione. Abbiamo utilizzato un agente di trasfezione (Lipofectamine® RNAi MAX Transfection Reagent, ThermoFisher Scientific), una formulazione basata su lipidi cationici e progettata specificamente per la trasfezione di RNA interferente breve (siRNA) nelle linee cellulari. L'efficacia del silenziamento è stata testata utilizzando qRT-PCR per has-miR21-5p (miR-21; 5'-cgg tag cttatcagactgatgttg a-3'; ID: 477975_mir) sul sistema PCR in tempo reale StepOne, con saggi TaqMan avanzati per miRNA, secondo le istruzioni del produttore. La normalizzazione è stata effettuata applicando hsa-miR-16-5p. Tutte le reazioni in tempo reale, compresi i controlli, sono state eseguite in triplicato. I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo di quantificazione relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) [28].

Real time PCR per PDCD4 e CT

La Real-time quantitative PCR (RT-PCR) combina la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Figura 7) e la chimica delle sonde fluorescenti con lo scopo di monitorare nel tempo l'amplificazione del campione con alta sensibilità e specificità.

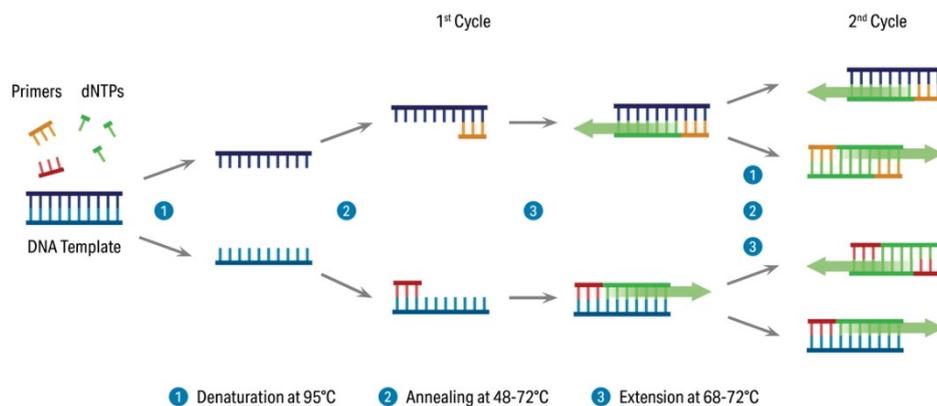


Figura 7: Schema rappresentativo del funzionamento della PCR

La RT-PCR è utilizzata per lo studio dell'espressione genica, la quantificazione di microrganismi, l'identificazione di contaminanti e la stima del numero di copie del DNA. Questa tecnica è apprezzata per la sua alta sensibilità e specificità, ampia gamma di applicazioni, la possibilità di multiplexing dei geni bersaglio, l'ampia disponibilità di strumenti, i relativi bassi costi dei reagenti, la facilità tecnica e le statistiche semplici.

La tecnica sfrutta la fluorescenza emessa dalla molecola reporter durante l'amplificazione esponenziale del DNA. Il colorante SYBR Green è uno dei più utilizzati perché si lega al DNA a doppia elica durante l'estensione del primer da parte della polimerasi. Tuttavia, questo colorante ha il limite di produrre fluorescenza sia con i prodotti specifici che con quelli non specifici della reazione PCR. Per questo motivo, in alternativa al SYBER Green, si utilizzano sonde oligonucleotidiche come le sonde TaqMan come reporter fluorescenti per l'analisi RT-PCR specifica. Ma la progettazione delle sonde è complessa e costosa, quindi la quantificazione assoluta e relativa basata su SYBR Green è ancora molto importante.

La RT-PCR viene considerata ancora oggi una tecnica essenziale negli studi molecolari e genomici. Esistono due metodi principali di quantificazione: la quantificazione relativa che confronta l'espressione genica di un campione con un altro, e la quantificazione assoluta che utilizza una curva standard di concentrazione nota del template per la quantificazione. [29]

Le sonde con tecnologia TaqMan sono un tipo di oligonucleotidi contenenti una molecola fluorescente donatrice (reporter) all'estremità 5' e una molecola fluorescente accettore (quencher) all'estremità 3', che riduce la fluorescenza emessa dalla molecola donatrice grazie alla loro stretta vicinanza. Le sonde sono progettate per legarsi a una regione specifica del cDNA bersaglio. Durante la fase di estensione della PCR, la sonda viene degradata dall'attività esonucleasica 5'-3' della DNA polimerasi, liberando il reporter e generando fluorescenza dalla molecola donatrice.

Questo processo si ripete in ogni ciclo senza interferire con la sintesi esponenziale dei prodotti della PCR. (Figura 8) [30]

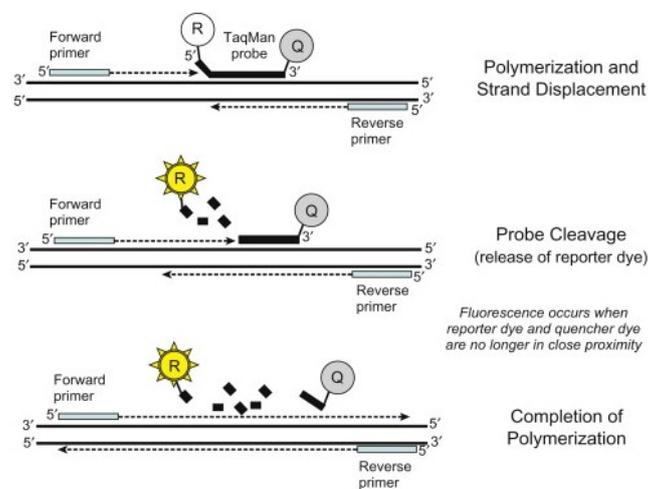


Figura 8: Principio di funzionamento della tecnologia TaqMan

In questo studio è stata eseguita una PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) utilizzando ABI-PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems, Milano, Italia) e il metodo di quantificazione relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). I geni sono stati analizzati utilizzando i seguenti saggi TaqMan: CALCITONINA (4331182; Hs01100741_m1) e PDCD4 (4331182; Hs00377253_m1), tutti forniti da Applied Biosystems. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Sequence Detection rel. 2.4 (Applied Biosystems), adottando una linea di base impostata automaticamente e una soglia di fluorescenza regolata per misurare i valori del ciclo di quantificazione (Ct). Utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$, i dati sono stati presentati come variazione in relative-fold dell'espressione genica confrontata con un campione di riferimento e normalizzata usando un gene housekeeping. Come housekeeping in questo studio, è stato utilizzato il β -actin (Hs99999903_m1), uno dei geni di controllo più comunemente utilizzati.

Vitalità cellulare

Il saggio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromide) viene comunemente utilizzato per valutare la vitalità e la proliferazione delle cellule.

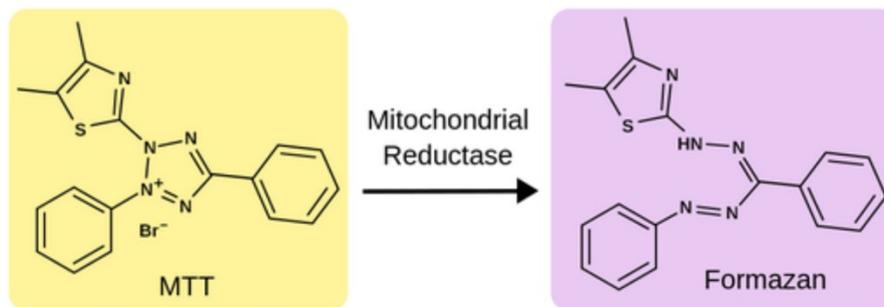


Figura 9: Reazione di trasformazione da MTT a Formazano

L'MTT, quando a contatto con il terreno di coltura, produce una soluzione acquosa dal colore giallastro. Grazie all'azione delle reduttasi cellulari e agenti riducenti presenti nelle cellule metabolicamente attive, si trasforma in un formazano dal colore violetto-blu, composto insolubile in acqua (Figura 9). Questo prodotto liposolubile può essere estratto con solventi organici ed è possibile stimarne la quantità mediante spettrofotometria. Infine, si assume che la quantità di formazano prodotto sia direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. [31]

Dopo il trattamento delle cellule con i farmaci e il periodo di incubazione appropriato, il mezzo di coltura viene rimosso e sostituito con una soluzione contenente l'MTT. Le cellule vive metabolicamente attive convertono l'MTT in un prodotto colorato chiamato formazano mediante le attività enzimatica. Successivamente, il mezzo contenente MTT viene rimosso e viene aggiunto un solvente organico come il DMSO per sciogliere i cristalli di formazano formati all'interno delle cellule. Il DMSO estrae il colorante dal tessuto cellulare, con conseguente colorazione della soluzione. L'assorbanza di quest'ultima viene quindi misurata a una lunghezza d'onda specifica, comunemente a 595 nm, utilizzando uno spettrofotometro. L'intensità del segnale di assorbanza a 595 nm è proporzionale alla quantità di formazano prodotto e quindi alla vitalità cellulare. Una maggiore assorbanza indica una maggiore vitalità cellulare, mentre una diminuzione dell'assorbanza indica una ridotta vitalità o un'attività inibitoria dei trattamenti. Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti per colture cellulari, con una densità di 4×10^4 cellule per pozzetto. L'inibitore di miR-21 e i relativi controlli sono stati trasfettati nelle cellule per 6 ore, successivamente il mezzo di coltura è

stato rimosso e le cellule sono state mantenute con RPMI 1640 addizionati con 8% di FBS. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con i due farmaci per 24 ore a varie concentrazioni (Cabozantinib a 1,4 μM per MZ-CRC-1 e 9,7 μM per TT; Vandetanib a 10 μM per entrambe le linee cellulari). Abbiamo misurato l'effetto inibitorio sulla vitalità cellulare utilizzando il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Successivamente, il mezzo di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 μL di DMSO per sciogliere i cristalli di formazano e l'assorbanza è stata misurata a 595 nm (Viktor 3 Perkin-Elmer). L'intensità del segnale è stata quindi presentata come percentuale rispetto al controllo. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte.

Western blot

Il Western blot, o immunoblotting, è una tecnica utilizzata per analizzare specifiche proteine in un campione biologico. È un metodo molto diffuso nella ricerca biomedica e viene impiegato per rilevare e quantificare la presenza o la variazione di espressione della proteina di interesse in un tessuto o in una miscela di proteine. (Figura 10)

Nel Western blot, le proteine sono separate in base alla loro massa molecolare utilizzando l'elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di un agente riducente che interferisce con i ponti disolfuro delle proteine che perdono la loro struttura quaternaria.

Successivamente, le proteine separate nel gel vengono trasferite su di una membrana di nitrocellulosa. Dopo il trasferimento, la membrana viene trattata con un agente bloccante composto da una soluzione di proteine del latte o albumina di siero bovino (BSA) per prevenire legami non specifici degli anticorpi. Successivamente, la membrana viene incubata con un anticorpo primario specifico per la proteina di interesse. L'anticorpo primario si lega alla proteina bersaglio presente sulla membrana.

Questa viene poi lavata per rimuovere eventuali anticorpi non legati, e viene incubata con un anticorpo secondario coniugato a un marcatore, come un enzima o una sostanza fluorescente. Il secondario si lega all'anticorpo primario, permettendo la rivelazione della proteina di interesse tramite una reazione enzimatica o una fluorescenza.

Infine, la presenza della proteina bersaglio viene visualizzata utilizzando una reazione chimica o un'apparecchiatura di imaging, come un sistema chemiluminescente o uno scanner a fluorescenza. L'intensità del segnale ottenuto è proporzionale alla quantità di proteina presente nel campione.

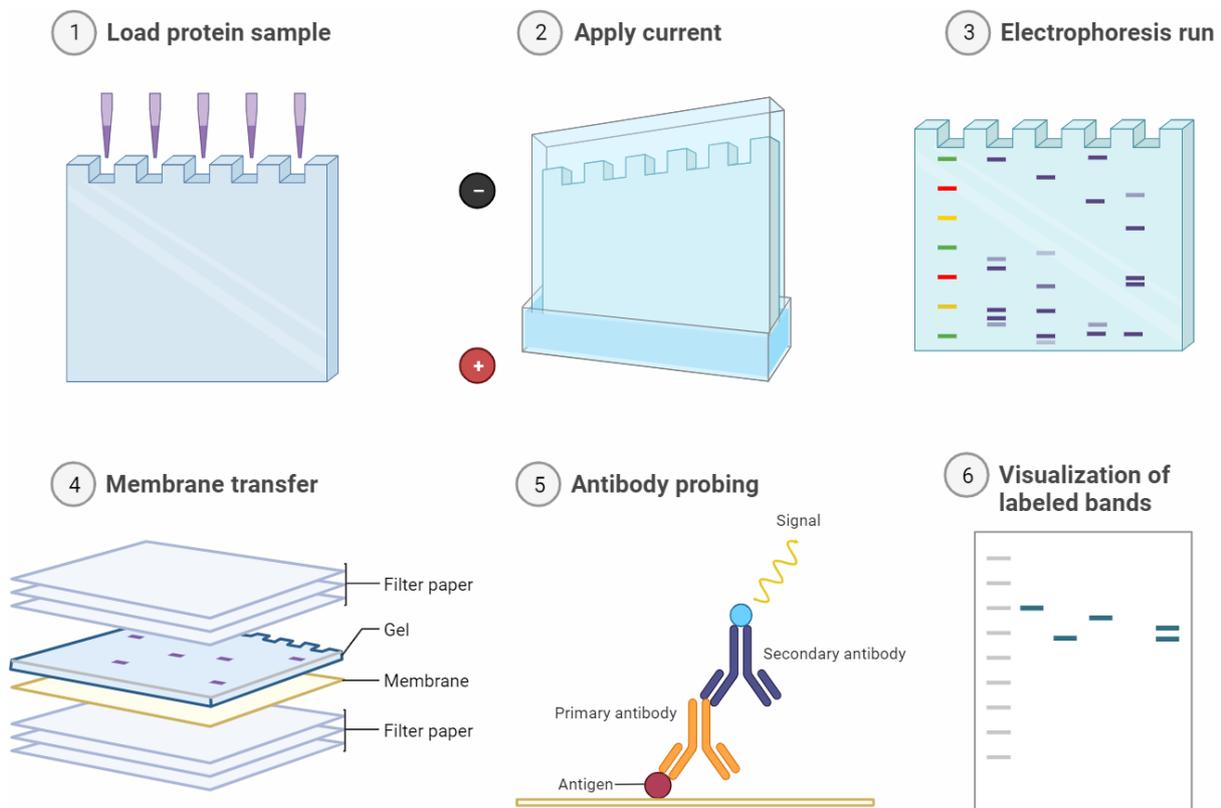


Figura 10: Schema rappresentativo di un protocollo per Western Blot

Nel nostro studio le cellule sono state seminate a una densità di 4×10^5 cellule per well; quindi, trattate come descritto in precedenza per 4 e 24 ore al fine di investigare gli effetti sull'espressione di PDCD4, pAkt e pERK: i livelli di pAkt e pERK sono stati misurati dopo 4 ore a causa della rapidità degli eventi di fosforilazione, mentre PDCD4 è stato misurato dopo 24 ore. Successivamente, le cellule sono state staccate utilizzando tripsina al 0,05%, lavate con PBS e centrifugate a 8000 RCF per 5 minuti per raccogliere il sovranatante, che è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C . Le proteine sono state separate mediante SDS/PAGE in presenza dell'agente riducente S-S ditiotreitolo (DTT), quindi trasferite mediante elettroblot su membrane di nitrocellulosa e bloccate con latte al 5%. Le membrane sono state quindi incubate durante la notte con gli anticorpi primari (anti-fosfo-Erk1/2 [RRID: AB_2315112], anti-PDCD4 [RRID: AB_2315112] e anti-GAPDH [RRID: AB_370675], tutti acquistati da Sigma-Aldrich e diluiti al 1:1000). Gli anticorpi primari sono stati rilevati mediante un anticorpo secondario fluorescente anti-mouse (1:5000) (IRDye 680RD, Li-Cor Biosciences, Milano, Italia) e anti-rabbit (1:10000) (IRDye 800CW, Li-Cor Biosciences, Milano, Italia). Le membrane sono state acquisite utilizzando il sistema di imaging LI-COR Odyssey CLx e

l'intensità delle bande è stata quantificata mediante il software LI-COR Empiria Studio® (v2.1). L'intensità delle bande di ciascun campione è stata normalizzata rispetto al segnale di GAPDH al fine di annullare eventuali differenze sperimentali nel carico proteico e standardizzare il contenuto proteico caricato nel pozzetto. Il segnale normalizzato è stato quindi confrontato con il controllo. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato.

Dosaggio della Calcitonina

La secrezione di CT è stata quantificata nelle cellule nel mezzo di coltura condizionato dopo il trattamento con l'anti-miR-21 da solo e in combinazione con i farmaci. In breve, le cellule sono state seminate in piastre petri da coltura da 60 mm e trattate per 24 ore. Successivamente, il mezzo condizionato è stato raccolto e i livelli di CT sono stati quantificati utilizzando il kit LIAISON® Calcitonin_II-Gen (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA), un metodo analitico che impiega un saggio chemiluminescente. Le concentrazioni di CT sono state quindi normalizzate in base al numero di cellule contate per ciascun pozzetto analizzato. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Wound healing assay

Il test di Wound healing, noto anche come scratch assay, è una tecnica utilizzata per studiare la migrazione cellulare e l'interazione tra cellule. Questo test prende il nome dall'azione di "graffiare" uno strato di cellule, formando una "ferita", e catturare immagini a intervalli regolari utilizzando solitamente un microscopio. [32]

Si tratta di un approccio utilizzato per misurare in modo semiquantitativo la migrazione di un monostrato di cellule. Questo graffio può essere realizzato attraverso varie tecniche, come danni meccanici, termici o chimici. Lo scopo di questo graffio è quello di creare un'area priva di cellule nel tentativo di osservare le cellule migrare e chiudere lo spazio formatosi.

Nel nostro studio, le cellule sono state seminate su piastre a sei pozzetti a una densità di 4×10^5 cellule per pozzetto e trattate per 48 ore con i farmaci a dosi pari alla metà della concentrazione di IC50 determinata tramite il test MTT. Alla fine del trattamento, il mezzo di coltura è stato rimosso e immediatamente sostituito con il mezzo di coltura completo, creando una ferita da strisciamento utilizzando una punta di pipetta. La migrazione delle cellule è stata monitorata per le successive 72 ore con il microscopio Leica DMI6000CS (Leica Microsystem, Wetzlar, Germania). Le cellule hanno migrato sulla superficie della ferita e la distanza media delle cellule è stata misurata utilizzando il software Leica Application Suite (LAS-AF) 3.1.1. (Leica Microsystems) ed elaborata con il software

ImageJ (ImageJ 1.53e; versione Java 8 [64 bit]) a 0 e 72 ore. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Analisi del ciclo cellulare

La misurazione del contenuto di DNA è una delle prime applicazioni della citometria a flusso e continua ad essere ampiamente utilizzata ancora oggi. Si tratta di una delle tecniche fondamentali nello studio della crescita cellulare, della differenziazione, della senescenza e dell'apoptosi. [33]

La progressione del ciclo cellulare è divisa in 4 fasi, comprese la fase di gap 1 (G1), la sintesi (S), il gap 2 (G2) e la mitosi (M). (Figura 11)

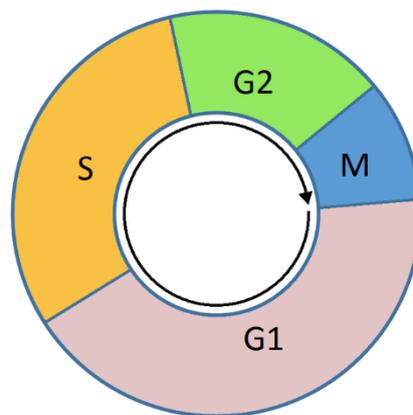


Figura 11: Schema rappresentativo del ciclo cellulare

La fase G1 è la fase di crescita. Mentre le attività biosintetiche della cellula rallentano considerevolmente nella fase M, riprendono a un ritmo elevato nella fase G1. Queste attività includono la sintesi di molte proteine, l'amplificazione di organelli come i ribosomi e i mitocondri e l'aumento delle dimensioni della cellula.

La fase S è caratterizzata dalla sintesi del DNA. Nella fase S, la quantità di DNA in ciascun cromosoma viene raddoppiata, risultando in un cromosoma composto da due identiche cromatidi fratelli. La fase S è anche caratterizzata da bassi livelli di espressione genica e sintesi proteica.

La fase G2 inizia dopo il completamento della fase S e si conclude con l'inizio della mitosi. Il compito principale delle cellule nella fase G2 è prepararsi per la mitosi. Di conseguenza, la fase G2 è contrassegnata da una significativa sintesi di proteine e lipidi e dalla crescita cellulare.

La fase M è composta dalla mitosi, durante la quale il nucleo della cellula si divide, e dalla citodieresi, durante la quale il citoplasma della cellula si divide per formare due cellule figlie. La mitosi è

ulteriormente divisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase. La profase è caratterizzata dalla condensazione del cromatina/cromosoma, dalla separazione del centrosoma e dalla rottura della membrana nucleare. La migrazione dei centrosomi verso due poli opposti è importante per la formazione dell'apparato mitotico bipolare.

La fase successiva è la prometafase, durante la quale i microtubuli dell'apparato mitotico si attaccano ai cinetochores (strutture proteiche a forma di disco) al centro di ciascun cromosoma. Segue la metafase, durante la quale i cromosomi vengono tirati avanti e indietro dai microtubuli del cinetocore. Tale processo continua fino a quando questi si allineano lungo la l'equatore della cellula, giungendo all'anafase. L'ultima fase della mitosi è la telofase. I cromatidi separati (ora chiamati cromosomi) si decondensano. Allo stesso tempo, le membrane nucleari si formano intorno ai cromosomi separati per dividere il DNA nucleare dal citoplasma. Infine, la citodieresi porta alla separazione fisica del citoplasma della cellula madre in due cellule figlie. [34]

Il contenuto genetico nelle fasi G1, S, G2 e nella mitosi avanzata è rispettivamente $2n$ (diploide), $4n$ (tetraploide). Questi eventi del ciclo cellulare sono ben controllati da punti di controllo per garantire la stabilità del genoma e la corretta segregazione dei cromosomi. [35]

Per questa analisi, le cellule sono state seminate su piastre a 12 pozzetti a una densità di 1×10^6 cellule e trattate con i farmaci, singolarmente o in combinazione, per 48 ore utilizzando le dosi medie di IC50 determinate mediante il test MTT. Successivamente, le cellule sono state staccate con tripsina, lavate con PBS e fissate con etanolo al 100% freddo (4°C). Le cellule sono state poi lavate con PBS freddo (4°C), trattate con RNAsi (concentrazione finale: 1 mg/ml), risospese in una soluzione di ioduro di propidio (PI, concentrazione finale: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) e incubate al buio a 37°C per 1 ora. Infine, sono state centrifugate, lavate con PBS e lette allo strumento. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata utilizzando la citometria a flusso ad immagini multispettrale (ImageStreamX mark II; Amnis Corp, Seattle, WA, Stati Uniti). I dati sono stati analizzati utilizzando il software di analisi delle immagini IDEAS 6.3 (Amnis Corp). Le immagini sono state compensate per la sovrapposizione dei coloranti fluorescenti utilizzando controlli a colorazione singola. L'analisi delle immagini è stata effettuata come segue: le cellule focalizzate sono state distinte in base all'intensità di PI sul canale 05 (Ch05) per l'identificazione delle fasi G0/G1, S e G2/M. Successivamente, l'analisi delle immagini sulla fase G2/M ci ha permesso di separare e quantificare le cellule mitotiche.

Apoptosi

Il processo di morte cellulare programmata, o apoptosi, è caratterizzato in generale da distinte caratteristiche morfologiche e meccanismi biochimici. L'apoptosi è considerata una componente

vitale di vari processi, tra cui il normale ricambio delle cellule, lo sviluppo e il funzionamento corretto del sistema immunitario o la morte cellulare indotta da sostanze chimiche. Una ridotta apoptosi è un fattore scatenante di molte patologie umane, tra cui il cancro. [36] Per questo motivo l'analisi dell'apoptosi ricopre un ruolo cruciale nella comprensione dell'efficacia terapeutica delle molecole in esame.

L'apoptosi è stata valutata con il test Caspase-Glo® 3/7, un test che misura l'attività delle caspasi 3 e 7 (caspasi chiave nel processo dell'apoptosi) mediante chemiluminescenza. L'aggiunta del reagente Caspase-Glo provoca la lisi delle cellule seguita dal clivaggio delle caspasi del substrato e dalla generazione di un segnale luminescente prodotto dalla luciferasi: tale segnale è quindi proporzionale alla quantità di caspasi attive. Le cellule sono state seminate in una piastra bianca da 96 pozzetti e trattate come descritto in precedenza. Il giorno degli esperimenti, il Caspase-Glo® 3/7 è stato preparato secondo le linee guida del produttore e aggiunto dopo 24 ore di trattamento. Dopo aver mescolato la soluzione a 500 rpm per 30 secondi, la piastra è stata incubata per 90 minuti al buio e a temperatura ambiente per stabilizzare il segnale prima di misurare la luminescenza con il luminometro (Viktor 3 Perkin-Elmer). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte.

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software statistico MedCalc® versione 20.027 (MedCalc Software Ltd, Ostenda, Belgio; <https://www.medcalc.org>; 2022). Per misurare le differenze nei livelli di espressione di miR-21 tra il campione trattato con l'anti-miR-21 e il Negative Control#1 è stato utilizzato il test t di Student. Tale test è stato anche utilizzato per misurare le differenze nella vitalità cellulare, nei livelli di PDCD4 e CT tra i campioni trattati con i due farmaci, singolarmente e in combinazione con l'anti-miR-21. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Effetto di EF-24 sui livelli di espressione di miR-21

Il trattamento con EF-24 ha ridotto l'espressione di miR-21 del 26,2% nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e del 21,6% nelle linee cellulari TT, rispetto al controllo ($p < 0,05$, Figura 12).

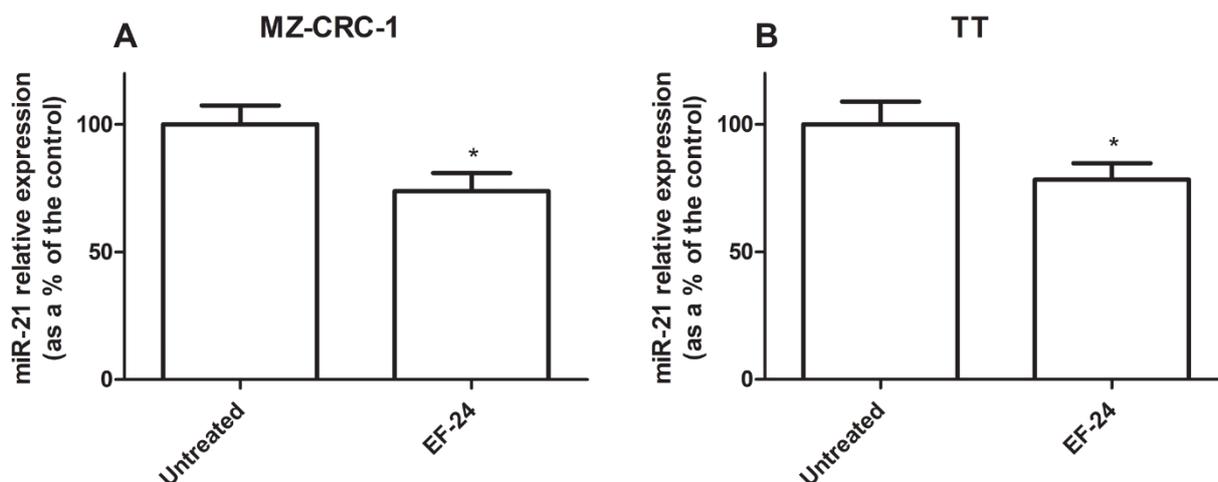


Figura 12: Istogramma che mostra i livelli di espressione di miR-21 (come percentuale rispetto al controllo) nelle linee cellulari MZ-CRC-1 (a sinistra) e TT (a destra). * $p < 0,05$.

Efficacia del silencing di miR-21

Abbiamo testato l'efficacia della trasfezione nei nostri modelli in vitro di MTC per ottenere il punto di partenza per il nostro studio. La trasfezione con anti-miR-21 utilizzando Lipofectamine RNAiMAX ha determinato una riduzione dei livelli di miR-21 del 87,5% nella linea cellulare MZ-CRC-1 ($p < 0,001$) e dell'87,6% nella linea cellulare TT ($p < 0,001$, Figura 13).

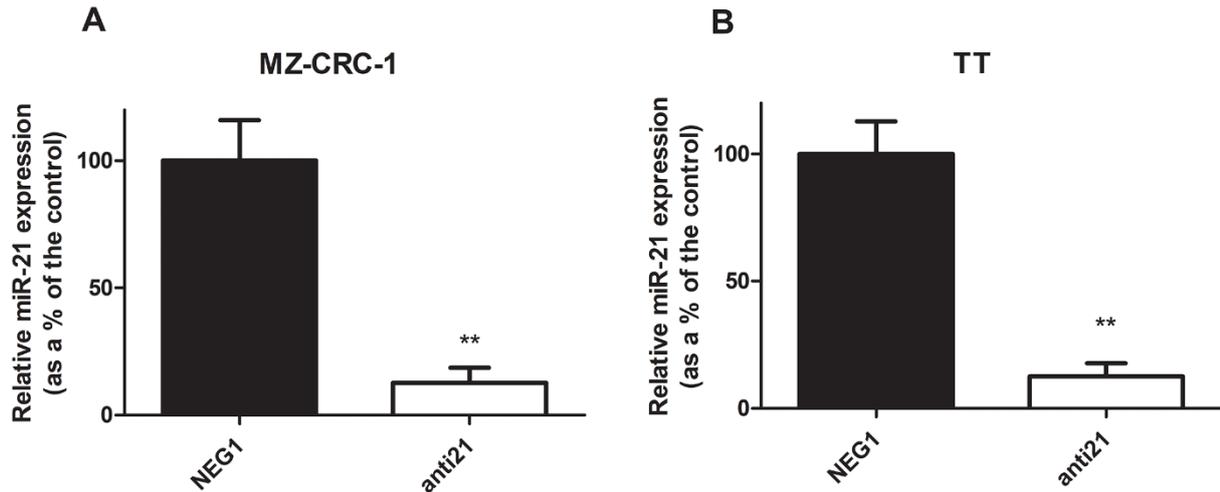


Figura 13: Espressione relativa di miR-21 nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT. (A) Espressione relativa di miR-21 in MZ-CRC-1; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21) (B) Espressione relativa di miR-21 in TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte. Trattamento vs controllo: ** $p < 0,001$

5.3 Effetti sui livelli di espressione dell'mRNA

Abbiamo analizzato l'effetto del trattamento con anti-miR-21 sui livelli di espressione del gene oncosoppressore PDCD4 (Figura 14) e della calcitonina (Figura 15). Nella linea cellulare MZ-CRC-1 trattata con anti-miR-21, l'espressione dell'mRNA di PDCD4 è aumentata del 15,8% ($p=0,0063$) rispetto al Negative Control#1; il trattamento con Cabozantinib da solo ha stimolato l'espressione di PDCD4 di 4,17 volte ($p<0,001$); quando i due trattamenti sono stati combinati, i livelli di espressione

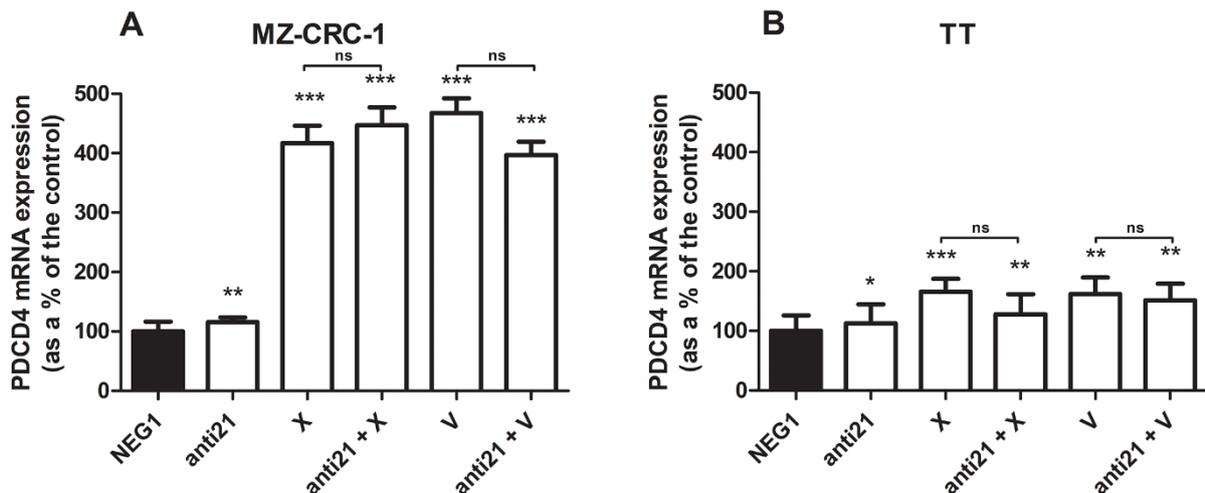


Figura 14: Livelli di espressione di mRNA di PDCD4 mediante analisi di qRT-PCR. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ Trattamento vs. controllo (se non diversamente indicato).

dell'mRNA di PDCD4 sono aumentati di 4,48 volte ($p < 0,001$). Non sono emerse differenze statisticamente significative tra gli effetti di upregolazione dell'mRNA di PDCD4 tra Cabozantinib da solo e in combinazione. Nella stessa linea cellulare, il trattamento con Vandetanib ha portato a un aumento di 4,68 volte nei livelli di mRNA di PDCD4 ($p < 0,001$), ma la sua combinazione con anti-miR-21 non ha aumentato ulteriormente il suo effetto. Allo stesso modo nella linea cellulare TT, il trattamento con anti-miR-21 da solo ha aumentato l'espressione dell'mRNA di PDCD4 del 12,9% ($p = 0,0196$) rispetto al controllo, e il trattamento con Cabozantinib da solo del 65,9% ($p < 0,001$), ma la combinazione dei due trattamenti non ha aggiunto a tale aumento. Vandetanib ha altrettanto portato a un aumento del 61,9% nei livelli di mRNA di PDCD4 ($p = 0,002$), ma la sua combinazione con anti-miR-21 non ha ulteriormente aumentato la sua espressione (Figura 14). Il trattamento con anti-miR-21 ha comportato una leggera riduzione dei livelli di mRNA di CT rispetto al Negative Control#1: 17,5% in MZ-CRC-1 e 17,2% in TT ($p < 0,05$). Cabozantinib ha ridotto l'espressione di CT del 37,4% in MZ-CRC-1 e del 25,5% in TT ($p < 0,05$). Con Vandetanib, l'espressione di CT è stata ridotta del 60,0% in MZ-CRC-1 e del 28,2% in TT ($p < 0,05$). L'associazione di anti-miR-21 con uno di questi due farmaci non ha comportato una ulteriore riduzione dei livelli di mRNA di CT (Figura 15).

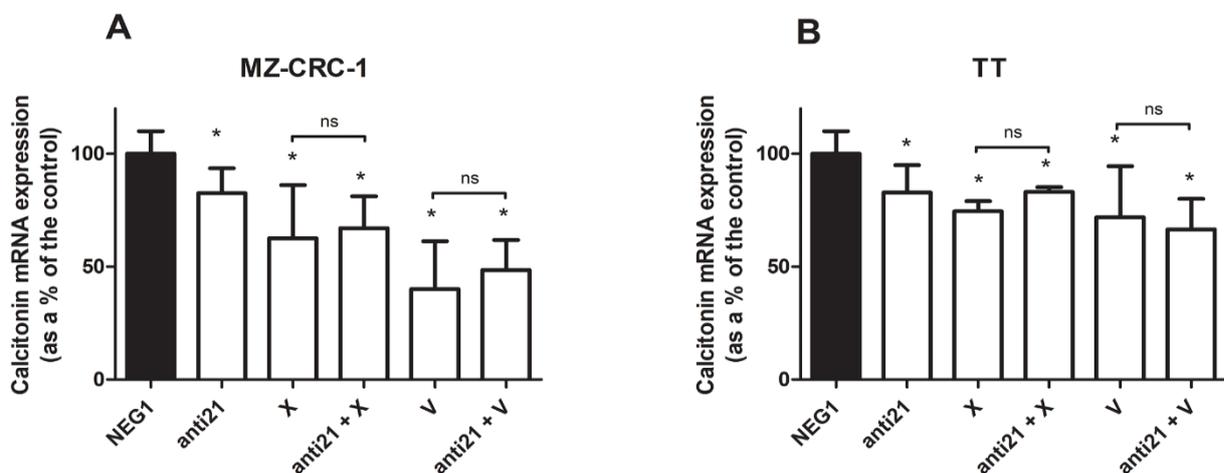


Figura 15: Livelli di espressione di mRNA di calcitonina mediante analisi qRT-PCR. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ Trattamento vs. controllo (se non diversamente indicato).

Western Blot

L'analisi mediante Western blot è stata utilizzata per valutare gli effetti di anti-miR-21 e dei due farmaci, da soli o in combinazione, sui livelli di PDCD4, pAkt e pERK nelle linee cellulari MZ-CRC-1 e TT. L'inibizione dei segnali di fosforilazione è stata quantificata e ogni farmaco o combinazione è stato confrontato con il proprio Negative Control#1.

Nella linea cellulare MZ-CRC-1, dopo 24 ore, anti-miR-21 ha aumentato il segnale di PDCD4 di 2,69 volte ($p < 0,05$) rispetto al Negative Control#1, e il trattamento con Cabozantinib o Vandetanib da solo ha comportato aumenti rispettivamente del 1,15 volte e del 2,17 volte ($p < 0,05$) (Figura 16). Tuttavia, la combinazione di anti-miR-21 con questi farmaci per 24 ore non ha comportato un ulteriore aumento dell'espressione di PDCD4. Nella linea cellulare TT, dopo 24 ore, anti-miR-21 ha aumentato il segnale di PDCD4 di 2,1 volte ($p < 0,05$) rispetto al Negative Control#1. Il trattamento con Cabozantinib o Vandetanib da solo ha comportato aumenti rispettivamente del 2,64 volte ($p < 0,05$) e del 1,52 volte rispetto al Negative Control#1 (Figura 16). Aggiungere anti-miR-21 non ha modificato l'effetto di nessuno dei due farmaci quando usato da solo.

Abbiamo analizzato gli effetti di anti-miR-21, da solo e in combinazione con i due farmaci, sull'espressione delle proteine pAkt e pERK a 4 ore (Figura 17). Il trattamento con anti-miR-21 nella linea cellulare MZ-CRC-1 non ha causato variazioni nei segnali di pAkt o pERK rispetto al Negative Control#1. D'altra parte, il trattamento con Cabozantinib o Vandetanib ha comportato una riduzione dei livelli sia di pAkt che di pERK: pAkt è stato ridotto del 67,1% con Cabozantinib ($p < 0,05$) e dell'82,6% con Vandetanib ($p < 0,05$); e pERK è stato ridotto del 53,3% ($p < 0,05$) con il primo e del 91,9% ($p < 0,05$) con il secondo. Aggiungere anti-miR-21 ha potenziato l'effetto di Cabozantinib da solo (il segnale di pAkt è sceso ulteriormente dal 67,1% al 74,0%, e il segnale di pERK dal 53,3% al 67,4%) ma non ha comportato una ulteriore diminuzione dei livelli di pERK quando combinato con Vandetanib.

Nella linea cellulare TT, il trattamento con anti-miR-21 per 4 ore non ha avuto effetto su pAkt ma ha causato un leggero aumento dei livelli di pERK rispetto al Negative Control#1. D'altra parte, Cabozantinib ha ridotto il segnale di pAkt del 28,3% ($p < 0,05$) e Vandetanib l'ha abbassato del 32,9% ($p < 0,05$), e i due farmaci hanno comportato una diminuzione dei livelli di pERK rispettivamente dell'88,6% ($p < 0,05$) e del 43,2% ($p < 0,05$). Combinare anti-miR-21 con Cabozantinib non ha prodotto alcuna differenza, ma la sua associazione con Vandetanib ha potenziato l'effetto osservato con il farmaco da solo, con un'ulteriore riduzione della fosforilazione di Akt dal 32,9% al 52,5% e della fosforilazione di ERK dal 43,2% al 50,5%.

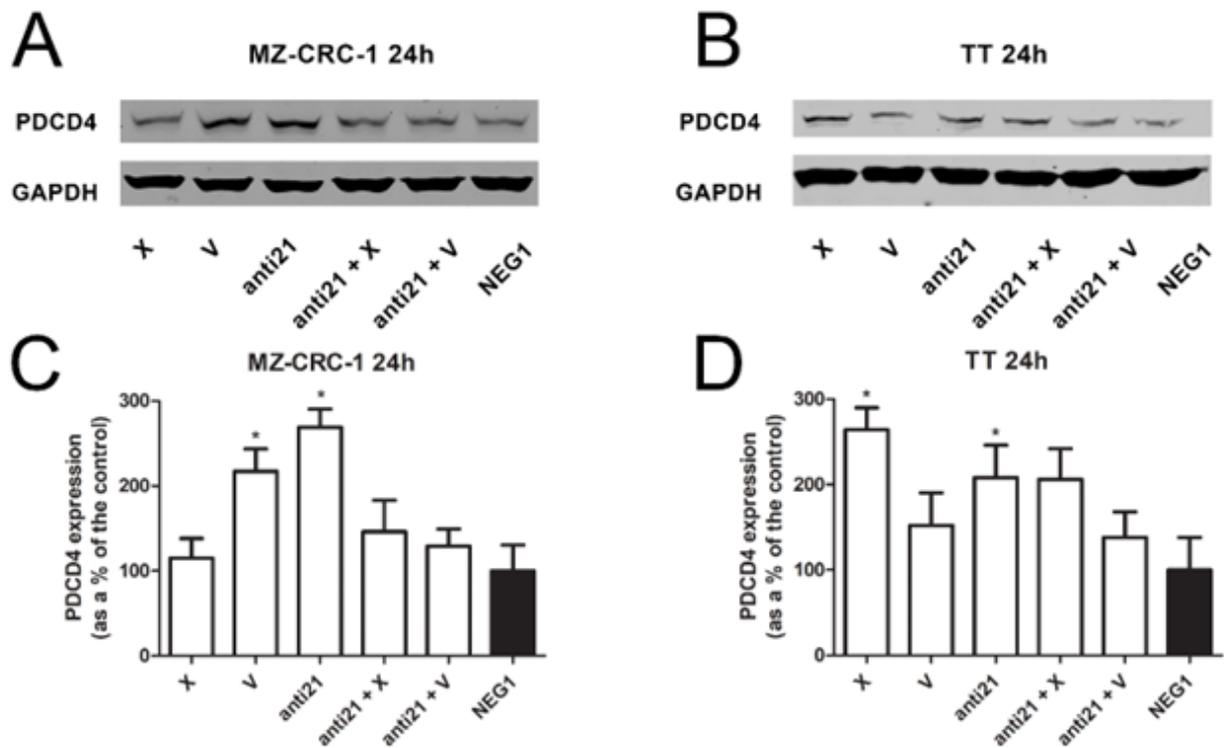


Figura 16: Analisi rappresentativa di Western blot per PDCD4 nelle cellule MZ-CRC-1 (A) e TT (B); quantificazione di PDCD4 nelle cellule MZ-CRC-1 (C); quantificazione di PDCD4 nelle cellule TT (D); (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

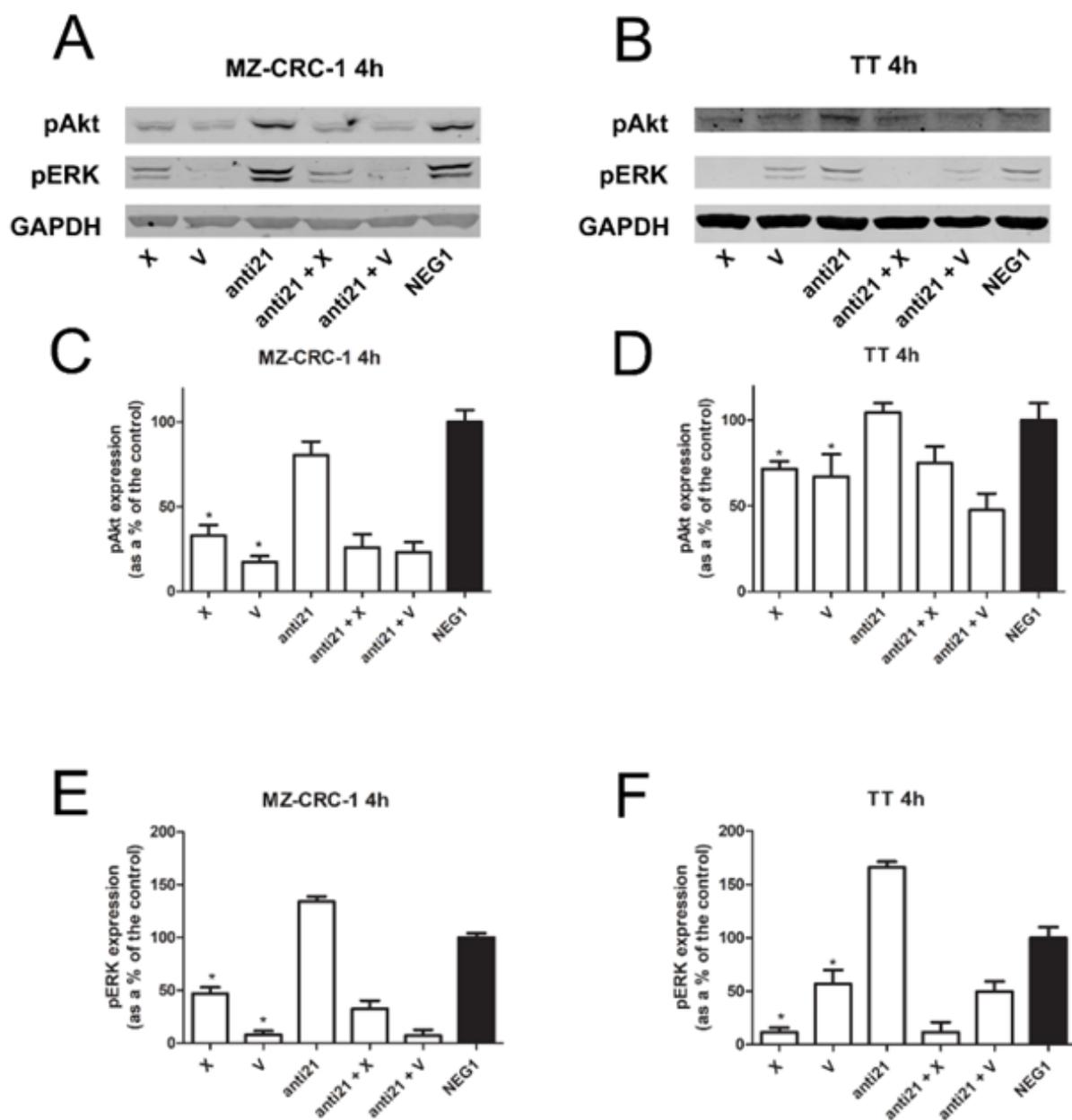


Figura 17: Rappresentazione di analisi di Western blot per le cellule MZ-CRC-1 (A) e TT (B); pAkt e pERK sono stati analizzati a 4 ore. Quantificazione di pAkt nelle cellule MZ-CRC-1 (C). Quantificazione di pAkt nelle cellule TT (D). Quantificazione di pERK nelle cellule MZ-CRC-1 (E). Quantificazione di pERK nelle cellule TT (F). (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Effetti sui livelli di calcitonina nelle linee cellulari MTC

Abbiamo anche studiato gli effetti dei farmaci sui livelli di CT nel mezzo di coltura (Figura 18). Il trattamento con anti-miR-21 ha ridotto la concentrazione di CT rispetto al Negative Control#1, del 14,1% in MZ-CRC-1 e dell'8,0% in TT ($p < 0,05$). Cabozantinib ha ridotto i livelli di CT del 36,9% in MZ-CRC-1 e del 14,4% in TT ($p < 0,05$), e Vandetanib li ha ridotti rispettivamente del 11,3% in MZ-CRC-1 e del 23,9% in TT ($p < 0,05$). Parallelemente ai risultati della qPCR, combinare anti-miR-21 con uno qualsiasi di questi farmaci non ha comportato una ulteriore riduzione delle concentrazioni di CT.

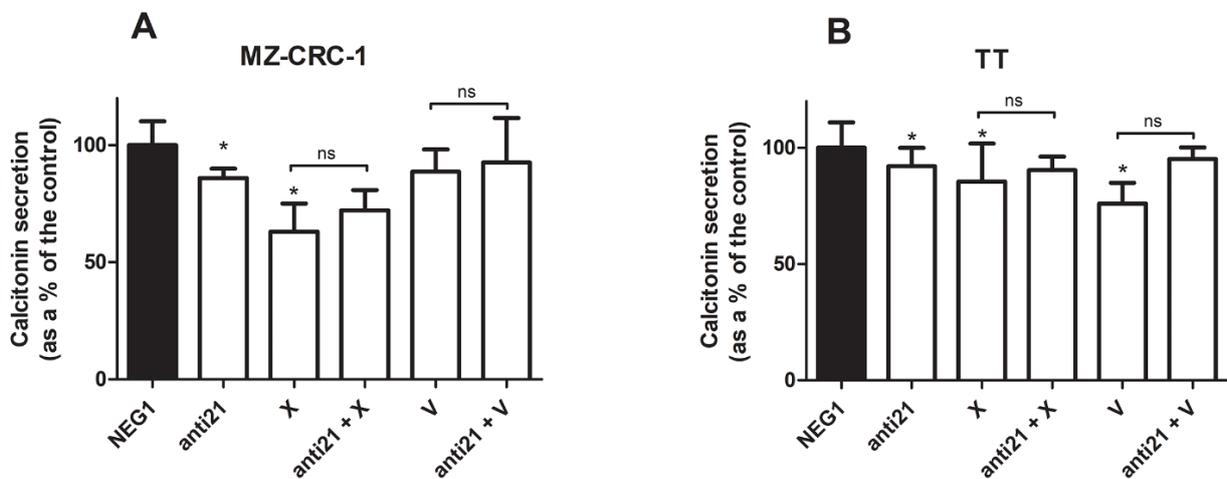


Figura 18: Livelli di secrezione di calcitonina. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ Trattamento rispetto al controllo (se non diversamente specificato).

Effetti dei composti sulla migrazione delle cellule MZ-CRC-1 e TT

Abbiamo eseguito un test di wound healing in vitro per valutare l'effetto di anti-miR-21, Cabozantinib e Vandetanib, da soli e combinati, sulla migrazione delle cellule TT e MZ-CRC-1, un processo cruciale nella crescita tumorale (Figura 19).

72 ore dopo la fine del trattamento, anti-miR-21 ha significativamente inibito la migrazione di entrambe le linee cellulari, riducendola del 7,4% in MZ-CRC-1 ($p < 0,05$) e dell'8,0% in TT ($p < 0,05$). In MZ-CRC-1, la chiusura della ferita ha raggiunto il 30,6% nel controllo negativo, il 23,2% con anti-miR-21 ($p < 0,05$), il 3,4% con Cabozantinib ($p < 0,05$) e il 15,7% con Vandetanib ($p < 0,05$). Combinare anti-miR-21 con Cabozantinib non ha influenzato ulteriormente la migrazione delle cellule, ma la sua combinazione con Vandetanib ha portato a una significativa ulteriore riduzione del 6,8% nella migrazione delle cellule ($p < 0,05$). In TT, la chiusura della ferita ha raggiunto il 19,2% nel controllo, l'11,2% ($p < 0,05$) con anti-miR-21, il 4,5% ($p < 0,05$) con Cabozantinib e il 4,6% ($p < 0,05$) con Vandetanib. Aggiungere anti-miR-21 al trattamento con Cabozantinib o Vandetanib non ha influenzato ulteriormente la migrazione delle cellule.

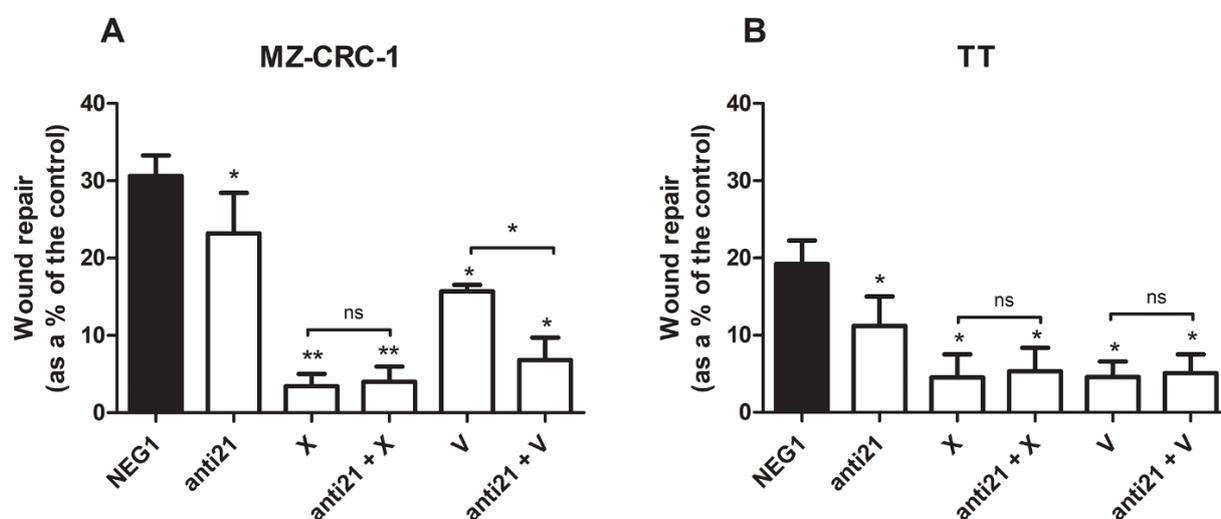


Figura 19: Effetti sulla migrazione mediante analisi wound healing. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Analisi della vitalità cellulare e dell'apoptosi

Gli effetti di anti-miR-21, Vandetanib e Cabozantinib sulla vitalità delle cellule MZ-CRC-1 e TT sono stati esaminati in vitro a 48 ore, come descritto in precedenza. L'uso di anti-miR-21 da solo ha ridotto la vitalità cellulare del 13,1% in MZ-CRC-1 ($p=0,0066$) e del 9,5% in TT ($p=0,0221$). L'uso di Cabozantinib da solo ha ridotto la vitalità cellulare del 48,0% in MZ-CRC-1 ($p<0,001$) e del 63,4% in TT ($p<0,001$). Con Vandetanib da solo, la riduzione della vitalità cellulare è stata del 65,7% in MZ-CRC-1 ($p<0,001$) e del 78,5% in TT ($p<0,001$). Combinare anti-miR-21 con uno degli altri due farmaci non ha influenzato ulteriormente la vitalità cellulare né in MZ-CRC-1 né in TT (Figura 20). Abbiamo esaminato l'effetto di anti-miR-21, Cabozantinib e Vandetanib, da soli e combinati, sull'apoptosi delle cellule MZ-CRC-1 e TT (Figura 21).

Dopo il trattamento, l'apoptosi rilevata mediante il test di chemiluminescenza ha mostrato un comportamento diverso nelle due linee cellulari. Mentre non sono stati evidenti effetti significativi in TT, il tasso di apoptosi in MZ-CRC-1 è aumentato del 15,5% (rispetto al controllo) con il trattamento anti-miR-21. La combinazione di anti-miR-21 con uno dei due farmaci ha aumentato anche gli effetti dei farmaci da soli, passando da un aumento del 5,8% con Cabozantinib da solo al 32,3% con la combinazione ($p=0,001$), e dal 4,2% con Vandetanib da solo al 44,4% quando è stato combinato con anti-miR-21 ($p<0,001$).

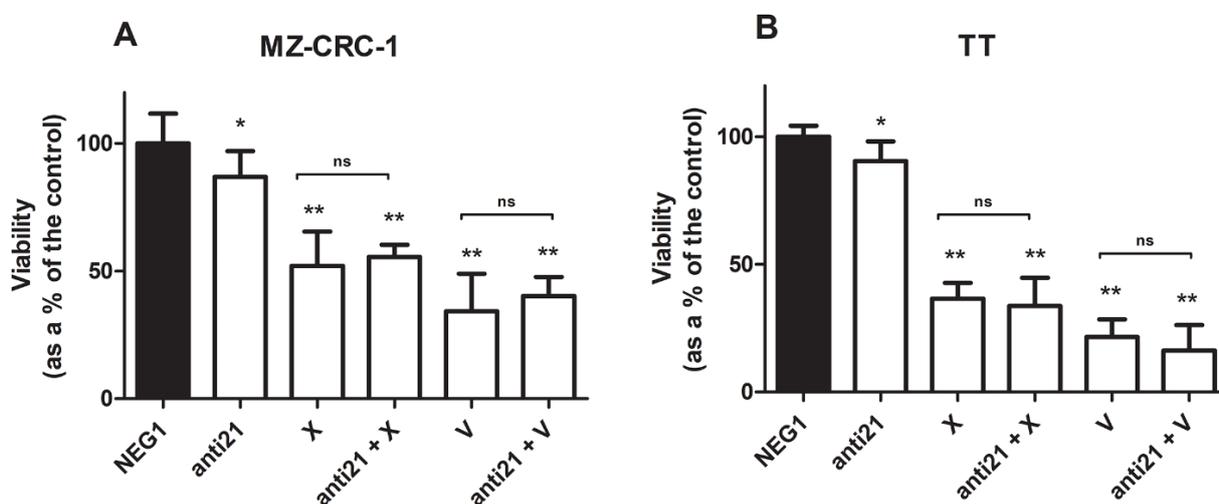


Figura 20: Test MTT per le cellule MZ-CRC-1 e TT trattate per 48 ore. (A) Test MTT per le cellule MZ-CRC-1; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib 1,4 μ M; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib 1,4 μ M; V = Vandetanib: 10 μ M; V + anti21 = anti-miR-21 combinato con Vandetanib 10 μ M). (B) Test MTT per le cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib 9,7 μ M; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib 9,7 μ M; V = Vandetanib: 10 μ M; V + anti21 = anti-miR-21 combinato con Vandetanib 10 μ M). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ Trattamento vs. controllo (se non diversamente indicato).

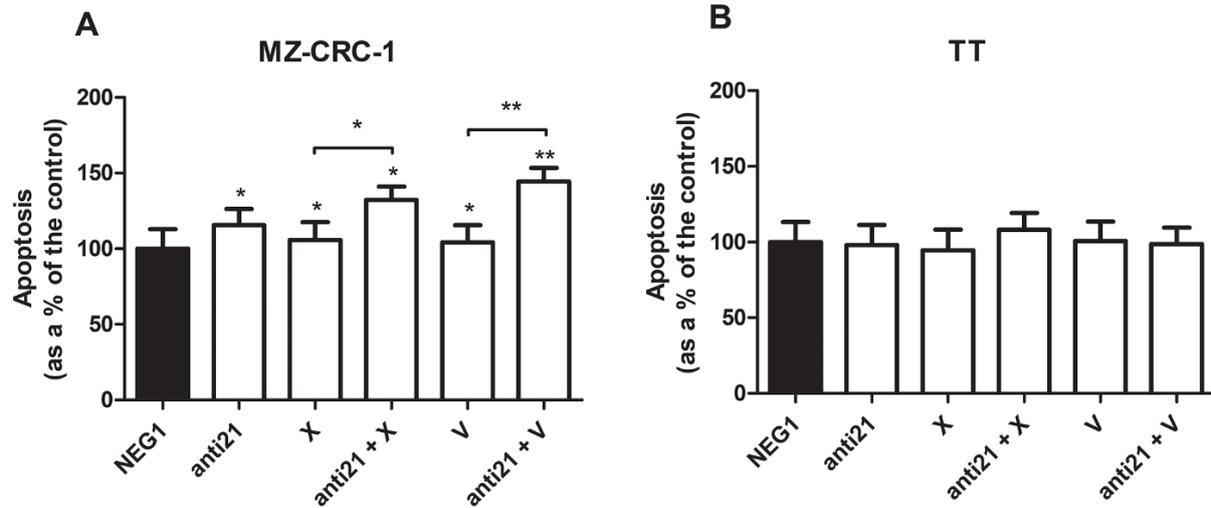


Figura 21: Istogramma rappresentante la percentuale di apoptosi rilevato mediante test delle caspasi. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ Trattamento vs. controllo (se non diversamente indicato).

Analisi del ciclo cellulare

Abbiamo utilizzato la citometria a flusso per analizzare la distribuzione del ciclo cellulare nelle cellule trattate (Figura 22 e Figura 23). In MZ-CRC-1, la percentuale di cellule nella fase G0/G1 era del 76,9%. Il trattamento con anti-miR-21 non è riuscito ad aumentare questa percentuale (77,3%), mentre Cabozantinib e Vandetanib l'hanno incrementata rispettivamente al 95,7% e al 94,9% ($p < 0,001$). La combinazione di uno dei due farmaci con anti-miR-21 non ha aumentato queste percentuali. Nella linea cellulare TT, la percentuale di cellule nella fase G0/G1 era dell'87,8%. Anche qui, il trattamento con anti-miR-21 non ha fatto differenza (86,4%), mentre Cabozantinib e Vandetanib sono riusciti ad aumentare questa percentuale rispettivamente al 98,0% e al 98,7% ($p < 0,001$). Combinare anti-miR-21 ai farmaci non ha aggiunto effetti rispetto al loro utilizzo da soli.

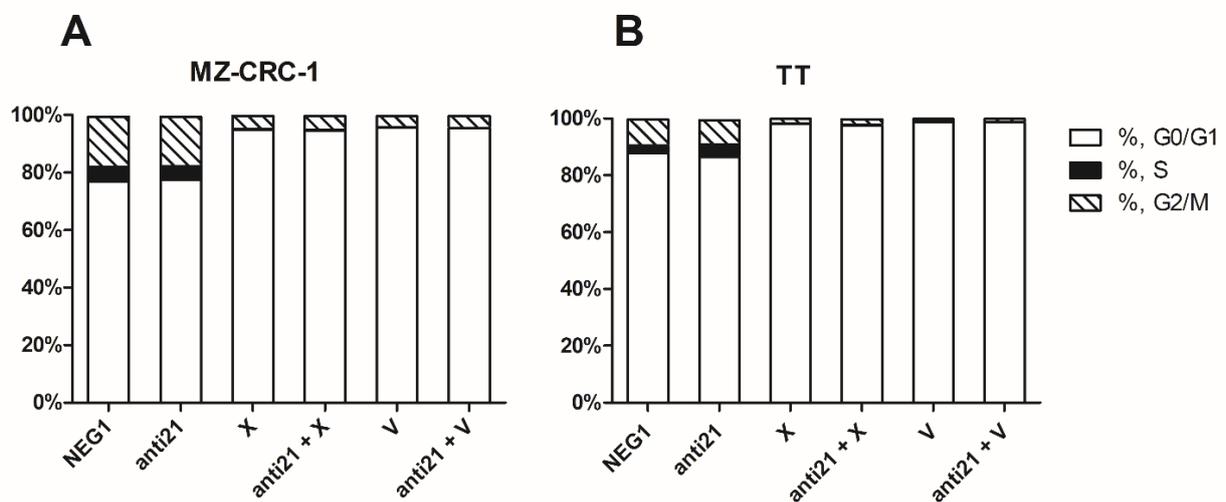


Figura 22: Effetti sul ciclo cellulare. (A) Cellule MZ-CRC-1; (B) Cellule TT; (NEG1 = Negative Control#1; anti21 = anti-miR-21; X = Cabozantinib; anti21 + X = anti-miR-21 combinato con Cabozantinib; V = Vandetanib; anti21 + V = anti-miR-21 combinato con Vandetanib). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte.

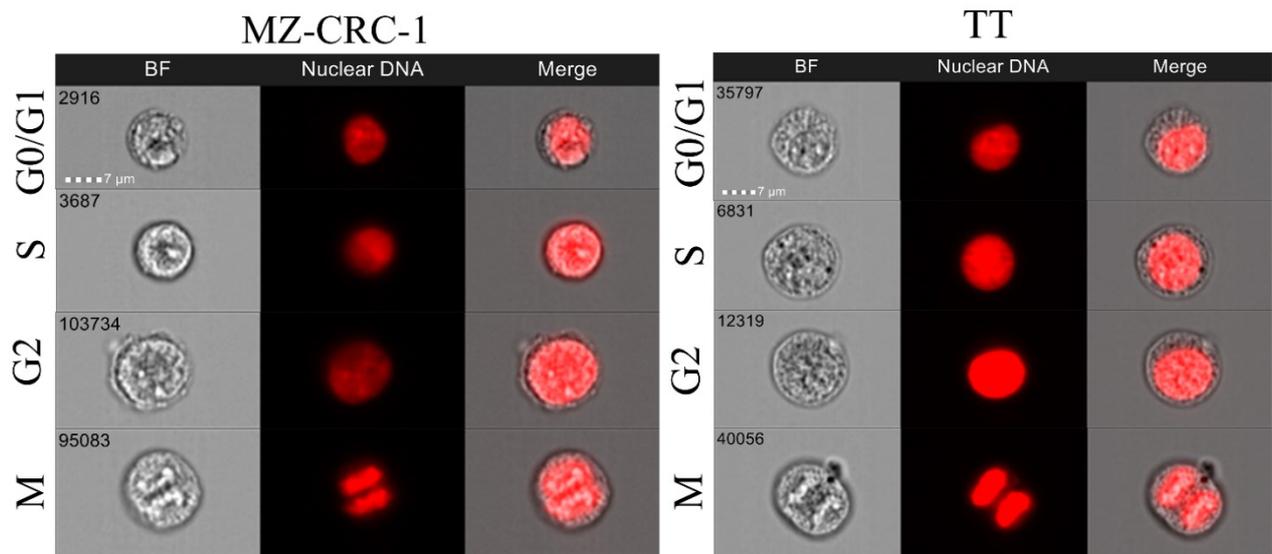


Figura 23: Immagini rappresentative dell'analisi ImageStreamX.

Discussione

Il focus del presente studio è stato investigare il possibile ruolo di miR-21 come bersaglio terapeutico nel carcinoma midollare della tiroide (MTC), da solo o in combinazione con un inibitore della tirosin-chinasi (TKI), attraverso una serie di esperimenti condotti su linee cellulari di MTC.

Ci siamo chiesti se i promettenti risultati precedentemente ottenuti nelle linee cellulari di MTC utilizzando l'analogo della curcumina EF-24, che ha rivelato un effetto sinergico quando somministrato insieme al Cabozantinib, potessero essere ottenuti anche silenziando direttamente miR-21, un bersaglio riconosciuto della curcumina [25]. Per la prima volta nella letteratura, abbiamo dimostrato in vitro che il trattamento con EF-24 riduce efficacemente i livelli di espressione di miR-21 nelle cellule di MTC. Successivamente, abbiamo studiato direttamente miR-21 con un trattamento anti-miR-21 e ne abbiamo analizzato gli effetti. A nostra conoscenza, questa è la prima descrizione di silenziamento in vitro di miR-21 con un trattamento anti-miR-21 in colture cellulari di MTC. Il trattamento anti-miR-21 è stato efficace nel ridurre la vitalità delle cellule sia di MZ-CRC-1 che di TT, sebbene in misura minore rispetto ai TKI, con un effetto leggermente più pronunciato sulla prima linea cellulare. La combinazione di anti-miR-21 con i due farmaci non ha incrementato il loro effetto. Questo risultato è in contrasto con i risultati ottenuti utilizzando l'analogo della curcumina EF-24, che ha potenziato l'effetto dei TKI sulla vitalità cellulare [25]. Possiamo quindi presumere che l'effetto sinergico di EF-24 in combinazione con un TKI non derivi dall'inibizione del suo bersaglio miR-21. Abbiamo inoltre dimostrato in vitro, per la prima volta, l'associazione tra miR-21 e PDCD4 in MTC, come suggerito dal nostro precedente lavoro, a livello di tessuto [18]. Silenziando miR-21, abbiamo indotto un aumento dei livelli dell'onco-soppressore PDCD4 nelle linee cellulari di MTC, come dimostrato direttamente da altri gruppi di ricerca nelle linee cellulari di cancro al seno [37] e nella fibrosi sottomucosa orale [38]. Inaspettatamente, abbiamo anche dimostrato che Cabozantinib e Vandetanib possono influenzare i livelli di espressione di PDCD4. L'aggiunta di anti-miR-21 non ha potenziato l'effetto dei TKI sui livelli proteici di PDCD4 a 24 ore. Ciò significa che sia l'anti-miR-21 che i TKI possono aumentare i livelli proteici dell'onco-soppressore PDCD4, ma senza alcun effetto aggiuntivo; quindi, i meccanismi alla base del loro effetto sono probabilmente diversi. PDCD4 è un bersaglio ben riconosciuto di miR-21, e l'effetto dell'anti-miR-21 è diretto sul suo processo trascrizionale. L'effetto dei TKI è meno specifico in quanto hanno recettori TKI diversi che agiscono su diverse vie. A differenza dell'analogo della curcumina EF-24 [25], l'anti-miR-21 ha avuto un effetto limitato sui livelli di fosforilazione di Akt o ERK nelle nostre cellule di MTC. Ciò suggerirebbe che l'effetto di miR-21 sulla vitalità cellulare non coinvolga le proteine chiave che

agiscono lungo la via MAPK; quindi, l'effetto di EF-24 su queste proteine potrebbe non coinvolgere il bersaglio di miR-21.

Il trattamento con TKI è stato in grado di ridurre l'espressione di mRNA di CT e i livelli di CT nel mezzo di coltura. Lo stesso effetto è stato osservato dopo il trattamento con l'anti-miR-21, sebbene in misura minore. Questi risultati sono interessanti perché il gene CT non è un bersaglio diretto riconosciuto di miR-21 e non si sa che i TKI influenzino la produzione e la secrezione di CT da parte delle cellule C. Va notato che le concentrazioni di CT sono state normalizzate al numero di cellule nel mezzo di coltura, indicando che la riduzione delle concentrazioni di CT è dovuta non alla morte cellulare, ma a una minore trascrizione e secrezione. L'esito dell'effetto dell'anti-miR-21 e dei TKI sulla secrezione di CT è un'interferenza con la sua attività, sebbene il meccanismo sottostante rimanga da chiarire. Possiamo solo ipotizzare che coinvolga la regolazione di altri intermedi, ancora sconosciuti.

Coerentemente con i nostri risultati sulla vitalità cellulare, il trattamento con l'anti-miR-21 ha ridotto la migrazione cellulare nei nostri esperimenti di riparazione delle ferite, come dimostrato da Tao et al.[37]. Nella linea cellulare MZ-CRC-1 (ma non nella linea TT), l'aggiunta di anti-miR-21 al Vandetanib ha anche potenziato l'effetto del farmaco sulla migrazione cellulare. Non abbiamo osservato alcun effetto dell'anti-miR-21 (da solo o in combinazione con un TKI) sul tasso di apoptosi nelle linee cellulari TT. Nella linea MZ-CRC-1, d'altra parte, il trattamento con l'anti-miR-21 ha aumentato il tasso di apoptosi e migliorato notevolmente l'effetto di entrambi i TKI sull'apoptosi cellulare. I nostri risultati sulla migrazione e sull'apoptosi suggeriscono che il trattamento con l'anti-miR-21 sia più efficace nella linea cellulare MZ-CRC-1 rispetto alle linee cellulari TT, sebbene questa differenza possa essere in parte spiegata dalla maggiore velocità di replicazione della linea MZ-CRC-1, associata all'alto rischio di mutazione portato dalla linea cellulare MZ-CRC-1 (M918T).

L'anti-miR-21 agisce aumentando l'apoptosi cellulare anziché regolare il ciclo cellulare, come dimostrato dall'assenza di qualsiasi cambiamento nella proporzione di cellule in G0/G1 dopo il trattamento con l'anti-miR-21 e dalla mancanza di un effetto additivo sul ciclo cellulare quando l'anti-miR-21 è stato combinato con i TKI.

Nel nostro studio, abbiamo utilizzato un sistema di silenziamento basato su lipofectamine, che è un vettore chimico comunemente utilizzato per la somministrazione di siRNA e anti-miRNA ed è stato dimostrato essere affidabile [39]. Tuttavia, questo metodo ha delle limitazioni, una delle quali è che il trattamento di silenziamento è transitorio. Ciò significa che, man mano che le cellule si dividono nel tempo, la quantità originale di anti-miRNA viene gradualmente diluita, riducendo la sua efficacia. Sebbene il lento tasso di proliferazione cellulare delle linee cellulari MTC utilizzate possa

compensare in parte questa limitazione, la durata e la complessità dei trattamenti potrebbero comunque essere un punto debole del nostro studio.

Conclusioni

In conclusione, i nostri risultati in vitro suggeriscono che il trattamento con l'anti-miR-21 potrebbe ridurre efficacemente la vitalità cellulare e la migrazione cellulare, in particolare nelle cellule MTC che ospitano la mutazione M918T, aumentando l'apoptosi cellulare. Tuttavia, quando l'anti-miR-21 è stato aggiunto ai TKI, non ha dimostrato alcun effetto benefico su nessuna di queste azioni del farmaco, ad eccezione dell'aumento dell'apoptosi e della migrazione cellulare quando è stato aggiunto al Vandetanib per trattare la linea cellulare MZ-CRC-1. Il trattamento con l'anti-miR-21 da solo ha avuto un impatto sui livelli di proteina PDCD4 e sulla secrezione di CT, ma la sua combinazione con i TKI non ha influenzato l'effetto di quest'ultimi. Inoltre, l'anti-miR-21 non ha avuto influenza sullo stato di fosforilazione delle proteine chiave lungo la via MAPK o sul ciclo cellulare nelle linee cellulari MTC. I nostri dati preliminari confermano che l'azione dell'anti-miR-21 è molto specifica. L'uso potenziale degli anti-miRNA come approccio terapeutico nei tumori umani è ancora un'area di ricerca relativamente nuova e inesplorata, in particolare nei tumori della tiroide. Ciò è dovuto in parte a questioni irrisolte legate alle strategie di somministrazione di terapie a base di RNA nei tumori umani e alla possibilità di effetti non specifici derivanti dalla complessità delle interazioni geniche dei microRNA [40]. Consideriamo che, in attesa di ulteriori studi, l'anti-miR-21 potrebbe essere utile nel trattamento del MTC in combinazione con farmaci diversi dai TKI per ridurre le dosi efficaci e il conseguente carico degli effetti collaterali.

Bibliografia

- [1] Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: Bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* 2000;81:405–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00176.x>.
- [2] Randle RW, Balentine CJ, Levenson GE, Havlena JA, Sippel RS, Schneider DF, et al. Trends in the presentation, treatment, and survival of patients with medullary thyroid cancer over the past 30 years. *Surgery (United States)*, vol. 161, Mosby Inc.; 2017, p. 137–46. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.04.053>.
- [3] Wells SA, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2015;25:567–610. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0335>.
- [4] Thein KZ, Velcheti V, Mooers BHM, Wu J, Subbiah V. Precision therapy for RET-altered cancers with RET inhibitors 2021. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.07.003>.
- [5] Ciampi R, Romei C, Ramone T, Prete A, Tacito A, Cappagli V, et al. Genetic Landscape of Somatic Mutations in a Large Cohort of Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas Studied by Next-Generation Targeted Sequencing. *IScience* 2019;20:324–36. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.030>.
- [6] Romei C, Casella F, Tacito A, Bottici V, Valerio L, Viola D, et al. New insights in the molecular signature of advanced medullary thyroid cancer: evidence of a bad outcome of cases with double RET mutations. *Journal of Medical Genetics* 2016;53:729–34. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2016-103833>.
- [7] Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, Brubaker JD, Kim JL, Maynard M, et al. Precision targeted therapy with BLU-667 for RET-driven cancers. *Cancer Discovery* 2018;8:836–49. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0338>.
- [8] Ji JH, Oh YL, Hong M, Yun JW, Lee HW, Kim DG, et al. Identification of Driving ALK Fusion Genes and Genomic Landscape of Medullary Thyroid Cancer. *PLoS Genetics* 2015;11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005467>.
- [9] Esfandiari NH, Hughes DT, Yin H, Banerjee M, Haymart MR. The Effect of Extent of Surgery and Number of Lymph Node Metastases on Overall Survival in Patients with Medullary Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014;99:448–54. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2942>.
- [10] Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, Schöffski P, Brose MS, Shah MH, et al. Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:3639–46.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.4659>.

- [11] Ceolin L, Da Silveira Duval MA, Benini AF, Ferreira CV, Maia AL. Medullary thyroid carcinoma beyond surgery: advances, challenges, and perspectives. *Endocrine-Related Cancer* 2019;26:R499–518. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0574>.
- [12] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2009;10:704–14. <https://doi.org/10.1038/NRG2634>.
- [13] Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocrine-Related Cancer* 2010;17. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0217>.
- [14] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008;93:1600–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2696>.
- [15] Abraham D, Jackson N, Gundara JS, Zhao JT, Gill AJ, Delbridge L, et al. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:4772–81. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0242>.
- [16] Pennelli G, Mian C, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, et al. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: Preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid* 2012;22:890–6. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0045>.
- [17] Galuppini F, Bertazza L, Barollo S, Cavedon E, Ruge M, Guzzardo V, et al. MiR-375 and YAP1 expression profiling in medullary thyroid carcinoma and their correlation with clinical–pathological features and outcome. *Virchows Archiv* 2017;471:651–8. <https://doi.org/10.1007/S00428-017-2227-7/FIGURES/5>.
- [18] Pennelli G, Galuppini F, Barollo S, Cavedon E, Bertazza L, Fassan M, et al. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma. *Human Pathology* 2015;46:50–7. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2014.09.006>.
- [19] Yang CH, Yue J, Sims M, Pfeffer LM. The Curcumin Analog EF24 Targets NF- κ B and miRNA-21, and Has Potent Anticancer Activity In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 2013;8:e71130. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0071130>.
- [20] Zhou X, Ren Y, Liu A, Han L, Zhang K, Li S, et al. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo.

Oncology Reports 2014;31:2173–80. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3114>.

- [21] Ren W, Wang X, Gao L, Li S, Yan X, Zhang J, et al. MiR-21 modulates chemosensitivity of tongue squamous cell carcinoma cells to cisplatin by targeting PDCD4. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014;390:253–62. <https://doi.org/10.1007/S11010-014-1976-8/FIGURES/11>.
- [22] Paik WH, Kim HR, Park JK, Song BJ, Lee SH, Hwang JH. Chemosensitivity induced by down-regulation of microRNA-21 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by indole-3-carbinol. *Anticancer Research* 2013;33:1473–82.
- [23] Ohishi T, Hayakawa S, Miyoshi N. Involvement of microRNA modifications in anticancer effects of major polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2022:1–32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2038540>.
- [24] Zhang H, Zheng J, Shen H, Huang Y, Liu T, Xi H, et al. Curcumin Suppresses In Vitro Proliferation and Invasion of Human Prostate Cancer Stem Cells by Modulating DLK1-DIO3 Imprinted Gene Cluster MicroRNAs. <https://HomeLiebertpubCom/Gtmb> 2018;22:43–50. <https://doi.org/10.1089/GTMB.2017.0179>.
- [25] Bertazza L, Sensi F, Cavedon E, Watutantrige-Fernando S, Censi S, Manso J, et al. EF24 (a Curcumin Analog) and ZSTK474 Emphasize the Effect of Cabozantinib in Medullary Thyroid Cancer. *Endocrinology* 2018;159:2348–60. <https://doi.org/10.1210/EN.2018-00124>.
- [26] Barollo S, Bertazza L, Baldini E, Ulisse S, Cavedon E, Boscaro M, et al. The combination of RAF265, SB590885, ZSTK474 on thyroid cancer cell lines deeply impact on proliferation and MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Investigational New Drugs* 2014;32:626–35. <https://doi.org/10.1007/S10637-014-0108-3>.
- [27] Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols* 2010;5. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT5439>.
- [28] Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, et al. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake. *Clinical Endocrinology* 2008;68:108–16. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2265.2007.03008.X>.
- [29] Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2021;49:800–12. <https://doi.org/10.1002/BMB.21552>.
- [30] Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 2015;439:231–50. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>.
- [31] Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods in Molecular Biology* 2017;1601:1–17.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1/FIGURES/6.

- [32] Martinotti S, Ranzato E. Scratch wound healing assay. *Methods in Molecular Biology* 2020;2109:225–9. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259/COVER.
- [33] Rieger AM. Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis: An Overview. *Methods in Molecular Biology* 2022;2579:47–57. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_4/FIGURES/1.
- [34] Wang Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods in Molecular Biology* 2022;2579:3–23. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1/FIGURES/4.
- [35] Maadi H, Soheilifar MH, Wang Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology* 2022;2579:183–95. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_14/FIGURES/9.
- [36] Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007;35:495. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [37] Tao L, Wu YQ, Zhang SP. MiR-21-5p enhances the progression and paclitaxel resistance in drug-resistant breast cancer cell lines by targeting PDCD4. *Neoplasma* 2019;66:746–55. https://doi.org/10.4149/NEO_2018_181207N930.
- [38] Liao YW, Tsai LL, Lee YH, Hsieh PL, Yu CC, Lu MY. miR-21 promotes the fibrotic properties in oral mucosa through targeting PDCD4. *Journal of Dental Sciences* 2022;17:677–82. <https://doi.org/10.1016/J.JDS.2021.09.004>.
- [39] Chang H, Yi B, Ma R, Zhang X, Zhao H, Xi Y. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 2016;6:1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22312>.
- [40] Smith ES, Whitty E, Yoo B, Moore A, Sempere LF, Medarova Z. Clinical Applications of Short Non-Coding RNA-Based Therapies in the Era of Precision Medicine. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 1588 2022;14:1588. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14061588>.