

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E  
PATOLOGICA



TESI DI DOTTORATO

*“Nuove prospettive molecolari nella diagnosi citologica  
preoperatoria del nodulo tiroideo”*

Relatore  
Ch.<sup>mo</sup> Prof.  
Giancarlo Troncone

Candidata  
Dr.<sup>ssa</sup> Alessia Caleo

**ANNO ACCADEMICO 2007/2008**

# Indice

Introduzione ..... pag. 4

Biologia molecolare dei tumori tiroidei ..... pag. 8

- Ret  
pag. 8
- B-Raf ..... pag. 11
- Galectine ..... pag. 13

Analisi combinata di B-Raf e Ret/PTC su noduli tiroidei con diagnosi  
citologica inconclusiva

- Materiali e Metodi ..... pag. 16
- Screening di B-Raf ..... pag. 17
- Screening di Ret/PTC ..... pag. 18
- Risultati ..... pag. 19

Analisi combinata di Galectina 3 e B-Raf su noduli tiroidei con  
diagnosi citologica inconclusiva

- Materiali e Metodi ..... pag. 21
- Risultati ..... pag. 22

Discussione pag. 24

Bibliografia pag. 30

Tabelle pag. 35

Figure pag. 39

## **Introduzione**

I tumori tiroidei rappresentano le più frequenti neoplasie del sistema endocrino (1% di tutte le neoplasie maligne). Circa 20000 nuovi casi sono diagnosticati ogni anno negli Stati Uniti e circa 1300 pazienti muoiono per la malattia. Il 94% circa delle neoplasie tiroidee sono forme differenziate (carcinoma papillifero e follicolare); il 5% è rappresentato dal carcinoma midollare e il rimanente 1% è costituito da carcinomi anaplastici. [1]

In Italia, dove molte regioni ancora presentano condizioni di carenza di iodio, le patologie tiroidee, comprese quelle neoplastiche, sono particolarmente frequenti. I tumori tiroidei coprono un ampio spettro di lesioni, dagli adenomi ai carcinomi ben differenziati (papilliferi e follicolari), ai carcinomi poco differenziati fino a quelli totalmente indifferenziati o anaplastici. Sia la prognosi che la terapia dei carcinomi tiroidei sono estremamente variabili a seconda dell'istotipo. La manifestazione di esordio più frequente di un tumore tiroideo è la comparsa di un nodulo, segno questo alquanto aspecifico se si considera che i noduli tiroidei sono estremamente frequenti (più del 20% della popolazione presenta un nodulo tiroideo palpabile e la percentuale sale al 70% col rilievo ecografico [2] ) e nella grande

maggioranza dei casi (95%) essi sono semplicemente iperplasie o lesioni benigne. [3]

Da qui la prima accurata selezione clinico strumentale dei noduli cosiddetti sospetti. È a questo punto che si colloca il prelievo citologico con ago sottile (FNC) che può fornire nella maggioranza dei casi la diagnosi morfologica. Laddove il prelievo citologico non fosse sufficiente per una diagnosi di certezza viene formulata una diagnosi di “inconclusivo”, che rimanda ad una eventuale ripetizione del prelievo [4] o all’escissione chirurgica. La maggioranza dei FNC tiroidei definiti inconclusivi è imputabile alle neoplasie follicolari, laddove il concetto di inconclusivo risiede nella intrinseca impossibilità delle neoplasie follicolari di definizione unicamente citologica (88% degli inconclusivi). I carcinomi papillifero, midollare ed anaplastico possono essere infatti generalmente facilmente diagnosticati in FNC con una sensibilità e specificità che si aggirano intorno al 68-98% e 56-100% rispettivamente e una percentuale complessiva di inconclusivi pari all’11% circa.

E’ quindi in questi casi “inconclusivi” che il campione citologico può avvalersi dello studio genetico molecolare di alcuni degli oncogeni noti coinvolti nelle neoplasie tiroidee, studio che può essere di ausilio nella formulazione di una diagnosi più oggettiva. Negli ultimi anni la progressiva conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nelle neoplasie tiroidee unitamente al sempre maggior uso di tecniche di

biologia molecolare in citopatologia hanno fatto sì che alcune metodiche molecolari, oltre che essere utilizzate nel campo della ricerca e degli studi sperimentali, hanno assunto un ruolo di utilità clinica nella routine citopatologica. L'applicazione di metodiche di biologia molecolare a campioni citologici tiroidei fornisce l'opportunità di ottenere due tipi di informazioni dallo stesso prelievo citologico routinario: la diagnosi citologica e il pattern di espressione di geni rilevanti dal punto di vista diagnostico, prognostico e terapeutico.

Nel corso di questo Dottorato di Ricerca ci siamo occupati della possibilità e della modalità di applicazione di alcune metodiche molecolari su campioni citologici atte allo studio dei più comuni oncogeni coinvolti nelle neoplasie tiroidee. Il lavoro si è articolato in due fasi: una prima fase tecnica finalizzata alla messa a punto di metodiche di biologia molecolare su campioni citologici sia di archivio che raccolti prospetticamente e una seconda fase di applicazione di tali metodiche per lo studio di alcuni dei più importanti oncogeni tiroidei al fine di valutare la possibilità dell'integrazione della metodologia molecolare nella pratica routinaria. I risultati ottenuti sono stati incoraggianti ed oggetto di varie pubblicazioni nel corso di questo triennio. Riportiamo in questa Tesi i risultati relativi a due delle fasi più interessanti di questo studio.

## **Biologia molecolare dei tumori tiroidei**

Prima di entrare nel merito dei metodi e dei risultati del nostro lavoro analizziamo brevemente il ruolo di alcuni degli oncogeni di cui ci siamo occupati.

### **Ret**

L'oncogene tiroide specifico Ret/PTC fu descritto per la prima volta nel 1987 quando fu notato che una forma riarrangiata del proto-oncogene Ret, isolato da un linfonodo contenente una metastasi di carcinoma papillifero, determinava la trasformazione di cellule in coltura. [5] Il suo ruolo carcinogenetico fu quindi evidenziato in un modello di topo transgenico in cui l'animale esprime il transgene Ret/PTC sviluppava un carcinoma tiroideo con aspetti papillari. [6]

Il proto-oncogene Ret codifica per un recettore transmembrana con dominio tirosina chinasi intracellulare, normalmente espresso da cellule embrionali neuronali. Le cellule follicolari tiroidee non esprimono Ret che è invece espresso dalle cellule C parafollicolari. Riarrangiamenti somatici di Ret con una varietà di geni attivanti determinano la costitutiva attivazione delle oncoproteine chimeriche Ret/PTC nelle cellule follicolari tiroidee. Sono stati descritti almeno

15 riarrangiamenti, ciascuno determinante la trasposizione di un gene cellulare in posizione adiacente al dominio tirosina chinasi di Ret. I riarrangiamenti di Ret sono ristretti alla ghiandola tiroidea dove sono specifici per il carcinoma papillifero. [7] La prevalenza del riarrangiamento Ret/PTC nel carcinoma papillifero umano sporadico varia, a seconda delle varie casistiche e delle aree geografiche, tra il 5 e il 44%, con picchi maggiori nelle forme giovanili e particolarmente nelle forme pediatriche associate all'incidente di Chernobyl (67-87%). [8-9] Ret/PTC1 è il riarrangiamento più frequente, seguito da Ret/PTC3 e Ret/PTC2. La prevalenza del riarrangiamento Ret/PTC nei microcarcinomi papilliferi (carcinomi occulti < 1cm) [10] suggerisce l'ipotesi che questo sia un evento precoce nella tumorigenesi tiroidea. [11] Tuttavia il fatto che in alcune casistiche la prevalenza del riarrangiamento è più alta nelle forme occulte che in quelle clinicamente evidenti, indica altresì che si tratta di un evento non indispensabile per la crescita tumorale e che molte delle forme occulte non progrediscono. [12] Dunque, sebbene l'attivazione di Ret possa associarsi ad uno stadio di malattia più avanzato al momento della diagnosi [13], essa non ha impatto prognostico sulla sopravvivenza a lungo termine del PTC. [14] E' interessante inoltre notare come il riarrangiamento Ret/PTC sia responsabile delle irregolarità di membrana nucleare osservate nel PTC. [15]



Molto raro il riarrangiamento Ret/PTC nella variante follicolare del carcinoma papillare, una delle varianti più frequenti e attualmente più discusse; nel 43% di questi casi si è dimostrata una mutazione dell'oncogene Ras, tipica delle neoplasie follicolari. Indagini molecolari hanno invece dimostrato la presenza di Ret/PTC in alcuni tumori a cellule oncocitarie e questo stravolgerebbe gli attuali criteri classificativi di tali neoplasie. [16]

Come precedentemente detto, le cellule tiroidee normali non presentano riarrangiamento Ret/PTC sebbene sia stata descritta una prevalenza di tale riarrangiamento nelle cellule follicolari della tiroidite di Hashimoto. [17] Probabilmente l'infiammazione presente nella tiroidite di Hashimoto favorirebbe riarrangiamenti di ret con conseguente aumentato rischio di sviluppare un carcinoma papillifero. [18]

Mutazioni germinali puntiformi del proto-oncogene Ret sono invece maggiormente associate allo sviluppo di neoplasie tiroidee ereditarie come il carcinoma midollare nella forma familiare MEN 2. Dunque esiste una correlazione tra il tipo specifico di mutazione di Ret e il fenotipo clinico della neoplasia determinata.

## **B-Raf**

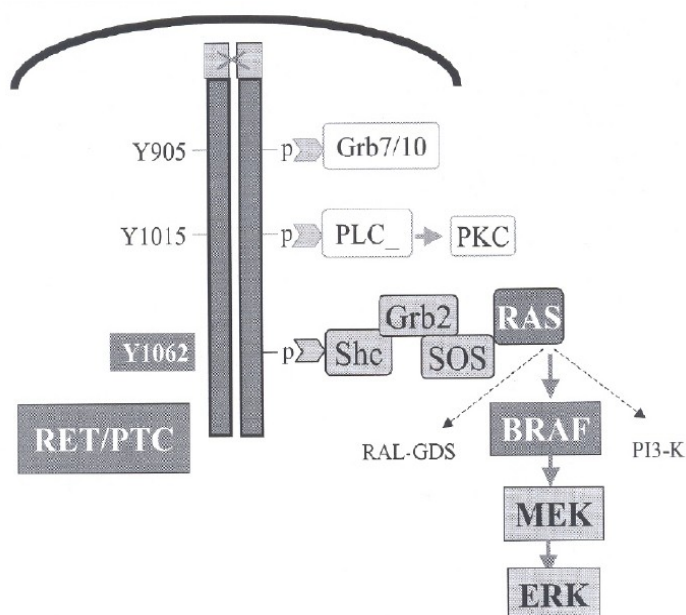
B-Raf è un membro della famiglia delle proteine chinasi Raf, cui fanno parte anche A-Raf e C-Raf, proteine espresse in molti tessuti con un ruolo nella crescita tissutale. B-Raf è una serina-treonina chinasi coinvolta come Ras nella cascata delle MAP chinasi in risposta a segnali di crescita. Mutazioni somatiche del proto-oncogene B-Raf determinano la costitutiva attivazione della proteina da esso codificata; nella maggioranza dei casi si tratta di mutazioni puntiformi (transversioni timina-adenina al nucleotide in posizione 1796) che determinano la sostituzione di un singolo aminoacido (valina-glutammato, V599E).

Mutazioni attivanti nell'oncogene B-Raf sono state recentemente evidenziate in varie neoplasie umane, prevalentemente nel melanoma, nel carcinoma papillifero della tiroide e nel carcinoma del colon retto. [19] Nella tiroide le mutazioni di B-Raf sono specifiche del carcinoma papillifero non essendo state trovate in nessuna altra forma di neoplasia tiroidea differenziata; nel PTC la percentuale di casi con B-Raf mutato si aggira tra il 35 e il 70%. [20-21] Carcinomi papilliferi con B-Raf mutato presentano spesso un decorso più aggressivo, come è dimostrato anche dal fatto che le varianti tall-cell di PTC, notoriamente a prognosi peggiore, così come i carcinomi anaplastici

insorti su preesistente PTC, hanno una particolare alta prevalenza di mutazioni di B-Raf. [22]

E' interessante notare come nei PTC non si assista a sovrapposizione tra le mutazioni di Ret, B-Raf e Ras, che considerate complessivamente interessano il 70% di tutti i PTC. [23] Dunque le mutazioni di Ret, B-Raf e Ras sembrano essere mutuamente esclusive nella tumorigenesi, probabilmente ciò riflettendo la funzione ridondante di tali oncogeni collocati nella stessa cascata chinasi.

Infine è importante evidenziare che studi preliminari hanno suggerito che, nelle neoplasie in cui è coinvolto, B-Raf è un potenziale target terapeutico. Un farmaco inibitore della chinasi Raf, BAY 43-9006 (Sorafenib), è stato dimostrato essere efficace in vari tipi di neoplasie in cui è mutato B-Raf. Tale farmaco è attualmente in fase I e II di sperimentazione clinica. [24-25]

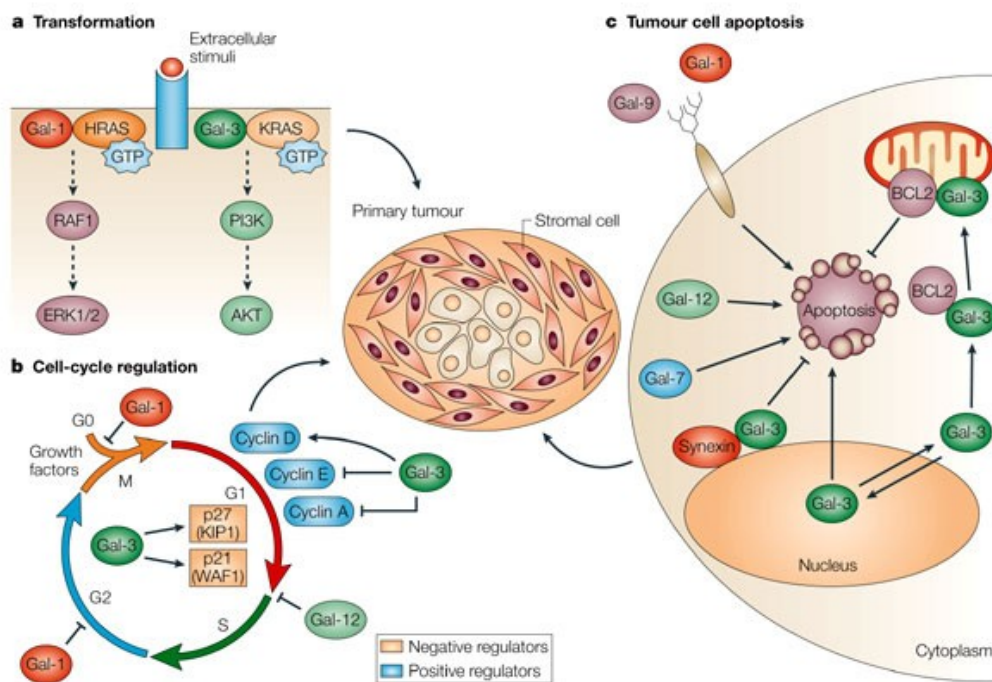


## *Galectine*

Le Galectine possono avere importanti ruoli durante diverse fasi della tumorigenesi ossia nella trasformazione tumorale delle cellule, nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi.

La Galectina 1 (Gal-1) e la Galectina 3 (Gal-3) possono mediare la trasformazione neoplastica interagendo con oncogeni come Ras e promuovendo la trasduzione del segnale Ras-mediata. Le Galectine possono inoltre controllare la progressione tumorale modulando la progressione attraverso il ciclo cellulare. In particolare la Gal-3 regola i livelli di ben noti regolatori del ciclo cellulare (ciclina A-E-D) così come di inibitori del ciclo cellulare (p21 e p27) determinando l'arresto del ciclo cellulare. Infine le Galectine hanno un ruolo nella regolazione dell'apoptosi: Gal-1 e Gal-9 inducono l'apoptosi attraverso meccanismi extracellulari, Gal -7 e Gal-12 promuovono l'apoptosi attraverso meccanismi intracellulari. La Gal-3 ha funzioni antiapoptotiche interagendo con regolatori intracellulari dell'apoptosi come BCL-2 o facilitandone la sua localizzazione mitocondriale. Tuttavia l'effetto della Gal-3 nella regolazione dell'apoptosi dipende dalla sua localizzazione cellulare: la Gal-3 citoplasmatica è antiapoptosica mentre la Gal-3 nucleare è pro-apoptosica.

Nella tumorigenesi tiroidea un ruolo è svolto dalla Gal-3, una beta-galattosyl-binding protein coinvolta nella regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice [26]. La Gal-3 è raramente riscontrata in tessuto tiroideo normale o noduli benigni mentre la sua espressione è stata frequentemente dimostrata in tumori maligni tiroidei [27-29]



## **Analisi combinata di B-Raf e Ret/PTC su noduli tiroidei con diagnosi citologica inconclusiva.**

I recenti dati riportati in letteratura, anche dal nostro gruppo, sull'oncogene B-Raf e sulla sua specificità per i carcinomi papilliferi della tiroide [30] congiuntamente a quelli riportati su Ret ci hanno indotto a condurre un'analisi combinata al fine di verificare l'applicabilità dello studio molecolare di questi oncogeni su vetrini citologici ed il loro possibile ruolo nella diagnosi citologica del nodulo tiroideo.

### **Materiali e Metodi**

I casi da sottoporre a tale protocollo di studio sono stati raccolti nell'ambulatorio di Citopatologia dell'Azienda Universitaria "Federico II". I pazienti sono stati selezionati in base al complessivo quadro clinico-strumentale e al risultato di una prima analisi estemporanea eseguita sui casi sospetti. Nella nostra pratica routinaria, dopo aver ottenuto il consenso informato dal paziente, viene effettuato un prelievo aggiuntivo dedicato allo studio molecolare. Il campione viene raccolto in una eppendorf (tenuta sempre in ghiaccio) contenente 500µl di TRI REAGENT (Sigma, St. Louis, MO) e conservato per poche ore a -20°C. In giornata si procede

quindi all'estrazione di DNA e RNA con il protocollo consigliato dalla SIGMA e l' RNA estratto viene poi retrotrascritto a cDNA (usando il protocollo della Superscript III dell'INVITROGEN). Il DNA e il cDNA possono essere quindi conservati a -20°C. Come controllo sia dell'estrazione che del protocollo di retro-trascrizione si esegue una PCR con la Tireoglobulina. Una volta stabilito che l'estrazione del DNA, dell'RNA e la retrotrascrizione sono avvenute con buona resa si passa alla tipizzazione vera e propria degli oncogeni.

### **Screening di B-Raf**

La sensibilità nella rilevazione della transversione T1799A nel gene B-Raf come marker diagnostico del PTC su campioni di FNC dipende dalla prevalenza della mutazione stessa e dalla tecnica utilizzata. Il metodo utilizzato in questo studio per la rilevazione della mutazione di B-Raf è stato il *mutant allele-specific amplification* (MASA). Con questo metodo si esegue una PCR usando due differenti forward primers di cui uno corrisponde all'allele wild type (WT) di B-Raf e l'altro reca la sostituzione di una singola base corrispondente alla transversione T1799A; la sequenza del reverse primer è invece la stessa (Tabella 1). Dunque, in assenza di mutazione si otterrà all'elettroforesi una banda solo nella PCR eseguita con i primers WT mentre se la mutazione è presente verrà evidenziata una banda anche

nella PCR eseguita con il primer mutato (Figura 1). La presenza della mutazione deve essere comunque confermata mediante sequenziamento (Figura 2).

### **Screening di Ret/PTC**

Lo screening dell'oncogene Ret si basa sul presupposto che normalmente nelle cellule tiroidee Ret non è espresso per cui una sua espressione è già di per se un fatto anomalo che può essere la conseguenza della traslocazione di Ret con uno dei geni PTC. Il nostro protocollo prevede prima l'esecuzione di una RT-PCR con dei primers nel dominio kinasico di Ret; se si ottiene un'espressione (Figura 3A), si passa alla verifica della possibile fusione Ret/PTC facendo una RT-PCR con primers specifici per i riarrangiamenti Ret/PTC 1-2-3 (Figura 3B). In caso di positività della reazione si otterrà conferma della traslocazione tramite sequenziamento. Le sequenze dei primers di Ret sono elencate nella Tabella 1.

### **Risultati**

I risultati sono relativi alla valutazione degli oncogeni ret/PTC e BRAF su 131 citospirati tiroidei tutti con relativo controllo istologico. La casistica comprende 48 noduli di gozzo, 46 casi risultati inadeguati



o per scarsa cellularità o per artefatti tecnici, 21 casi inconclusivi per neoplasia follicolare e 16 casi inconclusivi sospetti di carcinoma papillifero. Nessuna mutazione degli oncogeni studiati è stata riscontrata nei casi di gozzo e nei campioni inadeguati. Dei 21 casi inconclusivi per neoplasia follicolare 2 hanno mostrato il riarrangiamento dell'oncogene ret, uno di questi risultando tuttavia essere al controllo istologico un carcinoma midollare. Infine per quanto concerne i casi sospetti di carcinoma papillifero, dei 6 confermati tali all'istologia, 4 hanno mostrato la mutazione di B-RAF, 1 il riarrangiamento di ret e 1 nessuna mutazione (Tabella 2). Dunque in questi casi la ricerca degli oncogeni ha aumentato la sensibilità diagnostica del FNAB su casi la cui sola citologia non è stata sufficiente per la diagnosi di carcinoma papillifero. Quest'ultimo è sicuramente il dato più significativo e va a conferma di quello da noi già precedentemente riscontrato e pubblicato sui vetrini di archivio [30]. Naturalmente se la presenza della mutazione dell'oncogene può essere indicativa di cancro, la sua assenza non ha impatto sulla diagnosi come dimostrato dal caso di papillifero privo di alterazioni molecolari. Tali risultati sono stato oggetto di pubblicazione [31].

## **Analisi combinata di Galectina-3 e B-Raf su noduli tiroidei con diagnosi citologica inconclusiva.**

Nell'ultima fase del nostro lavoro ci siamo soffermati sullo studio della galectina-3 (Gal-3). La galectina-3 (Gal-3) è stata molto studiata negli ultimi anni con metodica immunohistochimica risultando raramente presente nella tiroide normale e nelle lesioni benigne ed espressa nei tumori maligni tiroidei. Dal momento che studi in letteratura hanno evidenziato come la combinazione di due o più markers può essere di ausilio nella diagnosi di benignità o malignità dei tumori tiroidei [32], il nostro obiettivo è stato quello di correlare l'espressione della Gal-3 con quella dell'oncogene B-RAF su campioni citologici inconclusivi.

### **Materiali e Metodi**

Sono stati analizzati 144 campioni di FNAB tiroideo di cui 50 diagnosticati come benigni, 47 come inconclusivi (generici o sospetti di neoplasia follicolare) e 47 come inconclusivi sospetti di carcinoma papillifero. Il controllo istologico è stato possibile su 82 di questi casi. Lo studio è stato condotto parallelamente su 271 blocchi in paraffina comprendenti lesioni benigne, carcinomi papilliferi e carcinomi

follicolari al fine di controllare la riproducibilità dei risultati ottenuti su citologia.

Lo screening di B-RAF è stato eseguito con metodica molecolare come descritto in precedenza mentre lo screening della Gal-3 è stato effettuato con metodica immunostochimica.

### **Risultati**

Né l'espressione della Gal-3 né la mutazione di B-Raf è stata trovata in alcuno dei 50 noduli benigni.

Nel gruppo degli inconclusivi, 5 mostravano focale positività per Gal-3 con assente mutazione di B-Raf ma nessuno di questi è stato sottoposto ad intervento chirurgico. Dei rimanenti 42 casi Gal-3 negativi, l'unico caso B-Raf positivo è risultato essere un carcinoma papillifero mentre degli altri B-Raf negativi solo uno è risultato positivo e precisamente un carcinoma follicolare.

Infine nel gruppo degli inconclusivi sospetti di carcinoma papillifero i 4 casi Gal-3 e B-Raf positivi sono risultati essere tutti PTC, dei casi invece Gal-3 positivi ma B-Raf negativi 11 sono risultati PTC, 2 FTC e 6 benigni. Tutti i 5 casi B-Raf positivi ma Gal-3 negativi sono risultati PTC e dei casi negativi sia a B-Raf che a Gal-3, 2 sono risultati essere FTC. (Tabella 3)

Basandoci su questi dati è stato valutato il valore delle espressione di questi due markers da soli e associati. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la sensibilità, la specificità e l'accuratezza di B-Raf e Gal-3 aumentano significativamente quando i due markers vengono testati insieme anziché da soli, facilitando la diagnosi di casi sospetti ma non conclusivi per PTC alla sola citologia.(Tabella 4)

Tali risultati sono stato oggetto di pubblicazione [33]

## **Discussione**

L'identificazione di numerose modificazioni geniche proprie delle neoplasie tiroidee ha in gran parte chiarito le basi molecolari della oncogenesi dei tumori derivanti dalle cellule epiteliali che rivestono i follicoli tiroidei. Da un lato l'attivazione di alcuni oncogeni, dall'altro la perdita di funzione di determinati geni oncosoppressori sono state associate in maniera specifica a determinati istotipi tumorali tiroidei, permettendo la formulazione di un modello di tumorigenesi abbastanza preciso sebbene non ancora completamente definito. L'acquisizione di tali conoscenze apre oggi la possibilità di applicare le metodiche molecolari alla diagnostica citologica delle neoplasie tiroidee; le problematiche tecniche e culturali che ne scaturiscono sono state oggetto del lavoro svolto in questi anni del Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica.

Innanzitutto la prima considerazione è di ordine tecnico; i dati presentati nei capitoli precedenti, relativi sia ai campioni di archivio che a quelli raccolti prospetticamente, sono altamente soddisfacenti e di grande affidabilità e mostrano che la possibilità di applicare la tecnica dello screening degli oncogeni alla citologia tradizionale tiroidea è senz'altro praticabile. Infatti, circa l'80% dei campioni analizzati è risultato adeguato per l'analisi molecolare; in tali

campioni, il requisito base dell'adeguatezza, e cioè la possibilità di amplificare i geni costitutivi e specifici della ghiandola tiroidea (tireoglobulina), è risultato soddisfatto. Sempre da un punto di vista tecnico, ugualmente soddisfacenti sono i risultati relativi allo studio dei singoli oncogeni, sia di quelli analizzati su DNA (B-Raf) che quelli studiati previa estrazione di RNA (Ret). Le percentuali di adeguatezza delle singole metodiche molecolari, pur attestandosi tutte su una media dell'80% circa, hanno mostrato lievi variazioni verosimilmente a causa di problematiche di tipo tecnico.

Per quanto riguarda la discussione dei risultati ottenuti nella nostra casistica, per quanto riguarda il carcinoma papillifero, lo studio degli oncogeni B-Raf e Ret ha confermato il dato generale, acquisito su campioni istologici, consolidato in letteratura ed inerente alla frequenza delle due alterazioni [8,20]. In particolar modo i risultati confermano il ruolo di marker diagnostico dell'oncogene B-Raf; ruolo reso tanto più utile dal fatto che tale gene è associato con una specificità del 100% al solo carcinoma papillifero tiroideo. Poiché le mutazioni di B-Raf sembrano poi essere associate a PTC con prognosi peggiore [22], è possibile che B-Raf abbia anche implicazioni prognostiche utili nella valutazione preoperatoria. Infine la possibilità di impiego di farmaci inibitori di B-Raf, attualmente in fase di sperimentazione clinica, prospetta un possibile ruolo del test molecolare di B-Raf come indicatore di casi trattabili

farmacologicamente. [25] Per quanto riguarda i riarrangiamenti Ret/PTC, la loro prevalenza si conferma più bassa rispetto a quella delle mutazioni di B-Raf, con una lieve preponderanza per Ret/PTC1; inoltre i nostri risultati confermano la natura mutuamente esclusiva delle due alterazioni geniche e l'utilità di combinare i due test nei citoaspirati tiroidei.

Molto interessanti sono stati poi i risultati relativi alla categoria degli "inconclusivi o sospetti". Se infatti la diagnosi di PTC nelle mani di un citopatologo esperto è nella maggior parte dei casi agevole, esiste una percentuale di casi in cui l'esame citologico non può essere conclusivo per la mancata presenza di tutti i criteri morfologici; nella nostra istituzione la percentuale di casi inconclusivi per PTC si aggira intorno al 7%. Una diagnosi inconclusiva può comportare ripetizione del prelievo citologico o più frequentemente rappresenta una indicazione chirurgica. Tuttavia il dubbio diagnostico che si ritrasmette al chirurgo non permette di impostare una strategia chirurgica sicuramente decisiva. Infatti, generalmente questi pazienti vanno incontro ad emitiroidectomia; in caso di conferma di malignità il chirurgo opera di nuovo e completa la chirurgia con la tiroidectomia totale. Questa chirurgia a due stadi presenta sicuramente una morbilità maggiore di una tiroidectomia totale iniziale. [34-35] Nel nostro studio abbiamo affrontato specificamente questo punto selezionando casi citologicamente inconclusivi e valutando il contributo diagnostico

dei test molecolari. Nella nostra casistica di inconclusivi lo studio molecolare combinato di oncogeni come B-Raf e Ret o B-Raf e Gal-3 ha aumentato la corretta identificazione di casi che non possono avere diagnosi certa di PTC su prelievo con ago sottile. Dunque, un dato molecolare positivo può fornire un tassello di grande valenza biologica, tecnica e culturale utile nell'orientamento verso una diagnosi di benignità o malignità e soprattutto indirizzare verso una chirurgia più radicale.

Alla luce dei risultati e dei commenti esposti fino ad ora, quale può essere il contributo attuale dell'analisi molecolare nel management delle neoplasie tiroidee?

Se nei casi che non presentano particolari difficoltà diagnostiche morfologiche lo studio molecolare ha un significato più che altro prognostico ed eventualmente terapeutico, nei casi inconclusivi alcuni markers molecolari potrebbero essere di ausilio diagnostico. I dati riportati in letteratura evidenziano che un caso "inconclusivo sospetto di carcinoma papillifero" presenta un rischio del 30-50% di essere portatore di un PTC [36] mentre per le neoplasie follicolari il rischio di malignità è del 20%. [37] Dunque, tenendo conto di queste percentuali e di quelle con cui gli oncogeni descritti nel corso del nostro studio sono associati ai tumori tiroidei differenziati, la presenza del marker molecolare rappresenterebbe indicazione per una



tiroidectomia totale mentre l'assenza di markers giustificerebbe la ripetizione del prelievo o il follow-up. Naturalmente un approccio del genere richiede la legittimazione dell'uso dei marker molecolari grazie a dati basati su casistiche molto più ampie. Tuttavia l'approccio al nodulo tiroideo sospetto risente di numerose altre considerazioni e fortemente dipende dalla Istituzione e dalla capacità di stabilire un team realmente efficace tra endocrinologo, citopatologo e chirurgo. In altre parole solo la stretta collaborazione fra endocrinologo, citopatologo e chirurgo può portare all'intendimento che nei pochi casi in cui il FNC non riesce a raggiungere una diagnosi certa (nella nostra casistica il 7%), tale esame conserva un altissimo significato non come strumento diagnostico assoluto ma come valido test di screening, ossia come da ripetere nel tempo secondo le indicazioni della clinica. E tale ruolo di screening può essere tanto più efficace quanto più le metodiche molecolari potranno integrare il risultato morfologico.

In conclusione, i progressi degli studi di biologia molecolare forniscono la speranza di nuove e più sensibili modalità diagnostiche, terapeutiche e prognostiche che al momento stanno muovendo solo i loro primi passi. I meccanismi molecolari descritti in questa Tesi rappresentano probabilmente solo una piccola parte dei tanti eventi genetici implicati nella complessa cancerogenesi tiroidea. Ulteriori

studi sono pertanto necessari per chiarire gli eventi genetici coinvolti nell'insorgenza e nella progressione delle diverse neoplasie originanti dalle cellule follicolari della tiroide.

## **Bibliografia**

1. Sherman S. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003; 361: 501-11.
2. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1838-40.
3. Gharib H, Goellner JR. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med.* 1993; 118:282-289.
4. Baloch Z, LiVolsi VA, Jain P, Jain R, Aljada I, Mandel S, Langer JE, Gupta PK. Role of repeat fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in the management of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol.* 2003 Oct;29(4):203-6.
5. Fusco A, Greco M, Santoro M et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 1987; 328: 170-172.
6. Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A et al. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the ret/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 1996; 12:1821-26.
7. Santoro M, Sabino N, Ishizaka Y et al. Involvement of RET oncogene in human tumours: specificity of RET activation to thyroid tumours. *Br J Cancer.* 1993; 68: 460-464.
8. Jhiang SM, Mazzaferri EL. The ret/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma (review). *J Lab Clin Med* 1994; 123: 331-337.
9. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP et al. High prevalence of ret rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1995; 11: 2459-67.
10. Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ et al. Ret/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1995; 11:1207-1210.

11. Fusco A, Chiappetta G, Hui P et al. Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol.* 2002;160:2157-2167.
12. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G et al. Ret activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:370-379.
13. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L et al. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998;4:223-228.
14. Basolo F, Molinaro E, Agate L et al. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2001;145:599-604.
15. Fischer AH, Taysavang P, Jhiang SM. Nuclear envelope irregularity is induced by RET/PTC during interphase. *Am J Pathol.* 2003;163:1091-1100.
16. Musholt P, Imkamp F, von Wasielewski R et al. Ret rearrangements in archival oxyphilic thyroid tumors: new insights in tumorigenesis and classification of Hurthle cell carcinomas? *Surgery* 2003; 134: 881-9.
17. Wirtschafter A, Schmidt R, Rosen D et al. Expression of the ret/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 1997; 107: 95-100.
18. Ott RA, Mc Call AR, Mc Henry C et al. The incidence of thyroid carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Am Surg* 1997; 53:442-445.
19. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAf gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.

20. Cohen Y, Xing M, Mambo E et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J National Cancer Institute* 2003; 95: 625-7.
21. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 2003; 22:6455-7.
22. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Methab* 2003; 88: 5399-5404.
23. Soares P, Trovisco V, Rocha AS et al. BRAF mutations and ret/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; 22:4578-80.
24. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy (review). *J Endocrinol* 2004; 183: 249-256.
25. Wilhelm S, Chien DS. BAY 43-9006: preclinical data. *Curr Pharm Des* 2002; 8:2255-7.
26. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocitoplasmatic lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1673: 75-93.
27. Orlandi F, Saggiorato E et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Research* 1998; 58: 3015-3020.
28. Saggiorato E, et al. Gal-3 as a presurgical immunocyto-diagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001; 86: 5152-5158.
29. Bojunga J et al. Molecular detection of thyroid cancer: an update. *Clinical endocrinology* 2004; 61: 523-530.
30. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F, Santoro M. Analysis of BRAF Point

- Mutation and RET/PTC Rearrangement refines the Fine Needle Aspiration diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(10):5175-80.
31. Sapio MR, Posca D, Raggioli A, Guerra A, Marotta V, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Troncone G, Caleo A, Rossi G, Fenzi G, Vitale M Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007; 66(5):678-83.
  32. Saggiorato et al. Characterization of thyroid follicular neoplasms in fine needle aspiration cytologic specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinic applications. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 305-317.
  33. Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone P, Deandrea M, Motta M, Troncone G, Caleo A, Vallefucio P, Rossi G, Fenzi G e Vitale M. Combined analysis of galectin-3 and BRAF improve the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14 1089-1097.
  34. Udelsmann R, Chen H. The current management of thyroid cancer. *AdvSurg* 1999; 33: 1-27.
  35. Duren E, Duren M. Recurrent thyroid cancer. In: Clark OH, Duh QY et al. *Textbook of endocrine surgery.* Philadelphia: Saunders; 141-146.
  36. Chen H, Zeiger MA, Clark DP. Papillary carcinoma of thyroid: can operative management be based solely on fine needle aspiration? *J Am Coll Surg* 1997; 184: 605-610.
  37. Udelsman R. Thyroid cancer surgery. *Reviews in endocrine and metabolic disorders* 2000; 1: 155-163.

## TABELLA 1

### Screening di B-Raf

- Primers MASA:

fwd: BRAF (*MASA*) A 5'GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'

BRAF (*MASA*) T 5'GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3'

rev: BRAFeX15-Rev: 5' GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'

### Screening di Ret/PTC

- Primers dominio TK di Ret:

forward (12F) 5' TGGTTCTTGGAAAACTCTAG

reverse (12R) 5' CTTTCAGCATCTTCACGGCC

- Primers Ret/PTC 1:

forward H1B 5' AGCGCCAGCGAGAGCGACACG 3' (ex1 F)

reverse R1B 5' TACCCTGCTCTGCCTTTCAGATGG (ex12 R)

- Primers Ret/PTC 2:

fwd RET/PTC-2f 5'AGGGAGCTTTGGAGAACTTG 3' (ex1 F)

rev R1B 5' TACCCTGCTCTGCCTTTCAGATGG 3' (ex12 R)

- Primers Ret/PTC 3:

forward E1 5' AGGGAGCTTTGGAGAACTTG 3' (ex1 F)

reverse R1B 5' TACCCTGCTCTGCCTTTCAGATGG (ex12 R)

**TABELLA 2**

Citology	FNAB description	Genes found	Histology
48 benign	48 colloid nodule	48 none	18 benign 30 n.d.
46 inadequate	46 limited cellularity or poor preservation and fixation	46 none	26 benign 20 n.d.
21 indeterminate	13 without Hürthle cell change	11 none	10 benign 1 FTC
	8 with Hürthle cell change	2 <i>RET</i>	1 MTC 1 n.d.
16 suspicious for PTC	16 moderate to low cellularity and some features suggestive of PTC such as abundant nuclear folds but no pseudo-inclusions	8 none	8 benign
		1 <i>RET</i> / <i>PTC3</i>	1 PTC
		4 <i>BRAF<sup>V600E</sup></i>	4 PTC
		11 none	10 benign 1 PTC



### TABELLA 3

Endocrine-Related Cancer (2007) 14 1089–1097

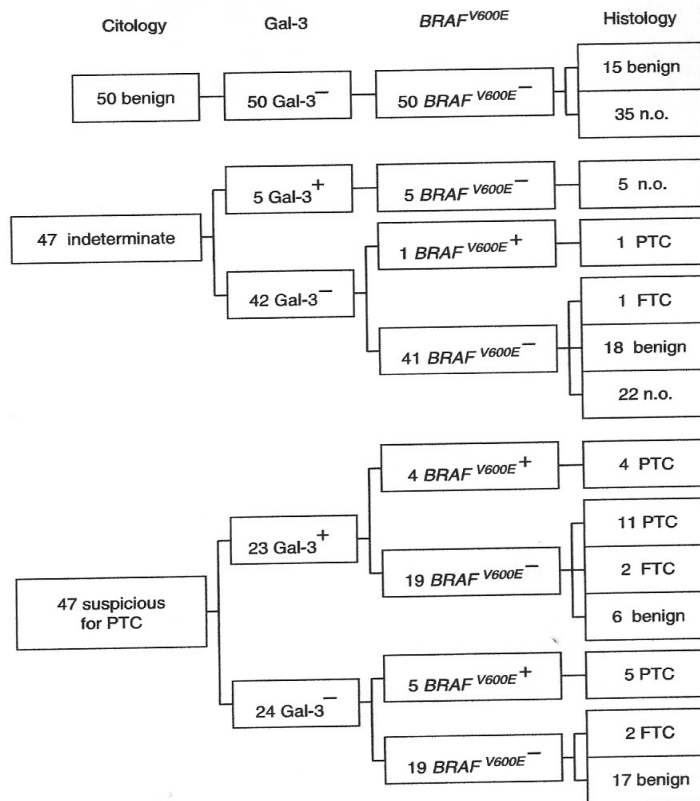


Figure 1 Gal-3 and *BRAF*<sup>V600E</sup> analysis in benign and indeterminate FNAB. n.o., not operated.

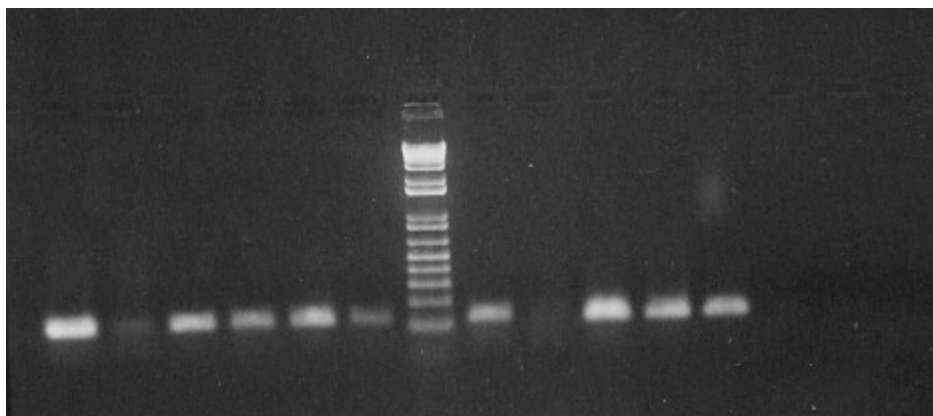
## TABELLA 4

**Table 3** Statistical analysis of single and combined markers in fine-needle aspiration biopsy (FNAB) suspicious for malignancy

	<b>SN</b>	<b>SP</b>	<b>Accuracy</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<i>BRAF</i> <sup>V600E</sup>	37.5	100	68.1	100	60.5
Gal-3	70.8	73.9	72.3	73.9	70.8
<i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> and Gal-3	16.6	100	57.4	100	53.5
Gal-3 and/or <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup>	91.7	73.9	83.0	78.6	89.5

SN, sensitivity; SP, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

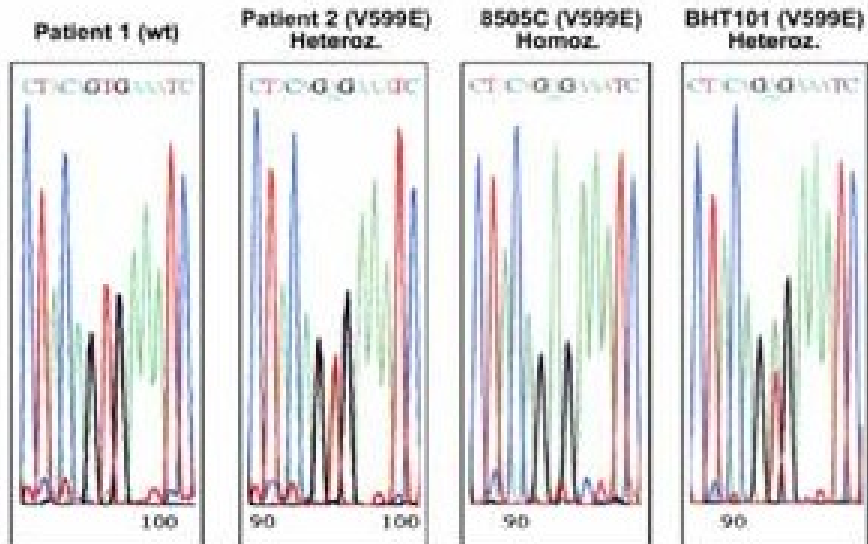
## FIGURA 1



T A T A T A M T A T A T A T A  
(1) (2) (3) (4) (5) (ARO) (-)

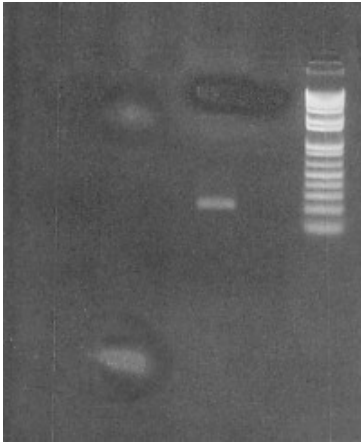
MASA PCR specifica per la transversione T1799A di B-Raf: le bande siglate T corrispondono alle PCR eseguite con i primers WT mentre le bande siglate A corrispondono ai primers recanti la mutazione T1799A. Ciascun caso (1-2-3-4-5) è evidenziato da due bande (T ed A) adiacenti. I casi 2, 3 e 5 recano la mutazione T1799A mentre i casi 1 e 4 sono WT. M marker, ARO linea cellulare non recante la mutazione, - - controllo negativo.

## FIGURA 2



Sequenza cromatografica del prodotto di PCR dell'esone 15 di B-Raf: il paziente 1 mostra sequenza WT mentre il paziente 2 mostra la transversione T-A in eterozigosi. Gli ultimi due cromatogrammi corrispondono a linee cellulari portatrici della mutazione V599E, rispettivamente in omozigosi ed eterozigosi, usate come controllo.

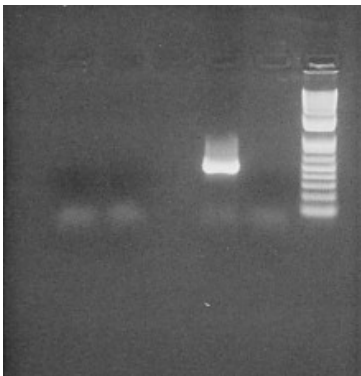
### **FIGURA 3A**



1 2 3 - M

RT-PCR con primers del dominio kinasico di Ret: solo il caso 3 presenta una banda corrispondente alla sequenza amplificata con i primers del dominio kinasico di Ret; il caso 2 presenta una banda aspecifica corrispondente all'accumulo dei primers stessi. – controllo negativo, M marker.

### **FIGURA 3B**



3 - M

nested RT-PCR con primers corrispondenti alla traslocazione Ret/PTC3: il campione 3, già positivo per l'espressione di Ret (figura 4A), presenta una banda specifica per la traslocazione Ret/PTC3.