



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA ED ODONTOIATRIA

Dottorato di Ricerca in

“TECNOLOGIE BIOMEDICHE INNOVATIVE IN MEDICINA CLINICA”

XXXII CICLO

TESI DI DOTTORATO

“Il ruolo dello stress ossidativo nei tumori della tiroide, valutato attraverso la spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica e di risonanza magnetica nucleare: la nostra esperienza in chirurgia tiroidea”

Dottorando

Dott. Alessio Metere

Relatore

Prof.ssa Laura Giacomelli

Anno Accademico 2018-2019

## INTRODUZIONE

In Letteratura è ormai documentato da tempo come la sovrapproduzione di radicali liberi ed il conseguente aumento dello stress ossidativo, portino ad un danno cellulare irreversibile, frequentemente associato a malattie come l'aterosclerosi, l'ipertensione, la nefropatia diabetica, la fibrosi polmonare, il morbo di Alzheimer e non ultimo il cancro [1-9]. Proprio nei tessuti tumorali dei pazienti affetti da carcinoma tiroideo, infatti, grazie all'utilizzo di tecniche di immunoistochimica e di microarray, sono state identificate alcune modifiche chimiche della struttura del DNA, come la presenza di 8-oxo-2'-desossiguanosina, tipicamente indotte dallo stress ossidativo [10]. Inoltre, negli stessi tessuti, mediante tecniche di spettrofotometria, sono state riscontrate anche alte concentrazioni di glutatione perossidasi (un enzima antiossidante) e malondialdeide (un prodotto della perossidazione lipidica) [11], a confermare, ulteriormente, un coinvolgimento dello stress ossidativo nei tumori della tiroide. In un nostro recente studio abbiamo utilizzato la risonanza paramagnetica elettronica (EPR), per valutare qualitativamente e quantitativamente le specie ossidanti presenti nel sangue dei pazienti affetti da carcinoma tiroideo, documentando, anche noi, un aumento dello stress ossidativo [12]. Nonostante tutti questi risultati dimostrino inequivocabilmente un coinvolgimento dello stress ossidativo nei tumori della tiroide, restano ancora poco chiari i meccanismi che collegano questo al cancro della tiroide. La

produzione di radicali liberi è un processo fisiologico e la loro concentrazione all'interno dell'organismo è mantenuta a livelli non tossici, grazie alla presenza di meccanismi di difesa antiossidanti che, entro certi limiti, sono in grado di contrastare l'eccessiva presenza di radicali liberi [13]. I sistemi antiossidanti possono essere costituiti sia da vitamine come la vitamina A, C, E che da enzimi come superossido dismutasi, catalasi, tioredossina reduttasi, glutazione perossidasi e glutazione reduttasi, che spesso esplicano la loro azione antiossidante grazie alla presenza di alcuni minerali, come selenio, manganese, rame e zinco [14]. Per comprendere meglio le relazioni tra stress ossidativo e tumore della tiroide, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione proprio su alcune selenoproteine, come la glutazione perossidasi (GPxs) [15] e la tioredossina reduttasi (TrxRs) [16], che sono fortemente coinvolte nel mantenimento dell'equilibrio redox al livello intracellulare. In questo studio abbiamo valutato l'espressione delle selenoproteine GPx1 e TrxR1, nel tessuto tumorale della tiroide e nel tessuto tiroideo sano, per verificare se vi fosse un'eventuale alterazione dei sistemi antiossidanti nel carcinoma tiroideo. Successivamente, mediante la spettroscopia di risonanza paramagnetica (EPR), una tecnica estremamente sensibile, abbiamo quantificato, sempre negli stessi tessuti, la produzione di radicali liberi. La spettroscopia EPR, infatti, è la tecnica elettiva per studiare la formazione di radicali liberi in sistemi biologici ex vivo/in vitro permettendo di monitorarne la cinetica di formazione, identificarne la natura e le vie metaboliche coinvolte. Rispetto ad altre tecniche di misura dello stress ossidativo, l'EPR permette una misura diretta della specie primaria, invece che del suo effetto. I radicali stabili o prodotti ad alte concentrazioni possono essere monitorati. I radicali instabili o prodotti a basse concentrazioni

possono essere monitorati, invece, mediante la tecnica dello spin trapping, che utilizza reagenti (spin traps) in grado di reagire con i radicali formati e formare molecole più stabili, rilevabili in EPR. La parte conclusiva di questa ricerca è stata finalizzata a identificare delle eventuali modifiche del metabolismo delle cellule tumorali tiroidee, che potessero spiegare l'aumento dello stress ossidativo. Per fare questo abbiamo eseguito un'analisi metabolomica mediante Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione (HR-NMR), che ci ha permesso di valutare dal punto di vista qualitativo e quantitativo, i diversi metaboliti presenti nel tessuto tumorale tiroideo. La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, infatti, è una tecnica analitica che, tramite l'uso di campi magnetici e impulsi di radiofrequenza, è in grado di identificare, qualitativamente e/o quantitativamente, i metaboliti presenti al di sopra di una soglia basale di concentrazione compresa nell'ordine dei  $\mu\text{M}$  in cellule e tessuti.

## **MATERIALI E METODI**

### Reclutamento dei pazienti

La popolazione oggetto della ricerca è stata reclutata presso il Dipartimento di Scienze Chirurgiche

dell'Ospedale Umberto I di Roma. Lo studio ha previsto l'arruolamento di 20 pazienti (4 maschi e 16 femmine), di età compresa tra 24 e 68 anni, che presentavano uno o più noduli tiroidei, risultati TIR 3B, TIR 4 o TIR 5 all'esame citologico dopo agoaspirato, secondo la classificazione della Società Italiana di Patologia e Citopatologia Diagnostica [18]. L'agoaspirato dei noduli tiroidei sospetti (FNA) è stato eseguito solo su noduli tiroidei  $\geq 1$  cm con caratteristiche ecografiche sospette, in accordo con le raccomandazioni per l'FNA della American Thyroid Association (ATA) [17]. Considerando i risultati citologici (Tabella 1), tutti i pazienti risultavano candidati a tiroidectomia totale, secondo le linee guida ATA 2009, prese come riferimento al momento dello studio. I criteri di esclusione dallo studio sono stati la presenza di malattie debilitanti (stadio avanzato del diabete, malattie immunologiche e disturbi ematologici), mancanza di consenso informato e/o modulo di autorizzazione al trattamento dei dati personali. Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti preoperatoriamente ad elettrocardiogramma, radiografie del torace, laringoscopia indiretta. Inoltre, ogni paziente è stato sottoposto ad esami ematochimici di routine preoperatoria, comprensivi del dosaggio di TSH, FT3, FT4, calcitonina, tireoglobulina, anticorpi anti-tireoperossidasi (TPOAb) ed anti-tireoglobulina (TgAb).

## Trattamento Chirurgico

Il trattamento chirurgico è stato pianificato tenendo conto della diagnosi citologica, del coinvolgimento

dei linfonodi e della dimensione e localizzazione del nodulo sospetto (entrambi valutati attraverso l'ecografia del collo) e dell'età dei pazienti. Nei casi con diagnosi citologica di malignità (TIR4, TIR5), i pazienti sono stati sottoposti a totale tiroidectomia, secondo le linee guida ATA 2009 (raccomandazione 26). La sola lobectomia tiroidea può essere un trattamento sufficiente per tumori piccoli (<1 cm), a basso rischio, unifocali, in assenza di precedente irradiazione del collo o metastasi linfonodali cervicali radiologicamente o clinicamente evidenti, assenza di alterazioni molecolari, come suggerito dalle linee guida ATA 2009. Tuttavia, nessuno dei nostri pazienti TIR4/TIR5 era candidato a lobectomia tiroidea. Infatti, come precedentemente descritto, sono stati sottoposti a FNA ed inclusi nello studio, solo pazienti con noduli sospetti  $\geq 1$ . In tabella 1 è riportata la dimensione istologica del tumore, misurata "ex vivo" dopo tiroidectomia, che è spesso diversa dalla misura ecografica preoperatoria. Pazienti con sospetto coinvolgimento dei linfonodi cervicali del compartimento centrale (livello VI/VII), sono stati sottoposti a tiroidectomia totale con linfadenectomia del VI/VII livello (Tabella 1, casi 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20). I pazienti con sospetto coinvolgimento dei linfonodi laterocervicali del II, III e IV livello (riscontrato preoperatoriamente all'ecografia) sono stati sottoposti a linfadenectomia dei livelli sospetti (Tabella 1, casi: 15, 17, 19, 20; ATA 2009, raccomandazione 27). Pazienti 3, 6, 7 e 16, con noduli indeterminati (TIR3B), hanno preferito la tiroidectomia totale, per evitare la possibilità di richiedere un reintervento chirurgico sul lobo controlaterale, come previsto da ATA 2009 (raccomandazione 25b).

## Prodotti chimici e strumentazione

L'anticorpo policlonale anti-glutathione perossidasi (GPx1) e l'anticorpo policlonale anti-tioredoxina riduttasi 1 (TrxR1) sono stati acquistati da Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA), l'anticorpo monoclonale anti-actina da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), l'anticorpo anti-mouse coniugato con perossidasi e l'anticorpo anti-goat coniugato con perossidasi da Amersham (Arlington Heights, Illinois, USA). La nitrocellulosa per eseguire il western blotting (WB) è stata ottenuta da Schleicher & Schuell Bioscience Inc. (Dassel, Germania). Il kit di chemiluminescenza (kit ECL) e il kit di dosaggio proteico BCA sono stati acquistati da Pierce (Rockford, Illinois, USA). Le analisi densitometriche delle seleno-proteine sono state eseguite utilizzando il densitometro GS-900 (Bio-Rad) e il software ImageJ. Lo spin-trap 1-idrossi-3-carbossi-pirrolidina (CPH) e 3-carbossi-proxil radicali (CP•) sono stati acquistati da ENZO Biochem (Laufelfingen, Svizzera).

## Campionamento del tessuto tiroideo per l'analisi delle selenoproteine

Dopo la tiroidectomia totale è stato eseguito l'esame istologico dell'intera ghiandola tiroidea e sono stati prelevati alcuni campioni di tessuto tiroideo sia dal tumore che dal lobo controlaterale sano, su cui valutare l'espressione delle selenoproteine, GPx1 e TrxR1, la produzione dei radicali liberi con EPR e

l'analisi metabolomica con HR-NMR. Tutti i tessuti sono stati conservati a -80° C fino al momento del loro utilizzo per le analisi.

## Estrazione dei metaboliti tissutali per analisi mediante WB ed EPR

Per ottenere un lisato proteico su cui studiare l'espressione delle proteine GPx1 e TrxR1, ciascun campione di tessuto tiroideo è stato sospeso in 200 µl di PBS, incubato per 10 minuti a 0° C con un volume uguale di 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,6 M NaCl, 4% (p/v) Triton X-100, 4% (v/v) sodio desossicolato, 0,4 mM PMSF, 1 µg/mL di leupeptina e 1 µg/mL di aprotinina (tampone 4X RIPA), diluito con PBS e portato ad un volume finale di 1 mL con buffer RIPA 1X. Dopo centrifugazione a 16000 g per 30 minuti a 4° C, il surnatante, costituito dal lisato del tessuto tiroideo, è stato raccolto ed il contenuto proteico dosato, utilizzando il kit Pierce BCA, per ottenere una pari quantità di proteine in ciascun campione.

## Analisi WB

I campioni preparati per l'analisi WB sono stati solubilizzati in un tampone di caricamento con sodiododecilsolfato, portati a 100° C per 5 minuti e caricati su gel di poliacrilammide per l'elettroforesi



proteica. Le proteine così separate, sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa, poi lavati con TBS contenente 0,05% di Tween 20 (TTBS) e successivamente trattati con albumina di siero bovino al 3% in TTBS per 2 ore. I filtri di nitrocellulosa così preparati, sono stati incubati durante la notte a 4° C con l'anticorpo anti-GPX1 o anti-TrxR1. Dopo ampi lavaggi nel TTBS, le bande immunoreattive sono state rilevate dalla chemiluminescenza accoppiata all'attività della perossidasi, (secondo le specifiche del produttore, kit ECL; Pierce), ottenendo così un'immagine delle bande, che ci permettesse di eseguire un'analisi qualitativa e semiquantitativa (analisi densitometrica).

### Analisi densitometrica delle seleno-proteine GPx1 e TrxR1

Al fine di misurare i livelli di espressione di GPx1 e TrxR1, sono state misurate le intensità delle bande specifiche, corrispondenti alle seleno-proteine di interesse. L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata utilizzando il software Image J [19]. In breve, le immagini delle bande corrispondenti a GPx1 e TrxR1, sono state importate nel computer e tramite il software è stato regolato il contrasto, in modo tale che le bande fossero chiaramente visibili. È stata selezionata l'area intorno a ciascuna banda e l'intensità dello sfondo è stata sottratta dall'immagine della macchia. Le intensità delle bande selezionate sono state quindi espresse come valore numerico (unità arbitraria, a.u.), utilizzato successivamente per l'analisi statistica.

## Analisi mediante spettroscopia EPR del tessuto tiroideo

I radicali sono specie estremamente reattive, con un'emivita di solito inferiore a 1 msec e difficilmente rilevabili con la sola tecnica EPR diretta. Questa limitazione è stata superata combinando la tecnica EPR con degli spintraps. La tecnica consiste nell'aggiungere nel sistema oggetto di studio, un composto organico (nel nostro caso il CPH), in grado di reagire con i radicali presenti. Il prodotto di reazione è un radicale nitrico (CP•), molto più stabile e quindi con una durata maggiore rispetto al primo radicale e facilmente rilevabile con la tecnica EPR [20]. Gli spettri sono stati ottenuti mediante uno spettrometro Bruker ECS 106 dotato di un'unità a temperatura variabile (ER4111VT). I campioni sono stati raccolti in un tubo di teflon permeabile al gas con diametro interno di 0,81 mm e spessore della parete di 0,05 mm (Zeuss Industrial Products, Raritan, NJ, USA). Il tubo di teflon è stato piegato quattro volte, inserito in un tubo di quarzo aperto e fissato alla cavità ESR (4108 TMH) a 37° C. Le condizioni dello spettrometro comuni a tutti gli spettri erano la frequenza di modulazione, 100 kHz; la frequenza delle microonde, 9,4 GHz; la potenza microonde, 20 mW.

Estrazione dei metaboliti tissutali per l'analisi metabolomica mediante HR-NMR

I campioni di tessuto sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'estrazione dei metaboliti. L'estratto acquoso ( $>50\text{ mg}$  di campione) viene ottenuto aggiungendo etanolo/acqua in rapporto (70/30, v/v) ai campioni di tessuto. È stato provato che questo metodo ha la stessa efficienza del più comune estratto perclorico, con il vantaggio aggiuntivo di una più semplice procedura sperimentale (Iorio et al., cancer research, 2005). I campioni, successivamente, vengono ultrasoniciati a 20 KHz con punta esponenziale,  $8\ \mu\text{m}$  picco-picco con disintegratore ultrasonico MK2 e centrifugati a 14000 g per 30 minuti. Il supernatante viene poi liofilizzato 2 volte in un liofilizzatore Savant RTV 4104 e il residuo risospeso in 0.7 mL di acqua deuterata (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenente 0.1 mmol/L di TSP come standard interno.

## Analisi metabolomica mediante spettroscopia HR-NMR del tessuto tiroideo

Tutti gli esperimenti NMR sono stati condotti a 9,4 T utilizzando come apparecchiatura uno spettrometro Bruker AVANCE, Karlsruhe, Germania. Gli spettri di protone ( $^1\text{H}$  NMR) degli estratti tissutali sono stati ottenuti usando un impulso con presaturazione del segnale dell'acqua (sequenze a singolo impulso di  $60^{\circ}$  preceduto da 2,5 secondi di presaturazione; tempo di acquisizione 1,86 secondi, finestra spettrale 11 ppm, punti nel dominio del tempo (TD) 32000, 128 scansioni). La quantificazione assoluta della concentrazione dei metaboliti è stata ottenuta misurando le aree dei segnali, moltiplicate per opportuni

fattori di correzione, determinati a loro volta da esperimenti all'equilibrio della magnetizzazione (impulso a 90°, con intervallo tra gli impulsi di 40 secondi).

## Analisi qualitativa dei metaboliti mediante spettroscopia HR-NMR

Attraverso il programma XWIN-NMR si è provveduto a identificare qualitativamente i diversi metaboliti presenti nei campioni cellulari presi in esame. Per questa procedura si è fatto riferimento ai database pubblicati sul sito Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) e agli assegnamenti presenti nell'articolo pubblicato nel 2017 da *Kostidis et al.* È stata eseguita in questo caso un'analisi ad ampio spettro tenendo in considerazione metaboliti coinvolti in diversi pathway come per esempio il pathway degli aromatici, dei nucleotidi, glicolitico prestando particolare attenzione ai cambiamenti riscontrati a livello della banda colinica.

## Analisi statistica

Tutti i dati sono stati espressi come media ( $\pm$  DS) di almeno 3 misurazioni e analizzati utilizzando il test t Student o ANOVA bidirezionale e post-test Bonferroni con il software statistico Graph Pad Prism 5.0.

## **RISULTATI**

### Trattamento chirurgico ed esito

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia totale senza linfadenectomia cervicale profilattica.

La linfadenectomia è stata eseguita, in caso di sospetto coinvolgimento linfonodale riscontrato all'ecografia preoperatoria, come precedentemente spiegato. Per tutti i pazienti il decorso postoperatorio è stato privo di complicanze e la dimissione è avvenuta in terza giornata post-operatoria.

### Classificazione istologica e stadiazione

I risultati ottenuti dall'esame istologico hanno mostrato che tutti i pazienti arruolati per lo studio erano affetti da carcinoma papillare della tiroide. Il carcinoma papillare della tiroide si è presentato come variante classica in 14 pazienti (4 di questi presentavano un carcinoma multifocale) e come variante follicolare in altri 6 pazienti. Metastasi nei linfonodi laterocervicali sono state trovate in 8 pazienti, mentre 15 pazienti hanno presentato metastasi cervicali centrali. La scheda 1 riassume la classificazione

istologica e la stadiazione.

<b>CASE</b>	<b>FNAC</b>	<b>HYSTOLOGICAL DIAGNOSIS</b>	<b>VARIANT</b>	<b>SIZE (CM)</b>	<b>SURGICAL APPROACH</b>	<b>STAGING</b>
1	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	0.7	TT	pT1a
2	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	0.6 - 0.4	TT and VI/VII LEVEL	pT1am pN0
3	THY3B	PAPILLARY	FOLLICULAR	1.5	TT	pT1b
4	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	0.8	TT and VI/VII LEVEL	pT1a pN0
5	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	1.4	TT and VI/VII LEVEL	pT1b pN0
6	THY3B	PAPILLARY	FOLLICULAR	1.2	TT	pT1b
7	THY3B	PAPILLARY	FOLLICULAR	1.5	TT	pT1b
8	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	1.7	TT and VI/VII LEVEL	pT1b pN1a
9	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	2.5 – 1.5	TT and VI/VII LEVEL	pT2m pN1a
10	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	1.5 – 0.9	TT and VI/VII LEVEL	pT1bm pN1a

11	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	0.8	TT and VI/VII LEVEL	pT1a pN0
12	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	1.8	TT and VI/VII LEVEL	pT1b pN1a
13	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	2.8	TT and VI/VII LEVEL	pT2 pN1a
14	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	1.4	TT and VI/VII LEVEL	pT1b pN1a
15	THY4	PAPILLARY	CLASSICAL	1.6	TT and II,III,IV,VI,VII LEVEL	pT1b pN1a
16	THY3B	PAPILLARY	FOLLICULAR	1.1	TT	pT1b
17	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	2.1	TT and II,III,IV,VI,VII LEVEL	pT2 pN1b
18	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	0.7	TT and VI,VII LEVEL	pT1a pN0
19	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	2.8 – 1.2	TT and II,III,IV,VI,VII LEVEL	pT2m pN1b
20	THY5	PAPILLARY	CLASSICAL	1.3	TT and II,III,IV,VI,VII LEVEL	pT1a pN1b

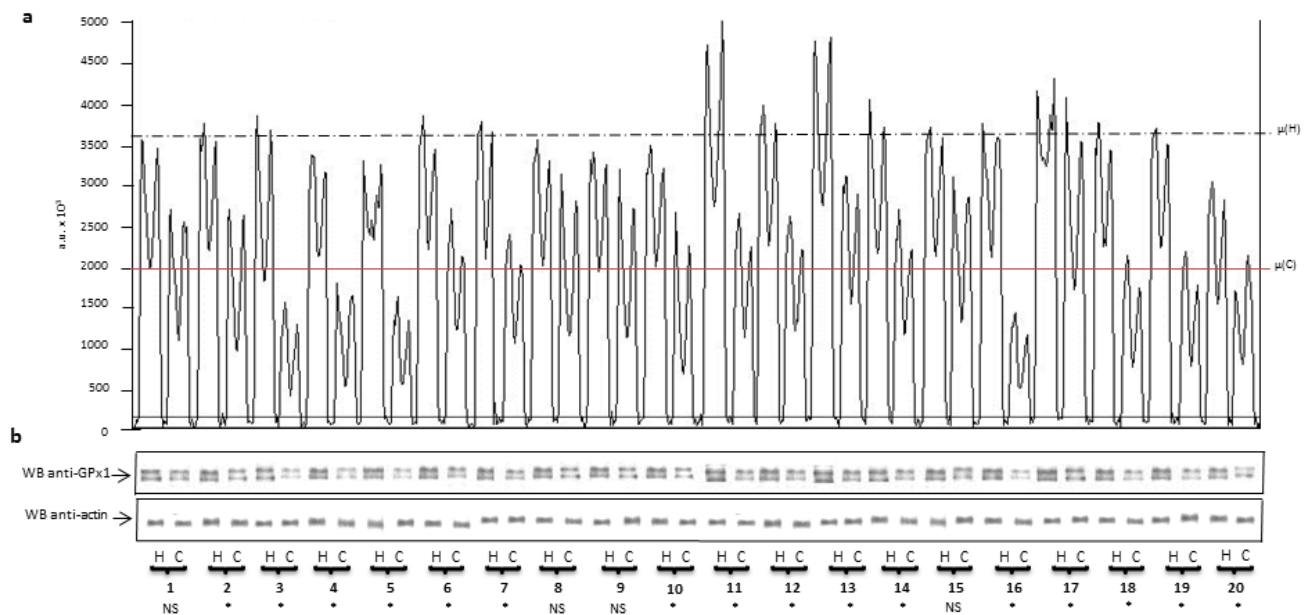
**Tabella 1.** Classificazione dei pazienti, tenendo conto della diagnosi citologica preoperatoria (diagnosi FNA), della diagnosi post-operatoria (diagnosi istologica, variante e dimensione del tumore),

dell'approccio chirurgico e della stadiazione (secondo AJCC 2009, 7a edizione). TT indica la tiroidectomia totale, mentre i numeri romani indicano la posizione dei linfonodi nel collo.

## Valutazione dell'espressione GPx1 e TrxR1 nel tessuto tiroideo

La separazione delle proteine totali del tessuto tiroideo di ciascun paziente è stata ottenuta mediante SDS-PAGE e la verifica del contenuto proteico è stata effettuata mediante una specifica colorazione proteica. L'espressione di GPx1 e TrxR1 è stata rilevata da anticorpi specifici, in grado di identificare selettivamente queste due proteine nel lisato proteico tiroideo. In figura 1 e 2 sono mostrati i risultati dell'analisi dopo WB, riferiti rispettivamente a GPx1 e TrxR1. Per ogni paziente è stata testata la presenza di GPx1 e TrxR1 nel tessuto tiroideo sano e nel tessuto tiroideo tumorale. Come è possibile vedere chiaramente, l'intensità delle bande rilevata dall'anticorpo anti-GPx1 nel tessuto tumorale era inferiore per tutti i pazienti, rispetto a quella rilevata nel tessuto sano (figura 1b). Risultati simili sono stati ottenuti usando l'anticorpo anti-TrxR1, in tutti i pazienti, infatti, anche in questo caso è stata evidenziata una diminuzione dell'espressione di TrxR1 nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano (figura 2). Questi risultati supportano chiaramente l'ipotesi di una compromissione del sistema antiossidante nel tessuto tumorale, che potrebbe essere alla base di un aumento dello stress ossidativo.

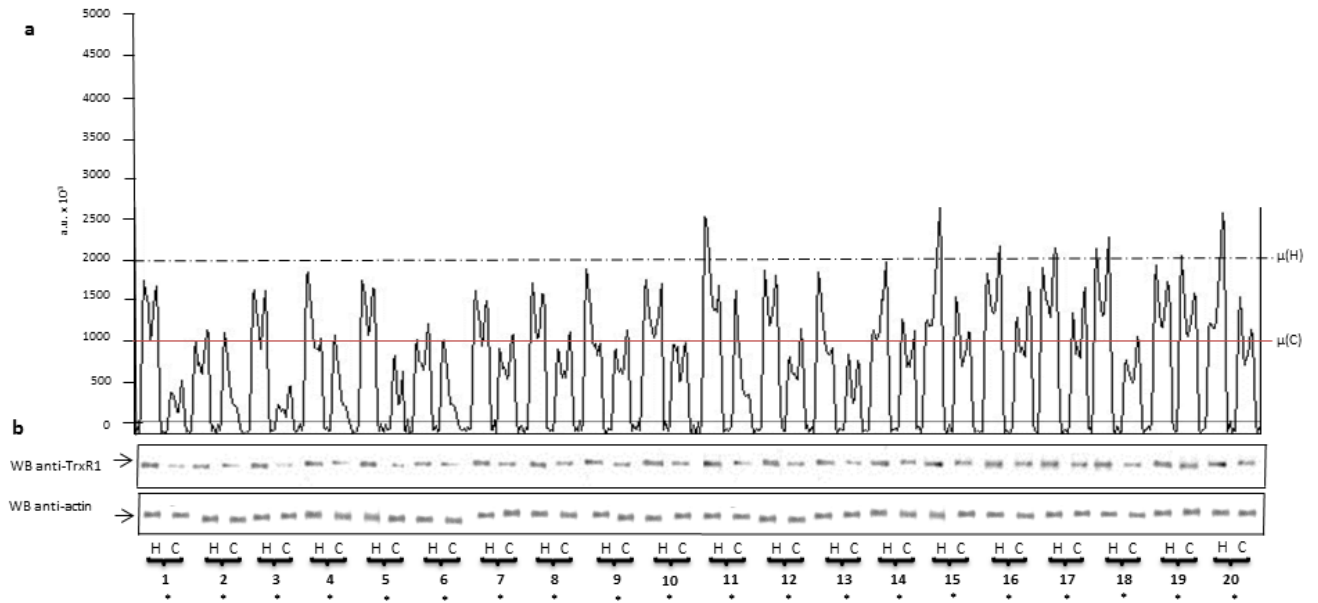




**Figura 1.** A) L'analisi densitometrica del WB rivela una significativa riduzione dell'espressione GPx1 ( $-44,4 \pm 2,8\%$ ,  $p < 0,01$ ) nel tessuto tumorale (linea rossa) rispetto al tessuto tiroideo sano (linea nera). Nessuna differenza è stata trovata nell'espressione di actina tra cancro e tessuto sano (dati non mostrati). B) Analisi WB di GPx1 ed espressione di actina nel tessuto tiroideo sano (H) e cancro. I numeri identificano

il paziente ed H (Healthy) e C (Cancer), rispettivamente il tessuto sano e tumorale. (NS = non significativo,

\* =  $p < 0,01$ ).



**Figura 2.** a) L'analisi densitometrica del WB mostra anche in questo caso una significativa riduzione dell'espressione di TrxR1 (-

$49 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,01$ ) nel tessuto tumorale (linea rossa) rispetto al tessuto tiroideo sano (linea nera). b) L'analisi WB di TrxR1 e

actina nel carcinoma tiroideo (C) e sano (H) mostra una riduzione generale di TrxR1 in C, nonostante la quantità di proteine fosse la stessa per tutti i campioni, come dimostrato dall'assenza di differenze nel contenuto di actina (NS = non significativo, \* =  $p < 0,01$ )

## Analisi densitometriche dell'espressione degli enzimi antiossidanti GPx1 e TrxR1

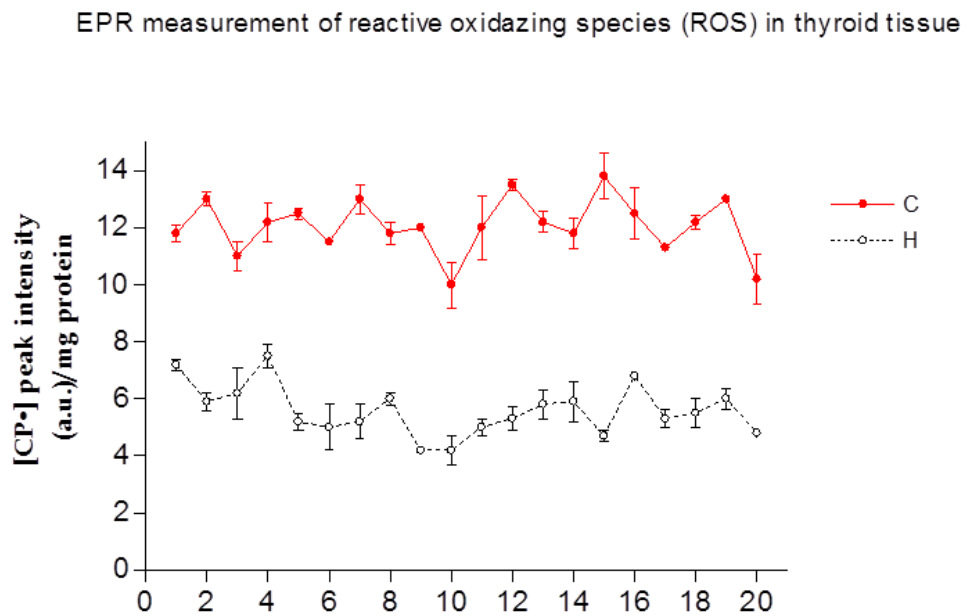
I risultati ottenuti attraverso le analisi WB hanno mostrato una riduzione dell'espressione di GPx1 e TrxR1 nel carcinoma tiroideo, dal punto di vista qualitativo, senza una reale quantificazione di questa riduzione che ci permettesse di eseguire un'analisi statistica. Per verificare la significatività di queste differenze, abbiamo deciso di effettuare delle analisi densitometriche delle bande che rappresentano GPx1 e TrxR1 nel WB, al fine di ottenere dei numeri, in forma di arbitrary unit (a.u.), da utilizzare per l'analisi statistica. Per essere sicuri che questi risultati non fossero dovuti a un diverso contenuto proteico, abbiamo deciso di normalizzare i nostri risultati rispetto all'actina, una proteina presente in tutte le cellule eucariotiche. In tutti i pazienti sottoposti a tiroidectomia totale, l'analisi densitometrica dell'espressione di GPx1 ha mostrato una significativa riduzione dei valori medi della concentrazione di questa proteina nel tessuto tumorale (linea rossa, figura 1a) che è risultata inferiore del  $44,4 \pm 2,8\%$  rispetto ai valori medi rilevati nei tessuti sani (linea nera, fig. 1a) ( $p < 0,001$ , intervallo da + 27% a -74%). Inoltre, la differenza dell'espressione GPx1 tra tessuto sano e tessuto tumorale, misurata per ciascun paziente, si è rivelata

statisticamente significativa per 16 pazienti su 20 studiati (fig. 1b). Anche i valori medi dei picchi ottenuti dall'analisi densitometrica dell'espressione di TrxR1 nel tessuto tumorale tiroideo (linea rossa, fig. 2a), sono stati significativamente più bassi di quelli misurati nei tessuti sani (linea nera, figura 2a),  $98965 \pm 103326$  vs  $1963000 \pm 91242$  au,  $p < 0,0001$ , rispettivamente. Considerando tutti i pazienti sottoposti a intervento chirurgico, l'espressione media di TrxR1 nel tessuto tumorale ha mostrato un decremento del  $49 \pm 1,2\%$  rispetto al tessuto sano ( $p < 0,001$ , intervallo da  $-3\%$  a  $-63\%$ ). Inoltre, considerando ogni singolo paziente, la differenza di espressione di TrxR1 tra tessuto sano e tessuto tumorale è stata statisticamente significativa per tutti (figura 2b).

## Produzione di radicali liberi nel carcinoma tiroideo valutata mediante spettroscopia EPR

Come precedentemente descritto [20] la tecnica di EPR-spin si è rivelata molto utile grazie alla sua capacità di rilevare i radicali liberi all'interno di alcuni tessuti umani. Per questi motivi abbiamo deciso di utilizzarla in questo studio, per valutare la produzione di radicali liberi nel tessuto tiroideo. I risultati ottenuti e mostrati in figura 3 indicano che in tutti i campioni di tessuto tumorale si è verificato un aumento significativo della produzione di radicali liberi rispetto al tessuto sano dello stesso paziente. In particolare, il valore medio rilevato nei tessuti tumorali è stato pari a  $12,07 \pm 0,97$  a.u. mentre quello

rilevato nei tessuti sani è stato di  $5,58 \pm 0,89$  a.u. p <0.01). Questi dati indicano, inequivocabilmente, che il processo di cancerogenesi è strettamente correlato ai meccanismi fisiologici responsabili dell'equilibrio tra le specie ossidanti e antiossidanti.

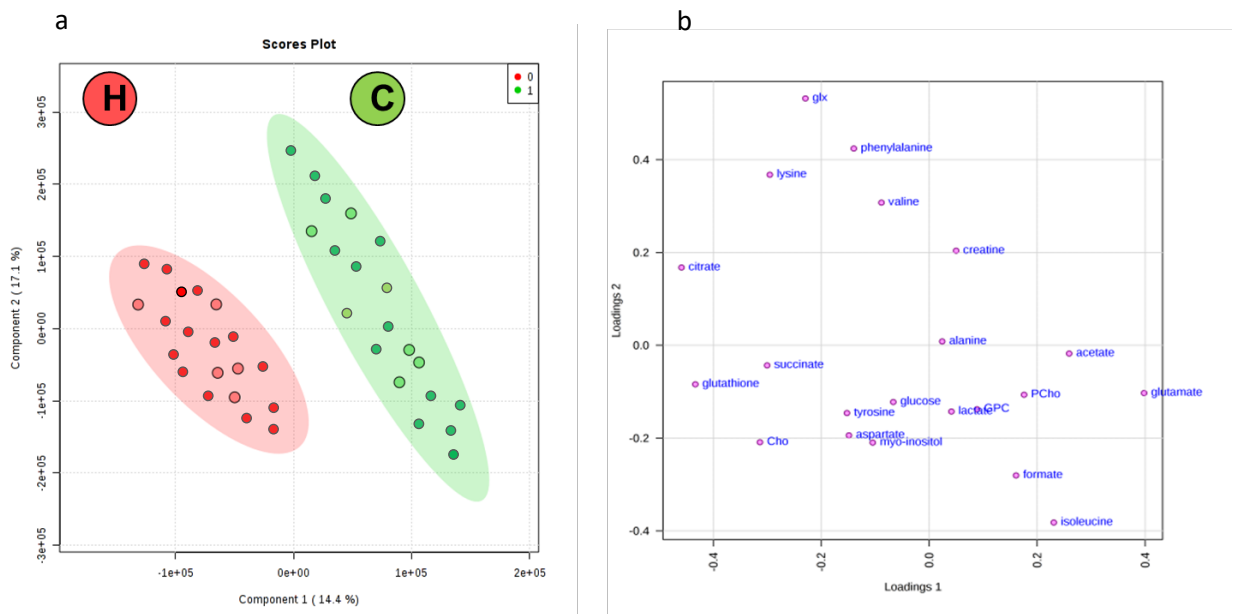


**Figura 3** Misura EPR delle specie reattive dell'ossigeno nel tessuto tiroideo. La linea rossa mostra la concentrazione di CP • nel tessuto tumorale (C), mentre la linea nera la concentrazione di CP• rilevata nel tessuto tiroideo sano (H). L'analisi statistica è stata significativa per tutti i pazienti.

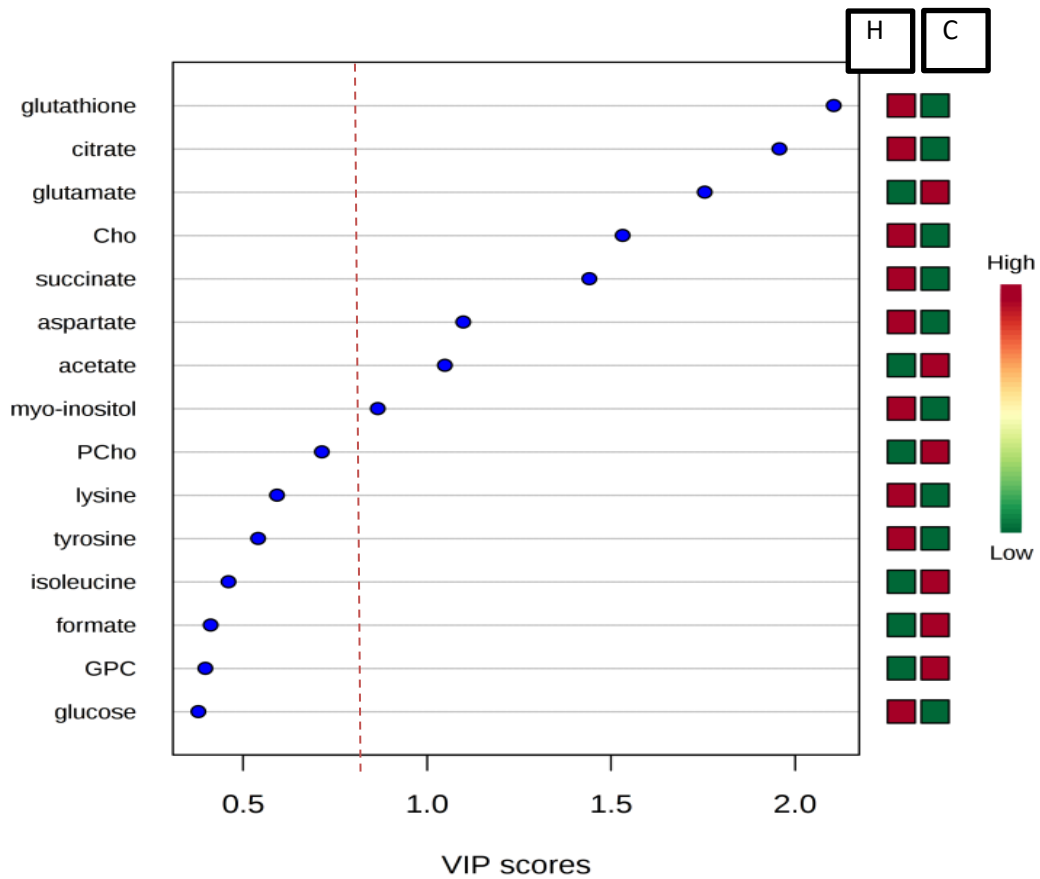
## Analisi metabolomica mediante spettroscopia HR-NMR nei campioni tiroidei di tessuto sano e tumorale

I tessuti tumorali tiroidei e i tessuti sani di controllo sono stati analizzati mediante HR-NMR, al fine di chiarire meglio i cambiamenti biochimici che possono avvenire nei tessuti tumorali e valutare come questi possano essere messi in relazione ad un aumento dello stress ossidativo. Abbiamo eseguito un'analisi multivariata per verificare, prima di tutto, se vi fosse una distribuzione dei metaboliti significativamente diversa, tra tessuto tumorale e tessuto sano. Come mostrato in figura 4a, la Partial Least Square Regression-Discriminant Analysis (PLS-DA), dimostra una significativa differenza nella distribuzione dei metaboliti, tra cancro e tessuti non tumorali, con un livello di confidenza del 95%. Inoltre, in figura 4b sono mostrati i vari metaboliti responsabili della differente segregazione nei tessuti. Tra questi, il glutatione totale (GS), il citrato, la colina libera (Cho) e il glutammato, sembrerebbero essere tra i metaboliti espressi in misura particolarmente diversa nei due campioni. Per ottenere dei dati che ci permettessero di valutare la maggiore o minore concentrazione dei metaboliti tra i due tipi di tessuto e per ottenere una significatività statistica, abbiamo considerato solo quei metaboliti con Variable Importance in Projection (VIP) > 0.8 (figura 5). Questo ci ha permesso di verificare che, oltre al GS, al

citrato, alla Cho e al glutammato, i valori VIP significativi includevano anche altri metaboliti, quali quelli legati al metabolismo della fosfatidilcolina e degli aminoacidi. Tutti questi risultati ci hanno suggerito che nel tessuto tumorale, vi sia una riprogrammazione metabolica che include cambiamenti nei metaboliti coinvolti nelle attività mitocondriali (succinato, citrato, glutammato, aspartato) e nel metabolismo dei fosfolipidi (Cho e mio-inositolo). La diminuzione dei livelli di citrato e succinato e un aumento del contenuto di acetato potrebbero riflettere uno squilibrio a supporto della biogenesi lipidica nel tessuto tumorale.

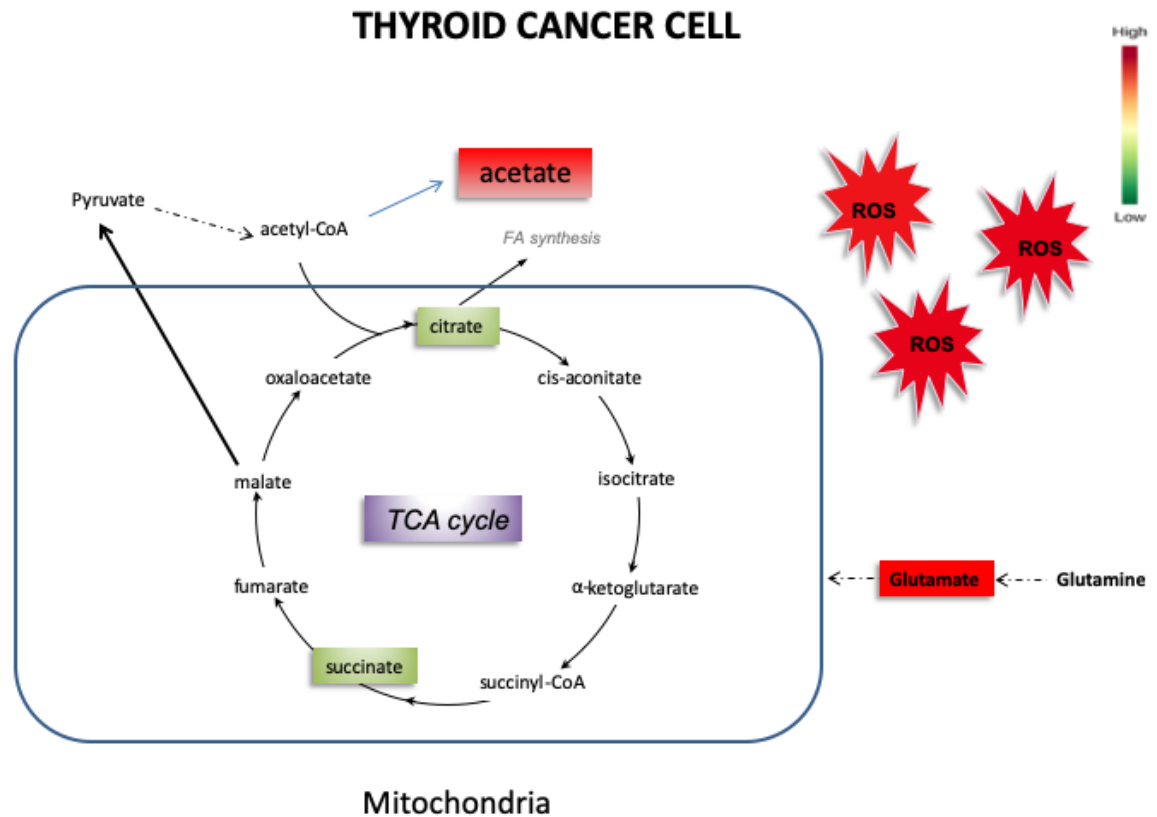


**Figura 4.** a) Analisi discriminante quadrata parziale (PLS-DA), della distribuzione dei diversi metaboliti all'interno del tessuto sano (H, in rosso) e del tessuto tumorale (C, in verde). b) Diagrammi di carico corrispondenti alla diversa distribuzione dei metaboliti presenti nei tessuti analizzati.



**Figura 5.** Importanza variabile nella proiezione (VIP). Valori più grandi di 0.8 indicano i metaboliti che presentano una concentrazione statisticamente diversa nel tessuto sano (H) e tumorale (C).





**Figura 6.** Cellula neoplastica tiroidea. La riduzione che si osserva negli intermedi prodotti durante il ciclo di Krebs (citrate e succinato) potrebbe essere imputabile ad una riduzione del metabolismo ossidativo nelle cellule neoplastiche, coerentemente con un accumulo dei precursori (acetato e glutammato).

## DISCUSSIONE

È stato ipotizzato che possano esistere fino a 100 selenoproteine nei mammiferi [21]. Di queste fino a 30 sono state identificate con il tracciante  $^{75}\text{Se}$  *in vivo* [22]. Gli enzimi GPx, noti come GPx1 classico (la prima selenoproteina identificata), GPx2 gastrointestinale, GPx3 plasmatico e GPx4, rappresentano le principali classi di selenoproteine funzionalmente importanti. GPx1 è espresso in modo ubiquitario in molti tessuti ed è presente nel citosol cellulare e nei mitocondri, dove funziona come antiossidante riducendo direttamente l' $\text{H}_2\text{O}_2$  in acqua e gli idroperossidi lipidici al loro corrispondente alcool [23]. Può anche fungere da molecola di stoccaggio per il selenio, riuscendo a contenere fino a 4 residui di selenocisteina in una struttura tetramericata [24, 25]. Un'altra interessante selenoproteina è TrxR, un enzima che catalizza la riduzione NADPH-dipendente della tioredossina e svolge quindi un ruolo regolatorio nella sua attività metabolica. In effetti, le tioredossine sono proteine caratterizzate, a livello della loro sequenza aminoacidica, dalla presenza di due cisteine che agiscono come antiossidanti, facilitando la riduzione di altre proteine ossidate mediante lo scambio dei gruppi tiolici della cisteina [26]. TrxR è l'unico enzima noto per catalizzare la riduzione della tioredossina. In breve, gli elettroni vengono prelevati dal NADPH tramite TrxR e trasferiti nel sito attivo della tioredossina, che riduce gli

altri substrati. Inoltre, la tioredossina stimola la proliferazione cellulare ed è presente in alte concentrazioni nelle cellule tumorali [27]. Una compromissione dell'attività della TrxR, pertanto, potrebbe favorire lo sviluppo alcune forme di cancro. In effetti, è stato dimostrato che i livelli di espressione delle isoforme citosoliche Trx1 e TrxR1 sono collegati all'aggressività del tumore, alla chemioresistenza e alla resistenza all'apoptosi [28-30]. Le cellule tumorali, nelle quali è solitamente elevata la produzione di radicali liberi [31-33], frequentemente presentano un sistema di difesa antiossidante compromesso, non più in grado di contrastare la sovrapproduzione dei radicali liberi. Tutto ciò porta, conseguentemente, ad un aumento dello stress ossidativo, con compromissione di alcune attività fisiologiche, come la crescita cellulare e la mitosi. I nostri risultati dimostrano uno squilibrio del sistema ossidante/antiossidante, nel tumore della tiroide. La diminuzione degli enzimi GPx1 e TrxR1 che abbiamo riscontrato nei tessuti tumorali, infatti, evidenzia che il sistema antiossidante delle cellule tumorali non è in grado di contrastare adeguatamente l'effetto dei radicali liberi. Quasi tutti i pazienti affetti da carcinoma tiroideo hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'espressione di questi due enzimi antiossidanti nel tessuto tumorale, rispetto a quella rilevata nel tessuto sano. Grazie all'utilizzo della spettroscopia EPR, siamo riusciti a rilevare in modo estremamente preciso, avvalendoci dello spintrap CPH [34, 35], l'aumento dei radicali liberi nel tessuto tumorale, ottenendo una misura diretta della loro presenza, così come suggerito dalla concentrazione di CP•, statisticamente superiore a quella riscontrata nella popolazione di controllo. Questi risultati supportano ipotesi diverse. Da una parte, infatti, potrebbe esserci una minore capacità delle cellule tumorali di proteggersi dallo stress

ossidativo, a causa del deficit quantitativo e/o qualitativo dei sistemi antiossidanti. D'altra parte, questo deficit potrebbe essere, invece, la conseguenza di un aumento del consumo e della riserva cellulare antiossidante, dovuto ad un'iperproduzione di radicali liberi. La spettroscopia HR-NMR ci ha dato l'opportunità di verificare eventuali cambiamenti nel metabolismo dei tessuti tumorali, che potessero essere in relazione ad un aumento dello stress ossidativo. Numerosi studi, infatti, hanno riportato una significativa alterazione dei profili lipidici nel carcinoma tiroideo, rispetto al tessuto sano adiacente. Queste ricerche hanno mostrato una differente concentrazione di acidi grassi al livello della fosfatidilcolina [36-38] e livelli elevati di colina nei tessuti tumorali [39-41]. Inoltre, è stato anche osservato che le lesioni tiroidee maligne presentano livelli più bassi di citrato rispetto a quelle benigne [42], come anche evidenziato dai nostri risultati. Con questo studio per la prima volta, abbiamo evidenziato una connessione tra stress ossidativo ed alterazione del profilo metabolico nei tumori della tiroide. Noi, infatti, abbiamo osservato mediante EPR, un aumento significativo del contenuto di ROS di circa il doppio nei campioni tumorali, associato ad una riduzione dei livelli degli enzimi antiossidanti GPx1 e TrxR1 come dimostrato dall'analisi con WB e ad una riprogrammazione metabolica, valutata attraverso HR-NMR. Proprio quest'ultima analisi, sulla base dei risultati ottenuti, ci ha permesso di ipotizzare una ridotta attività del ciclo di Krebs. La riduzione del citrato e succinato, intermedi prodotti durante il ciclo di Krebs, potrebbe essere imputabile ad una riduzione del metabolismo ossidativo nelle cellule neoplastiche, coerentemente con un accumulo dei precursori come glutammato e acetato. L'acido glutammico, infatti, viene portato dal citoplasma all'interno dei mitocondri degli epatociti, dove viene

sottoposto ulteriormente a deaminazione ossidativa, grazie all'enzima glutammato deidrogenasi. Dal glutammato, oltre alla perdita dell'ammoniaca, si origina l' $\alpha$ -Chetoacido corrispondente che può essere utilizzato nel ciclo dell'acido citrico. Un'inadeguata funzionalità del ciclo di Krebs renderebbe inutile questa via metabolica, con conseguente aumento, a monte, del glutammato. La compromissione del metabolismo ossidativo, inoltre, spiegherebbe anche la riduzione della formazione di acetylCoA, con conseguente accumulo del suo precursore, l'acetato appunto. Per quanto riguarda la riduzione del glutatione, l'analisi metabolica (per il tipo di strumentazione utilizzata), non ci ha permesso di discriminare tra glutatione ridotto o ossidato, ma ha evidenziato esclusivamente una riduzione del glutatione totale. In ogni caso, una delle ipotesi che potrebbe spiegare tale dato, sarebbe da ricercare nella diminuzione della sintesi del glutatione, dovuta, per esempio, ad un impairment degli enzimi deputati alla sintesi del glutatione, come Glutammato-Cisteina Ligasi o  $\gamma$ -Glutamylcisteina. L'ipotesi di una riduzione dovuta alla carenza di substrati, invece, sembrerebbe meno probabile, in quanto, proprio uno dei precursori del glutatione, il glutammato, risulta aumentato nei tumori della tiroide. Le nostre ricerche, ovviamente, spiegano solo in parte i complessi meccanismi alla base del cancro della tiroide. Altri studi sono necessari per comprendere il ruolo degli altri metaboliti ed enzimi "alterati" nel tessuto tiroideo e per valutare a pieno i meccanismi coinvolti nella sovrapproduzione di radicali liberi nel tumore della tiroide. Il dato che però risulta abbastanza chiaro è la capacità delle cellule neoplastiche di riprogrammare la loro attività metabolica, riuscendo a sopravvivere in condizioni di elevato stress ossidativo e con un sistema antiossidante compromesso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Halliwell B: Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research* 2000, 47:410-418.
2. Halliwell B: Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 1992, 59:1609-1623.
3. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992, 119:598-620.
4. Visioli F, Keaney JF, Halliwell B: Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? *Cardiovascular Research* 2000, 47:409.
5. Mallozzi C, Martire A, Domenici MR, Metere A, Popoli P, Di Stasi AMM: L-NAME reverses quinolinic acid-induced toxicity in rat corticostriatal slices: Involvement of src family kinases. *Journal of Neuroscience Research* 2007, 85:2770-2777.
6. Afanas'ev I: Signaling of reactive oxygen and nitrogen species in Diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2010, 3:361-373.
7. Obulesu M, Venu R, Somashekhar R: Lipid peroxidation in Alzheimer's disease: emphasis on metal-mediated neurotoxicity. *Acta Neurologica Scandinavica* 2011, 124:295-301.
8. Metere A, Mallozzi C, Minetti M, Domenici MR, Pèzzola A, Popoli P, Di Stasi AMM: Quinolinic acid modulates the activity of src family kinases in rat striatum: in vivo and in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* 2006, 97:1327-1336.
9. Minetti M, Pietraforte D, Straface E, Metere A, Matarrese P, Malorni W: Red blood cells as a model to differentiate between direct and indirect oxidation pathways of peroxynitrite. *Methods in Enzymology* 2008, 440:253-272.
10. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ: Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & Neck* 2010, 32:750-756.
11. Akinci M, Kosova F, Cetin B, Sepici A, Altan N, Aslan S, Cetin A: Oxidant/antioxidant balance in patients with thyroid cancer. *Acta Cirurgica Brasileira* 2008, 23:551-554.
12. Metere A, Chiesa C, Di Cosimo C, Fierro G, Giacomelli L, Pietraforte D: A novel approach to study

oxidative stress in thyroid diseases: a preliminary study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2012, 16:646-652.

13. Lushchak VI: FREE RADICALS, REACTIVE OXYGEN SPECIES, OXIDATIVE STRESSES AND THEIR CLASSIFICATIONS. *Ukrainian Biochemical Journal* 2015, 87:11-18.

14. Graffouillère L, Deschasaux M, Mariotti F, Neufcourt L, Shivappa N, Hébert JR, Wirth MD, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P et al: Prospective association between the Dietary Inflammatory Index and mortality: modulation by antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2016, 103:878-885.

15. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE: Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011, 15:1957-1997.

16. Koháryová M, Kollárová M: Thioredoxin system - a novel therapeutic target. *General Physiology and Biophysics* 2015, 34:221-233.

17. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Hauger BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009, 19(11):1167–1214.

18. Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, Fadda G, Frasoldati A, Orlandi F, Palombini L, Papini E, Zini M, Pontecorvi A et al: Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *Journal of Endocrinological Investigation* 2014, 37:593-599.

19. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012, 9:671-675.

20. Davies MJ: Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods (San Diego, Calif)* 2016, 109:21-30.

21. Burk RF, Hill KE: Regulation of selenoproteins. *Annual Review of Nutrition* 1993, 13:65-81.

22. Evenson JK, Sunde RA: Selenium incorporation into selenoproteins in the Se-adequate and Se-deficient rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1988, 187:169-180.

23. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science (New York, NY)* 1973, 179:588-590.

24. Burk RF: Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1991, 5:2274-2279.

25. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS: Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of Biological Chemistry* 1993, 268:2571-2576.

26. Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL, Gladyshev VN: Redox regulation of

cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274:24522-24530.

27. Holmgren A, Björnstedt M: Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 1995, 252:199-208.

28. Eriksson SE, Prast-Nielsen S, Flaberg E, Szekely L, Arnér ESJ: High levels of thioredoxin reductase 1 modulate drug-specific cytotoxic efficacy. *Free Radical Biology & Medicine* 2009, 47:1661-1671.

29. Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, Bellamy W, Frutiger Y, Vela E, Stemmerman G, Macdonald J, Richter L, Gallegos A et al: Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Human Pathology* 2000, 31:475-481.

30. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, Powis G: Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2003, 142:46-51.

31. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H: Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters* 1995, 358:1-3.

32. Schumacker PT: Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006, 10:175-176.

33. Trachootham D, Alexandre J, Huang P: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* 2009, 8:579-591.

34. Suzen S, Gurer-Orhan H, Saso L: Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2017, 22.

35. Abbas K, Babić N, Peyrot F: Use of spin traps to detect superoxide production in living cells by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Methods (San Diego, Calif)* 2016, 109:31-43.

36. Guo S., Wang Y., Zhou D., Li Z. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Scientific Reports*. 2014;4, article no. 5959 doi: 10.1038/srep05959.

37. Guo S., Qiu L., Wang Y., et al. Tissue imaging and serum lipidomic profiling for screening potential biomarkers of thyroid tumors by matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406(18):4357–4370. doi: 10.1007/s00216-014-7846-0.

38. Ide Y., Waki M., Hayasaka T., et al. Human Breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine(36:1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS ONE*. 2013;8(4, article e61204) doi: 10.1371/journal.pone.0061204.



39. Ryoo I., Kwon H., Kim S. C., et al. Metabolomic analysis of percutaneous fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Potential application for the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *Scientific Reports*. 2016;6, article 30075 doi: 10.1038/srep30075.
40. Gupta N., Goswami B., Chowdhury V., RaviShankar L., Kakar A. Evaluation of the role of magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of follicular malignancies of thyroid. *JAMA Surgery*. 2011;146(2):179–182. doi: 10.1001/archsurg.2010.345.
41. King A. D., Yeung D. K. W., Ahuja A. T., et al. In vivo <sup>1</sup>H MR spectroscopy of thyroid carcinoma. *European Journal of Radiology*. 2005;54(1):112–117. doi: 10.1016/j.ejrad.2004.05.003.
42. Tian Y., Nie X., Xu S., et al. Integrative metabonomics as potential method for diagnosis of thyroid malignancy. *Scientific Reports*. 2015;5, article 14869 doi: 10.1038/srep14869.