

Tesi di dottorato di Nadia Passon, discussa presso l'Università degli Studi di Udine



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE
CLINICHE**

CICLO XXV

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**ANALISI DI CARCINOMI PAPILLIFERI TIROIDEI
MEDIANTE CGH-ARRAY**

Relatore
Prof. Giuseppe Damante

Dottoranda
Nadia Passon

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Indice

1. Introduzione	4
1.1 La tiroide	4
- 1.1.1 Fisiologia della tiroide	7
1.2 Tumori tiroidei	12
- 1.2.1 Diagnosi	16
- 1.2.2 Sistema i classificazione	18
- 1.2.3 Terapia e prognosi	19
- 1.2.4 <i>BRAF</i> e <i>RAS</i> nel carcinoma tiroideo papillifero	22
1.3 CGH-array	23
- 1.3.1 CGH e tumori tiroidei	26
2. Scopo della tesi	27
3. Materiali e metodi	28
3.1 Pazienti	28
3.2 Estrazione del DNA	28
3.3 Identificazione delle mutazioni attivanti <i>BRAF</i> e <i>RAS</i>	29
- 3.3.1 Amplificazione genomica (PCR)	29
- 3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio	30
- 3.3.3 Purificazione dei prodotti di PCR	30
- 3.3.4 Reazione di sequenza	30
- 3.3.5 Purificazione della reazione di sequenza	31
- 3.3.6 Elettroforesi capillare ed analisi dei risultati	32
3.4 CGH-array	32
- 3.4.1 Marcatura del DNA	32
- 3.4.2 Purificazione dei campioni marcati	33
- 3.4.3 Determinazione del grado di labeling e dell'attività specifica	33
- 3.4.4 Ibridazione	33
- 3.4.5 Lavaggi post-ibridazione	34

- 3.4.6 Lettura del vetrino	34
- 3.4.7 Analisi dell'immagine	35
- 3.4.8 Analisi dei dati ottenuti	36
- 3.4.9 Analisi delle aberrazioni comuni	37
3.5 Analisi delle correlazioni geniche	37
3.6 Validazione dei risultati aCGH	38
- 3.6.1 Real-time PRC quantitativa	38
- 3.6.2 Analisi e quantificazione	39
4. Risultati	40
5. Discussione	55
5.1 Geni presenti in aberrazioni somatiche comuni ai tumori T1 ed ai tumori T3	55
5.2 Geni presenti in aberrazioni somatiche specifiche dei tumori T1	62
5.3 Geni presenti in aberrazioni somatiche specifiche dei tumori T3	63
6. Considerazioni finali	67
6. Bibliografia	71
6.1 Siti Web	84
7. Appendice	85
7.1 Pubblicazioni inerenti l'argomento della tesi	85
7.2 Altre pubblicazioni	86

1. Introduzione

1.1 La tiroide

La tiroide è una ghiandola endocrina lobulata il cui ruolo fisiologico è estremamente importante nello sviluppo scheletrico e cerebrale, nonché nella regolazione del metabolismo corporeo e nello sviluppo di pelle, annessi cutanei e organi genitali. Descritta per la prima volta da Galeno, la sua denominazione dal greco *thyreoides* (a forma di lungo scudo) è stata coniata da Wharton nel 1656 ed è legata ai suoi rapporti topografici con la cartilagine tiroidea della laringe.

L'origine della ghiandola è endodermica. La parte quantitativamente più importante della tiroide deriva da un diverticolo dell'epitelio faringeo primitivo, nella stessa zona in cui si forma l'abbozzo della lingua. Durante la sua migrazione all'interno della porzione inferiore del collo la tiroide trascina con sé le paratiroidi, derivate da abbozzi della III e della IV tasca branchiale. Le cellule parafollicolari derivano invece dal corpo ultimo branchiale e si trovano sparse, oltre che nella tiroide, anche nel timo e nelle paratiroidi.

La tiroide è un organo impari situato nella regione anteriore del collo, alla base della gola, che avvolge la superficie anteriore della trachea subito al di sotto della cartilagine tiroidea della laringe. In ragione della sua localizzazione essa può essere facilmente percepita alla palpazione (Fig.1.1A).

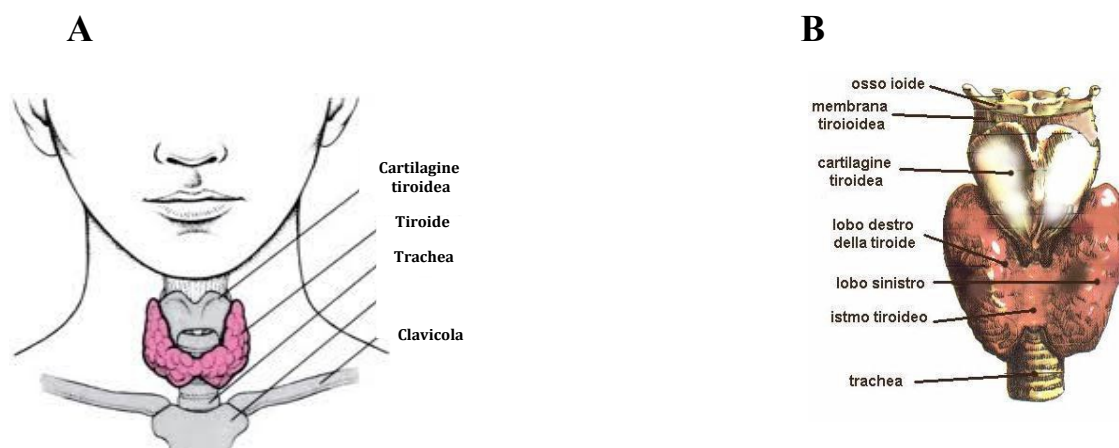


Figura 1.1. Localizzazione (A) e struttura (B) della tiroide

Il peso medio di questa ghiandola alla nascita è di circa 2 g, raggiunge mediamente nell'adulto i 20 g. Peso e dimensioni variano in relazione all'età (calano con l'invecchiamento), al sesso (sono superiori negli uomini) e alle modificazioni ormonali (pubertà, gravidanza, allattamento, fase del ciclo mestruale, menopausa).

La tiroide ha un tipico aspetto "a farfalla" le cui ali corrispondono ai due lobi uniti medialmente da un istmo (Fig.1.1B). Con una frequenza che oscilla tra il 30 e il 50 % è possibile apprezzare un sottile prolungamento che si origina dall'istmo, il lobo piramidale di Morgagni. Si tratta del residuo del dotto tireoglosso, ossia del dotto che nel feto congiunge la tiroide alla lingua.

La porzione superiore di ciascun lobo si estende dalla superficie anterolaterale della trachea alla superficie inferiore della cartilagine tiroide; la porzione inferiore termina invece a livello del II-III anello tracheale cui aderisce mediante la guaina peritiroidea.

Anteriormente e lateralmente la tiroide è ricoperta dai muscoli sottoioidei e sternocleidomastoidei che definiscono uno spazio anatomico chiamato loggia tiroidea; la ghiandola è in rapporto anatomico di vicinanza tra l'altro con due importanti strutture: i nervi ricorrenti e le paratiroidi.

I nervi ricorrenti o laringei inferiori innervano la maggior parte dei muscoli della laringe mentre le paratiroidi, generalmente presenti in numero di quattro, due superiori e due inferiori, sono piccoli organi endocrini deputati alla secrezione del paratormone.

La tiroide è circondata da una capsula fibrosa che mediante la guaina peritiroidea prende contatto con la laringe e la trachea oltre che con i fasci nervosi e vascolari della regione del collo. Tra la guaina peritiroidea e la capsula fibrosa esiste uno spazio in cui decorrono i vasi. Dalla capsula fibrosa si originano sottili setti connettivali che si approfondano nel tessuto ghiandolare, suddividendolo in lobuli e all'interno dei quali decorrono vasi ematici, linfatici e i nervi.

La ghiandola è irrorata dalle arterie tiroidee superiore (ramo della carotide esterna) e inferiore (ramo del tronco tireocervicale). Il ritorno venoso è invece a carico delle vene tiroidee superiore e media, tributarie della vena giugulare interna, e della vena tiroidea inferiore, che confluisce nelle vene brachioencefaliche. Sepimenti connettivali circondano anche le unità funzionali della tiroide: i follicoli, il cui diametro varia da 0,02 a 0,9 mm. I follicoli sono rivestiti da un epitelio cubico semplice che delimita la cavità follicolare contenente una sostanza omogenea e gelatinosa ad alta concentrazione proteica detta colloide (Fig.1.2).

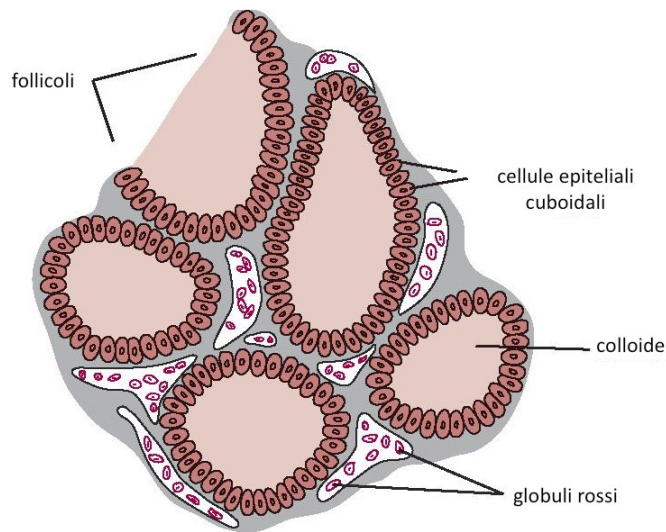


Figura 1.2. Rappresentazione della struttura microscopica della ghiandola tiroide (Guyton R *et al.*, 2000)

Questa rappresenta la forma di accumulo del prodotto dell'attività secretoria delle cellule che costituiscono il follicolo. La forma delle cellule, nonché la quantità e la consistenza della colloide, variando notevolmente in rapporto allo stato funzionale della ghiandola (Molinaro *et al.*, 1992).

La funzione dei follicoli tiroidei è quella di sintetizzare, accumulare e secernere gli ormoni tiroidei.

Ciascun follicolo è infatti circondato da una rete capillare all'interno della quale si riversano gli ormoni tiroidei.

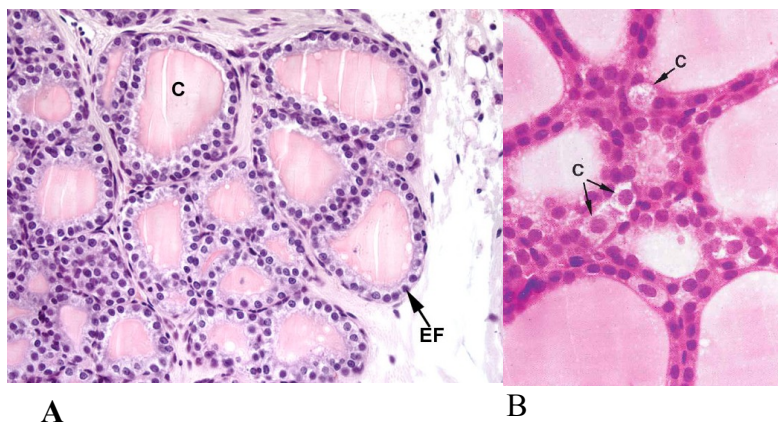


Figura 1.3. Sezioni istologiche di tiroide (E/E). (A) La struttura follicolare. C: colloide; EF: epitelio follicolare (B) Dettaglio delle cellule parafollicolari o cellule C. C: cellule C (<http://host.uniroma3.it>).

Sono due i tipi cellulari che costituiscono la parete follicolare e che, come già detto, si caratterizzano anche per una diversa origine embriologica: le cellule follicolari vere e proprie o tireociti o tirociti e le cellule parafollicolari o cellule C (Fig.1.3).

Le cellule follicolari poggiano sulla membrana basale e delimitano il lume follicolare; presentano piccole gocce di colloide nel loro citoplasma e mostrano una distinta polarità. Dal polo luminale, la cui superficie è caratterizzata da numerosi microvilli, secernono nella cavità follicolare la tireoglobulina (Tg) mentre dal polo rivolto verso la lamina basale liberano l'ormone tiroideo nei capillari.

Come tutte le cellule che secernono attivamente sostanze proteiche sono particolarmente ricche in mitocondri e reticolo endoplasmatico rugoso (Molinari *et al.*, 1992).

Tra le cellule cubiche che rivestono il follicolo vi sono anche le cellule parafollicolari che pur poggiando sulla membrana basale non raggiungono il lume. Sono più scure e più grandi delle cellule follicolari e sono deputate alla produzione dell'ormone calcitonina. Tale ormone è responsabile del controllo della concentrazione ematica del calcio in particolare nelle situazioni di stress quali inedia (fame) o durante la gravidanza.

La calcitonina induce un abbassamento della calcemia tramite l'inibizione degli osteoclasti e la stimolazione dell'escrezione di calcio da parte del rene. Azione antagonista alla calcitonina è svolta invece dal paratormone, ormone secreto dalle ghiandole paratiroidi.

1.1.1 Fisiologia della tiroide

Come già detto, la tiroide svolge un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo intermedio di tutti i tessuti ed è di fondamentale importanza per lo sviluppo del sistema nervoso centrale nel feto e nel neonato. Tali effetti si esplicano nella capacità della ghiandola di concentrare lo iodio ed utilizzarlo per la sintesi degli ormoni tiroidei.

La tiroide ha un comportamento peculiare rispetto alle altre ghiandole endocrine: mentre queste immagazzinano solo piccole quantità di ormoni in sedi intracellulari, la tiroide è in grado di accumulare grandi quantità di ormone tiroideo in compartimenti extracellulari, i follicoli per l'appunto.

Lo iodio è la componente essenziale degli ormoni tiroidei T₃ (triiodotiroinina) e T₄ (tiroxina o tetraiodotironina), unici ormoni contenenti iodio nei vertebrati.

Il precursore degli ormoni tiroidei è l'amminoacido tirosina che a sua volta deriva dall'idrossilazione della fenilalanina. Quest'ultimo è un amminoacido essenziale, in quanto l'organismo non è in grado di sintetizzarlo, ma deve necessariamente essere introdotto con l'alimentazione (Di Prampero *and* Veicsteinas, 2002).

La biosintesi degli ormoni tiroidei avviene nei follicoli, le unità funzionali della ghiandola, il cui lume è riempito dalla colloide (Kopp, 2005). Il principale costituente della colloide è rappresentato dalla tireoglobulina (Tg), la più abbondante proteina tiroide-specifica. Si tratta di una glicoproteina omodimerica di circa 660 kDa che funge da impalcatura per la sintesi degli ormoni tiroidei (Arvan *and* Di Jeso, 2005)

La Tg viene sintetizzata nei ribosomi dei tireociti in catene polipeptidiche singole con peso molecolare di 330 kDa che si combinano mediante legame covalente in dimeri. Le molecole di Tg prodotte vengono trasferite all'apparato di Golgi dove vengono glicosilate ed immagazzinate in vescicole. Queste migrano verso la membrana apicale delle cellule follicolari e per esocitosi riversano la Tg nel lume follicolare. La sintesi degli ormoni tiroidei richiede l'*uptake* dello iodio attraverso la membrana basolaterale dei tireociti, il suo trasporto attraverso le cellule e l'efflusso attraverso la membrana apicale nel lume follicolare (Bizhanova *and* Kopp, 2009).

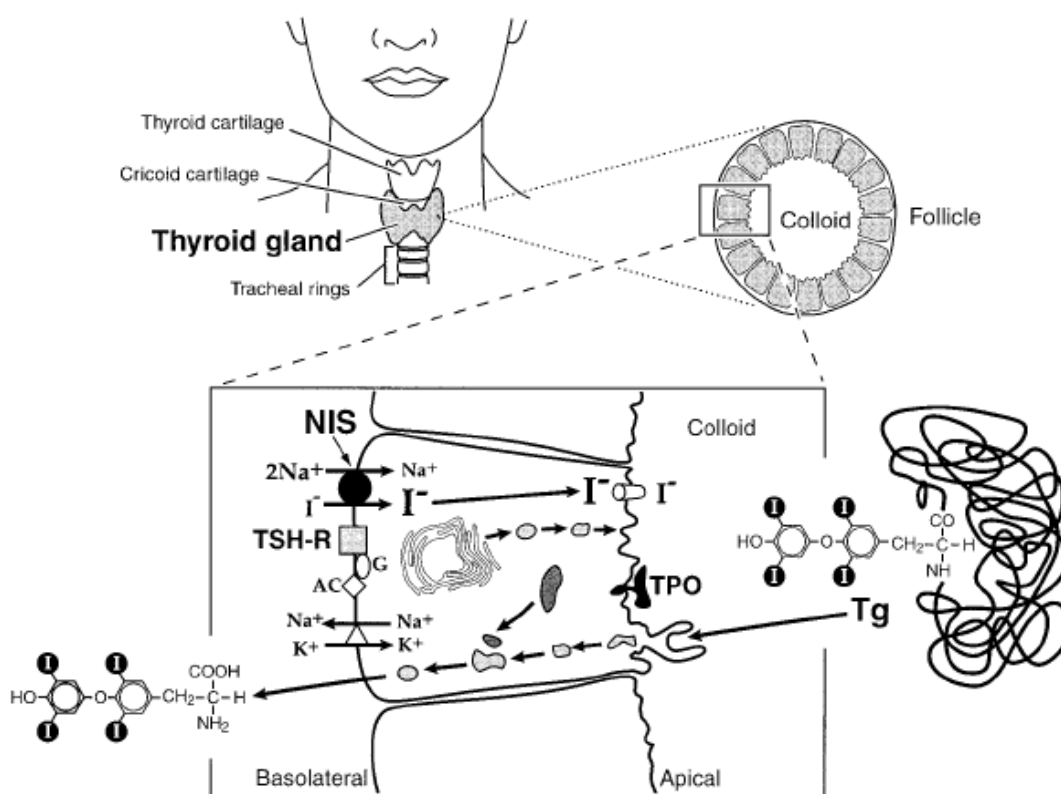


Figura 1.4. Rappresentazione schematica della pathway biosintetica degli ormoni tiroidei (De la Vieja *et al.* 2000.)

L'*uptake* dello iodio è mediato da una glicoproteina intrinseca di membrana, il simportatore Na^+/I^- (NIS) (Fig.1.4). In tutti i tessuti in cui è funzionalmente espresso, NIS cotrasporta due ioni sodio assieme ad uno ione iodio simultaneamente e nella stessa direzione, contro gradiente elettrochimico, utilizzando il gradiente sodico come forza motrice (Dohàn *et al.*, 2003).

L'energia necessaria per generare il gradiente transmembrana di sodio è fornita dalla *ouabain-sensitive* Na^+,K^+ -ATPase (Bagchi *and* Fawcett, 1973; De la Vieja *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 1984a; Dohàn *et al.*, 2003). L'accumulo dello iodio NIS-mediato viene bloccato da inibitori competitivi specifici quali gli ioni tiocianato e perclorato (Dohàn *et al.*, 2003; Nagataki *and* Yokohyama, 1996; Eskandari *et al.*, 1997); è invece stimolato dall'ormone tireostimolante (TSH) (Vassart *and* Dumont, 1992; Weiss *et al.*, 1984b).

Dopo essere stato trasportato attivamente attraverso la membrana basolaterale lo ione ioduro, che all'interno della cellula follicolare diffonde rapidamente secondo il gradiente di concentrazione, viene traslocato attraverso la membrana apicale nella

colloide in parte ad opera della pendrina, un trasportatore Cl^-/I^- (Scott *et al.*, 1999).

Una volta che lo iodio ha raggiunto l'interfaccia cellula-colloide viene ossidato e incorporato in residui tirosinici selezionati lungo lo scheletro della tireoglobulina all'interno della colloide.

Tale reazione, denominata "organizzazione dello iodio" (Taurog, 2000), è catalizzata da un enzima tiroide-specifico, la tireoperossidasi (TPO), in presenza di perossido di idrogeno generato dal metabolismo ossidativo della cellula ed in particolare da un'ossidasi di tipo 2 (DUOX2) calcio-dipendente (De Deken *et al.*, 2000).

Dalla reazione si formano mono e diiodotirosine (MIT e DIT).

L'ossidazione dello iodio è indispensabile affinché esso si leghi ai residui tirosinici della Tg. I residui di tirosina sono circa 120 per molecola ma solo una piccola parte di essi è iodata. Si stima che una molecola di tireoglobulina contenga da 20 a 30 atomi di iodio (Di Prampero *and* Veicsteinas, 2002).

La condensazione delle iodotirosine MIT e DIT genera diverse iodotironine tra le quali T_3 e T_4 che rimangono legate alla Tg.

Per condensazione di due molecole di DIT si forma la tetraiodotironina o tiroxina (T_4) mentre per condensazione di una molecola di DIT e una di MIT si forma la triiodotironina (T_3). La T_4 è il principale prodotto della tiroide ma la forma ormonale più attiva è rappresentata dalla T_3 .

Gli ormoni tiroidei T_3 e T_4 vengono immagazzinati nella colloide. Anche questa reazione è sotto il controllo dell'enzima TPO.

In risposta alla domanda di ormoni tiroidei segnalata dal rilascio di TSH da parte della ghiandola pituitaria, la tireoglobulina viene incorporata dalle cellule follicolari.

I tireociti, una volta stimolati, formano sulla superficie plasmatica luminale numerosi microvilli con cui riassorbono per pinocitosi porzioni di Tg. Le gocce di colloide migrano quindi verso la regione basale delle cellule e si fondono con i lisosomi tiroidei.

In seguito all'idrolisi fagolisosomiale della Tg iodinata endocitata, le iodotironine vengono liberate nel citoplasma. Gli ormoni tiroidei T_3 e T_4 vengono quindi rilasciati nel liquido interstiziale e da qui nel circolo ematico dove si legano a proteine plasmatiche deputate al loro trasporto.

Meno dell'1% degli ormoni tiroidei rimane in forma libera nel plasma.

Le proteine plasmatiche deputate al loro trasporto sono: una glicoproteina specifica che lega T_3 e T_4 con alta affinità (*thyroid hormone binding globulin*, TBG), una

prealbumina (*thyroxine-binding prealbumin*, TBA) legante soprattutto la T₄ (20% circa) e l'albumina plasmatica (10% T₄ e 30 % T₃).

Una piccola ma significativa porzione di ormoni è associata alle lipoproteine, LDL in particolare. Le T₃ e T₄ legate alle proteine plasmatiche, inattive, rappresentano una forma di deposito degli ormoni tiroidei in equilibrio dinamico con le loro frazioni libere, le uniche metabolicamente attive e quindi capaci di esercitare i loro effetti sulle cellule bersaglio.

Le iodotirosine inattive liberate dall'idrolisi della Tg vengono private dello iodio ad opera delle deiodinasi tiroidee. Lo iodio così liberato entra a far parte del *pool* intracellulare e verrà riutilizzato nella sintesi ormonale (Di Prampero *and* Veicsteinas, 2002).

La sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei sono sotto il controllo dell'ipotalamo e dell'ipofisi. Il principale regolatore positivo è rappresentato dalla tireotropina ipofisaria (TSH o ormone stimolante la tiroide) che interagisce col recettore del TSH presente sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari. Il rilascio del TSH è regolato a sua volta dal tripeptide ipotalamico (TRH o ormone liberante la tireotropina).

Il TSH secreto dall'ipofisi stimola il trofismo e le funzioni delle cellule follicolari. L'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide agisce attraverso un meccanismo a *feedback* negativo.

Al diminuire infatti dei livelli plasmatici degli ormoni tiroidei, l'ipotalamo, attraverso il TRH, stimola l'ipofisi a secernere il TSH che a sua volta induce l'attivazione delle cellule follicolari tiroidee. Quando invece i livelli ormonali sono elevati l'asse agisce in senso opposto inibendone la sintesi e la secrezione.

Ovviamente lo stesso iodio plasmatico influenza la sintesi degli ormoni tiroidei.

La carenza di iodio determina una sintesi inadeguata degli ormoni provocando un'ipersecrezione di TSH e il conseguente ingrossamento della ghiandola (gozzo).

Come già anticipato, gli ormoni tiroidei hanno un'azione ad ampio spettro e sono importanti sia durante lo sviluppo, dalla fase fetale a quella postnatale, sia nell'età adulta in cui svolgono un ruolo centrale nella regolazione generale del metabolismo energetico.

Influenzano infatti il metabolismo glucidico stimolando l'utilizzo del glucosio, in particolare nel muscolo e nel tessuto adiposo; per quanto riguarda il metabolismo lipidico, favoriscono la sintesi dei trigliceridi e degli acidi grassi dal glucosio, la sintesi e l'ossidazione del colesterolo e la conversione del colesterolo e sali biliari; mantengono

infine in bilancio il metabolismo proteico in condizioni eutiroidee stimolando invece, quando gli ormoni sono in eccesso, la proteinolisi e il catabolismo proteico a livello di muscolo scheletrico (Di Prampero *and* Veicsteinas, 2002).

Le IDD (*iodide deficiency disorders*) rappresentano un importante problema sanitario e sono una diretta conseguenza dell'insufficiente apporto di iodio con la dieta (Delange, 1994). Le manifestazioni cliniche includono ipotiroidismo, gotta, nanismo, alterato sviluppo neurologico e cretinismo (la forma più severa di IDD) (Riedel *et al.*, 2001).

Tra esse vanno annoverate le ITD (*I transport defect*), alterazioni congenite del trasporto dello iodio, che rappresentano una rara causa di ipotiroidismo congenito (CH). Questa condizione ha una frequenza di circa 1 su 3000 nuovi nati e ha degli effetti deleteri irreversibili sullo sviluppo del neonato; conduce infatti, se non trattato, a difetti neurologici (cretinismo).

La principale causa di CH è la disgenesia tiroidea (85-90%) nella cui eziologia i fattori di trascrizione TTF-1, TTF-2 e Pax-8 hanno un ruolo importante. Alterazioni congenite nell'ormonogenesi tiroidea sono responsabili del 10-15% di casi di CH. Mutazioni a carico di geni tiroide-specifici quali TPO, Tg, TSH-R, pendrina e NIS sono annoverate tra le cause di ipotiroidismo congenito e hanno tipicamente eredità autosomica recessiva (Eizaguirre *and* Santisteban, 2006).

1.2 Tumori tiroidei

Il cancro alla tiroide rappresenta la neoplasia endocrina maligna più comune.

E' comunque una condizione rara, costituisce infatti circa l'1% di tutti i tumori umani (Carlomagno *and* Santoro, 2011). Per ragioni non ancora ben chiarite risulta essere circa 3-4 volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini (Brown *et al.*, 2011). In Italia l'incidenza, ossia il numero di nuovi casi per anno, è di 4.1 casi ogni 100.000 abitanti per gli uomini e 12.5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti per quanto riguarda le donne.

L'incidenza risulta essere massima tra i 25 e i 65 anni; per quanto il tumore possa presentarsi in tutte le fasce d'età risulta essere estremamente raro al di sotto dei 16 anni.

Tra i principali fattori di rischio si identificano: predisposizione genetica (in particolare per alcune forme di carcinoma midollare), esposizione a radiazioni ionizzanti soprattutto in età infantile, preesistenza di patologie tiroidee quali gozzo, noduli benigni

o malattie autoimmuni, fattori ormonali (es. gravidanza), fattori legati alla dieta ed un apporto alterato di iodio (www.airc.it).

Condizione clinica assai frequente è rappresentata dalla presenza di noduli o tumefazioni a livello della ghiandola. Solo raramente questi hanno caratteristiche di malignità (5%). Nella maggior parte dei casi si tratta di lesioni benigne che solo raramente sono sintomatiche. Solo in una minoranza di pazienti si instaura infatti un quadro sintomatologico tipico della tireotossicosi (eccesso di ormoni tiroidei) o i noduli crescono a tal punto da creare problemi di fonazione o deglutizione.

Il cancro alla tiroide può originare sia dalle cellule follicolari che dalle cellule non-follicolari.

Più del 98% dei casi di tumore maligno della tiroide è riconducibile ad uno di questi quattro istotipi (www.thyroidmanager.org):

- carcinoma papillifero
- carcinoma follicolare
- carcinoma anaplastico
- carcinoma midollare

Ciascun istotipo possiede caratteristiche istologiche peculiari che correlano, seppure non in maniera assoluta, con le caratteristiche cliniche ed epidemiologiche.

I carcinomi che originano dalle cellule follicolari includono il carcinoma papillifero (PTC, 80%), il carcinoma follicolare (FTC, 15%), il cancro a cellule di Hürthle (HCC, 3%) e il carcinoma anaplastico (ATC, 2%).

PTC e FTC costituiscono nell'insieme la grande maggioranza dei tumori tiroidei e sono definiti carcinomi differenziati (DTC). I carcinomi differenziati a loro volta sono suddivisi in carcinomi ben differenziati (WDTC, *well-differentiated thyroid carcinoma*) e carcinomi poco differenziati (PDTC, *poor-differentiated thyroid carcinoma*).

HCC viene spesso classificato a parte, dal momento che ha un aspetto istologico caratteristico e spesso è scarsamente responsivo alla terapia *standard*. Similmente all'HCC, diversi sottotipi di DTC, quali il cancro colonnare o insulare, sono ritenuti più aggressivi.

A differenza dei DTC, gli ATC rappresentano i tumori tiroidei non differenziati.

Il carcinoma midollare (MTC) origina invece dalle cellule C (non follicolari) calcitonina-secerenti (Brown *et al.*, 2011).

Il carcinoma papillifero è l'istotipo più diffuso (70-80%). Può presentarsi a qualsiasi età, ma è più frequente tra i 30 e i 50 anni. E' caratterizzato dalla prognosi migliore, soprattutto se al momento della diagnosi non vi è presenza di metastasi.

Tipicamente la lesione tende a rimanere localizzata, ma col tempo può diffondersi attraverso le vie linfatiche metastatizzando preferenzialmente a livello di linfonodi cervicali e sovramediastinici. Lesioni secondarie possono interessare anche ossa e polmoni. Il grado di malignità tende quindi ad aumentare con l'età.

Dal punto di vista istologico è un tumore di origine epiteliale e le cellule neoplastiche tendono a crescere raccolte attorno al nucleo fibrovascolare formando strutture follicolari e papillifere (Fig.1.5B). Un'altra peculiarità riguarda la presenza di anomalie nucleari nelle cellule tumorali. Nel 20% dei soggetti affetti sono osservabili foci multipli distribuiti nel parenchima ghiandolare.

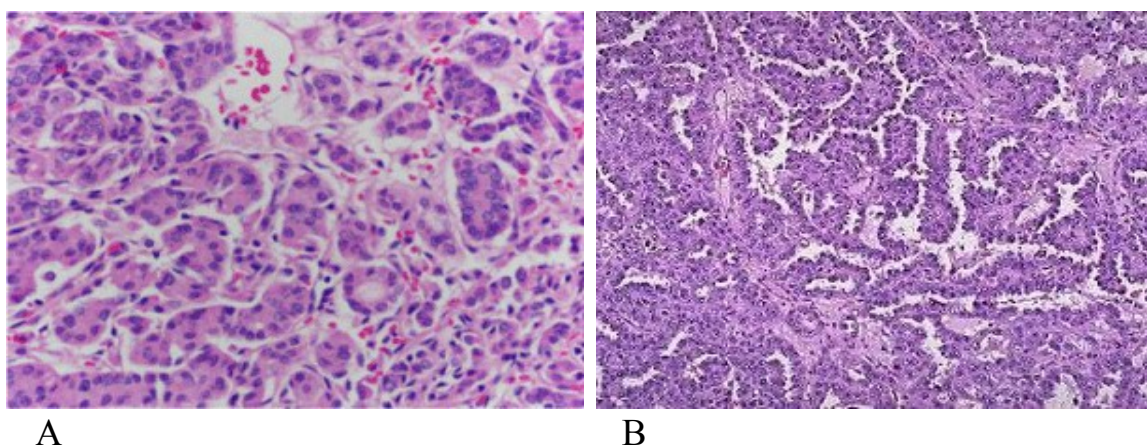


Figura 1.5. Sezioni istologiche di carcinoma tiroideo follicolare (A) (Moscatto *et al.*, 2012) e di carcinoma tiroideo papillifero (B) (http://fitsweb.uhc.edu/student/selectives/Luziotti/Thyroid_malignant.htm)

Il carcinoma follicolare rappresenta il 5-15% dei tumori tiroidei e risulta essere più diffuso nelle regioni in cui l'apporto di iodio con la dieta è insufficiente.

La lesione appare circondata da una capsula ma le cellule sono spesso in grado di invaderla e di metastatizzare per via ematica in distretti lontani quali ossa e polmoni. Istologicamente la neoplasia si caratterizza per la presenza di strutture follicolari ben definite; in altri casi le cellule si dispongono invece in lamine solide (Fig.1.5A). Di

norma si tratta di noduli solitari di dimensioni superiori rispetto a quelli di tipo papillifero.

Sia il carcinoma papillifero che quello follicolare sono tumori di tipo differenziato e quindi caratterizzati nella maggior parte dei casi da una prognosi più favorevole rispetto al carcinoma anaplastico; il carcinoma follicolare, che metastatizza tipicamente per via ematica, è comunque più aggressivo rispetto all'istotipo papillifero.

In alcuni casi il carcinoma papillifero può trasformarsi in carcinoma indifferenziato/anaplastico ed avere quindi un rapido decorso letale (Khan *et al.*, 2010).

Il carcinoma anaplastico costituisce meno del 5% dei tumori tiroidei. Risulta essere più frequente nei soggetti anziani (oltre i 60 anni) e leggermente più prevalente nella popolazione di sesso femminile. E' l'istotipo caratterizzato dal maggiore grado di aggressività.

La massa tumorale tende a crescere rapidamente invadendo le strutture anatomiche vicine (trachea, esofago, mediastino) causando difficoltà nella deglutizione e nella respirazione. La prognosi è spesso infausta e la morte sopraggiunge dopo 6 mesi circa dalla diagnosi.

Come emerge dalla denominazione stessa del tumore, le cellule neoplastiche hanno perso parzialmente o completamente il fenotipo differenziato. Il tumore risulta essere costituito infatti da cellule fusiformi miste a cellule giganti (Fig.1.6A).

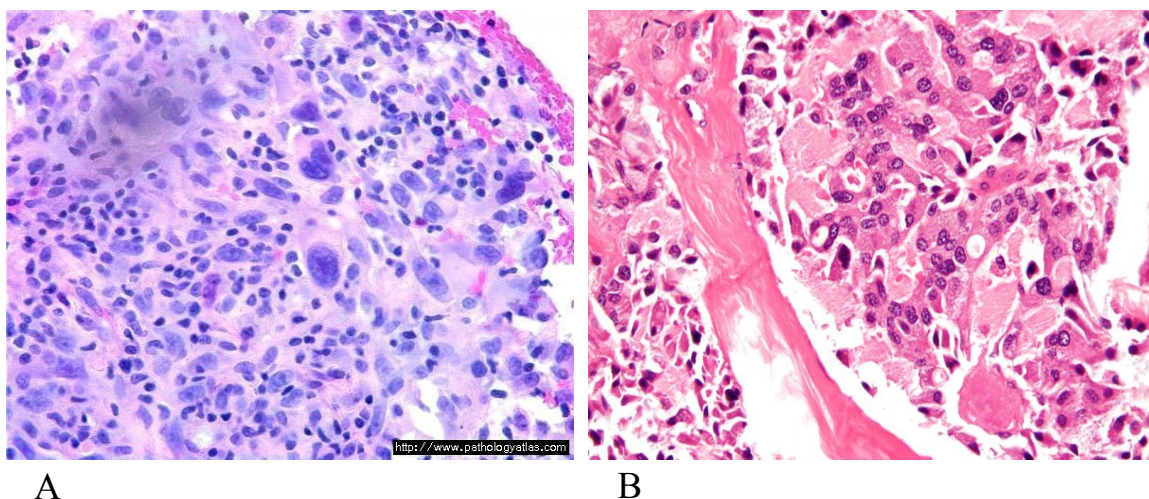


Figura 1.6. (A) Dettagli di carcinoma anaplastico (<http://www.pathologyatlas.com>) e (B) di carcinoma midollare (<http://upload.wikimedia.org>)

Il carcinoma midollare rappresenta circa il 5% dei tumori tiroidei e deriva dalle cellule

parafollicolari calcitonina-secerenti (Fig.1.6B). Per quanto riguarda questo istotipo la calcitonina, secreta ad un livello superiore rispetto a quello basale, costituisce un vero e proprio *marker* tumorale.

Il tumore è generalmente sporadico ma nel 15% dei casi gli si riconosce un'origine di tipo familiare. Si riconoscono in particolare il carcinoma midollare tiroideo familiare (FMTC) e le neoplasie endocrine multiple di tipo 2 (MEN2). Si tratta di sindromi a trasmissione autosomica dominante causate da mutazioni germinali del protooncogene *RET*, situato sul braccio lungo del cromosoma 10.

La prognosi varia a seconda che si tratti di tumore sporadico o familiare. In generale si tratta di un tumore scarsamente differenziato e quindi con aggressività maggiore rispetto ai tumori differenziati. La prognosi è peggiore in caso di presenza di metastasi; il tumore può metastatizzare sia per via ematica che linfatica.

1.2.1. Diagnosi

La maggior parte dei tumori tiroidei è asintomatica e spesso la scoperta del tumore avviene casualmente durante l'esecuzione di esami tesi ad accertare l'eventuale presenza di altre patologie (TAC, RMN, etc.). In altri casi il soggetto si accorge della presenza di una tumefazione nella regione anteriore del collo che si muove con i movimenti della deglutizione; se la lesione è già di dimensioni notevoli il paziente può già accusare disturbi alla respirazione e alla deglutizione.

I noduli alla tiroide rappresentano un'entità clinica piuttosto comune. "Nodulo" è un termine generico e che può rappresentare la manifestazione di un ampio spettro di malattie differenti. Può trattarsi di iperplasia ghiandolare spontanea o conseguente a tiroidectomia parziale; la tiroidite cronica autoimmune di Hashimoto può presentare pseudonoduli, può essere rappresentazione di infiltrazione linfocitaria; può trattarsi di cisti o di lesioni focali di tipo benigno e solo in una minoranza di casi il nodulo è di carattere maligno. I noduli benigni presentano generalmente un'architettura ordinata con poche mitosi e assenza di invasione linfatica o ematica. Sono di norma circondati da una capsula fibrosa.

La prima valutazione del medico consiste in un'accurata raccolta anamnesica e in un attento esame obiettivo, in particolare della regione del collo. Elementi che fanno sospettare la natura neoplastica già a livello di anamnesi sono rappresentati da:

familiarità per carcinoma midollare tiroideo o per neoplasie endocrine multiple (MEN), pregressa terapia radiante sulla regione testa-collo, storia di tumore maligno in alta sede e crescita rapida del nodulo.

Il sospetto clinico di malignità a livello di esame obiettivo si basa sulla presenza di uno o più tra i seguenti sintomi e segni: consistenza elevata, margini irregolari, mobilità scarsa rispetto alle strutture adiacenti, disfonia, disfagia, dispnea e linfadenomegalie in sede latero-cervicale.

La presenza di noduli alla tiroide deve sempre essere approfondita dal momento che l'esame obiettivo non consente di discriminare tra lesioni benigne o maligne.

Gli esami di laboratorio risultano essere poco informativi dal punto di vista diagnostico; tipicamente i valori del TSH e degli ormoni tiroidei, in presenza di tumore, sono comunque nella norma.

L'unica eccezione è rappresentata dal carcinoma midollare e dall'utilità in questo caso del dosaggio della calcitonina. Tale istotipo origina infatti dalle cellule calcitonina-secerenti e la concentrazione della calcitonina in presenza del tumore risulta essere proporzionale alle dimensioni della massa tumorale stessa. Sfortunatamente il *test* è caratterizzato da un elevato numero di falsi positivi e per questo ritenuto controverso.

Gli esami più importanti dal punto di vista diagnostico sono quelli strumentali ovvero l'ecografia, la scintigrafia e l'ago aspirato.

L'ecografia è in grado di evidenziare la presenza di noduli anche molto piccoli e consente di valutarne le caratteristiche (nodulo solido, liquido o misto; ipoecogeno, iperecogeno o isoecogeno; con margini definiti o indefiniti, presenza o meno di calcificazioni); sfortunatamente non è in grado di discriminare tra lesioni benigne e maligne. La scintigrafia tiroidea consente invece di distinguere tra noduli "caldi" o "freddi" a seconda della loro capacità di captare e concentrare lo radioiodio rispetto al parenchima circostante. I noduli "freddi" rappresentano l'80% dei noduli tiroidei. Per quanto non siano sinonimo di neoplasia maligna l'incidenza di carcinoma in queste lesioni raggiunge il 25% in alcune casistiche. I noduli caldi rappresentano fino al 20% dei noduli tiroidei, sono più frequenti nelle aree a carenza iodica e sono maligni solo in rarissimi casi.

La procedura elettiva per la valutazione dei noduli tiroidei è la biopsia con ago aspirato (FNA, *fine needle aspiration*). Mediante un ago sottile si preleva un numero discreto di cellule del nodulo che vengono poi sottoposte a diagnosi citologica. Peraltro, la biopsia

FNA non sempre riesce a discriminare tra Cancro Follicolare (lesione maligna) ed Adenoma Follicolare (lesione benigna).

1.2.2 Sistema di classificazione

L'applicazione del sistema di classificazione AJCC (American Joint Committee on Cancer)/International Union against Cancer (UICC) è basata su parametri TNM ed età ed è raccomandata per tumori di tutti i tipi (Brierley *et al.*, 1997; Loh *et al.*, 1997), in quanto costituisce un metodo utile e immediato per descrivere l'estensione del tumore (Wittekind *et al.*, 2002). Questa classificazione è anche usata per i registri ospedalieri dei carcinomi e per gli studi epidemiologici. La stadiazione è utilizzata, tra l'altro, per permettere una comunicazione accurata riguardante il paziente tra le varie figure professionali mediche. Il sistema di stadiazione permette altresì la valutazione di differenti strategie terapeutiche applicate a gruppi di pazienti comparabili negli studi clinici. Altri schemi sono stati sviluppati per raggiungere una più accurata stratificazione del rischio, inclusi i sistemi che tengono conto di una serie di fattori identificati come prognostici per l'esito clinico in analisi multivariate di studi retrospettivi. Tra quelli considerati generalmente più predittivi sono la presenza di metastasi a distanza, l'età del paziente e l'estensione del tumore. Il sistema TNM codifica l'estensione del tumore primario (T), l'interessamento dei linfonodi loco-regionali (N) e la presenza di metastasi a distanza (M) e fornisce, sulla base di questi parametri anatomici, la definizione dello stadio.

Sistema di Sistema di classificazione TNM per il carcinoma differenziato della tiroide (Greene FL, 2002).

Definizione

T1 Diametro tumorale ≤ 2 cm

T2 Diametro tumorale > 2 cm, fino a 4 cm

T3 Diametro tumorale > 4 cm, intra-tiroideo o con minima estensione extratiroidea

T4a Tumore di qualunque dimensione, che supera la capsula tiroidea, con invasione di tessuti molli peri-tiroidei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente

T4b Tumore che invade la fascia prevertebrale, o ingloba la carotide interna o i vasi mediastinici

TX Diametro maggiore sconosciuto, ma senza estensione extratiroidea

- N0** Assenza di metastasi linfonodali
N1a Metastasi linfonodali del livello VI (pre-tracheali, paratracheali e linfonodo prelaringo/ Delfico)
N1b Metastasi dei linfonodi cervicali unilaterali, bilaterali, controlaterali o del mediastino superiore
NX Linfonodi non accertati chirurgicamente
M0 Assenza di metastasi a distanza
M1 Presenza di metastasi a distanza
MX Metastasi a distanza non accertate

<i>Stadi</i>	<i>Età pazienti <45 anni</i>	<i>Età pazienti ≥45 anni</i>
Stadio I	T qualunque, N qualunque, M0	T1, N0, M0
Stadio II	T qualunque, N qualunque, M1	T2, N0, M0
Stadio III		T3, N0, M0 T1, N1a, M0 T2, N1a, M0 T3, N1a, M0

<i>Stadi</i>	<i>Età pazienti <45 anni</i>	<i>Età pazienti ≥45 anni</i>
Stadio IV A		T4a, N0, M0 T4a, N1a, M0 T1, N1b, M0 T2, N1b, M0 T3, N1b, M0 T4a, N1b, M0
Stadio IV B		T4b, Nqualunque, M0
Stadio IV C		Tqualunque, Nqualunque, M1

1.2.3 Terapia e prognosi

Il carcinoma tiroideo papillifero e follicolare, definiti tumori differenziati, vengono comunemente trattati allo stesso modo. Sono le tipologie di tumore meno aggressive e hanno in generale un'ottima prognosi. Più del 90% dei pazienti sono infatti vivi a 10 anni dalla diagnosi.

Tale trattamento include l'intervento chirurgico, la somministrazione di iodio radioattivo e la terapia ormonale soppressiva (Brown *et al.*, 2011).

Si opta tipicamente per la tiroidectomia totale. La lobectomia o l'istmectomia sono ritenute appropriate solo per tumori piccoli, isolati e senza evidenza di diffusione. La tiroidectomia è di norma seguita dalla terapia con iodio radioattivo (RAI). Un piccolo quantitativo di tessuto tiroideo viene infatti di norma lasciato in seguito all'intervento chirurgico. La RAI viene somministrata in sede post-operatoria al fine di distruggere le cellule tiroidee rimanenti, normali o maligne. Consente inoltre di migliorare la futura sorveglianza di eventuali recidive.

Tale terapia radiometabolica orale effettuata con iodio-131 è generalmente ben tollerata e se necessario può essere ripetuta.

La terza parte della terapia è rappresentata dalla terapia ormonale soppressiva mediante levo-tiroxina (L-T4) al fine di mantenere bassi i livelli di TSH che hanno effetto stimolatorio nei confronti della crescita neoplastica.

I carcinomi indifferenziati e midollari non sono TSH-dipendenti e quindi non ricavano benefici da questo trattamento ad eccezione della correzione dell'ipotiroidismo postoperatorio.

Nel 10-15% di pazienti con carcinoma tiroideo differenziato si sviluppano metastasi a distanza per lo più a livello di polmone (50-60%) e ossa (20-30%). Più rare sono le metastasi a livello di fegato, cervello e cute.

La chirurgia risulta efficace nel caso di metastasi cerebrali, ma non per quelle polmonari che spesso sono multiple. L'intervento chirurgico può però in alcuni casi non curare ma prevenire o ritardare la comparsa di sintomi come quelli prodotti dalle metastasi ossee. I pazienti con metastasi a distanza possono trarre benefici da trattamenti ripetuti con radioiodio. Quando questo non è più efficace e la rimozione chirurgica non è realizzabile, si opta per la radioterapia esterna o la chemioterapia.

Anche nel caso del carcinoma midollare la prima scelta è rappresentata dall'intervento chirurgico. In seguito si prosegue con il dosaggio della calcitonina; se l'ipercalcitoninemia persiste si può sospettare che la patologia si sia già diffusa.

Se le eventuali metastasi sono confinate ai linfonodi la loro rimozione può bloccare la malattia. Dopo la tiroidectomia viene generalmente indicata la terapia sostitutiva con levo-tiroxina. Come già anticipato, questo istotipo tumorale non trae alcun beneficio dalla terapia con radioiodio.

Nel caso del carcinoma anaplastico nel 95% dei casi al momento della diagnosi il tumore ha già invaso la capsula e i tessuti circostanti. L'intervento chirurgico di resezione serve a ridurre la compressione delle strutture circostanti quali la trachea ma non ha intenti curativi. Postoperativamente si prosegue con la terapia ormonale sostitutiva e l'utilizzo della radioterapia esterna può ritardare la comparsa di recidive. Si tratta però dell'istotipo più aggressivo e la prognosi è fortemente infausta.

La percentuale di sopravvivenza è del 50% a sei mesi dalla diagnosi.

L'utilità della chemioterapia in caso di carcinoma anaplastico e in altri casi di tumore avanzato è fortemente discussa a causa dei risultati pressoché deludenti.

Ad eccezione del carcinoma anaplastico, il cui decorso è fortemente aggressivo e la sopravvivenza dalla diagnosi è inferiore all'anno, le neoplasie maligne della tiroide hanno nella maggior parte dei casi decorso indolente e la prognosi, benché peggiori con l'aumentare dell'età alla diagnosi, è favorevole. I soggetti di età inferiore ai 45 anni sono quelli che hanno in assoluto una prognosi migliore: la sopravvivenza a 5 anni è del 99%. Essa si riduce al 49% nei pazienti oltre i 75 anni.

Negli ultimi anni sono emersi nuovi agenti terapeutici per il trattamento del cancro alla tiroide, in particolare dei tumori differenziati non responsivi ai trattamenti standard. Il razionale di questi agenti risiede nel fatto che hanno come bersaglio aberrazioni note presenti nel carcinoma tiroideo.

Nelle ultime due decadi sono state infatti identificate molteplici lesioni associate ai diversi istotipi: mutazioni a carico dei membri della *pathway* delle MAPK (*RET*, *RAS*, *BRAF*) nel tumore papillifero, mutazioni di *RAS* o riarrangiamenti di *PPARGγ* nel carcinoma follicolare, mutazioni a carico di *RAS*, *BRAF*, *TP53*, *PIK3CA* e *AKT* nell'istotipo anaplastico (Carlomagno *and* Santoro, 2010). E' ben noto infine il coinvolgimento di mutazioni a carico di *RET* in virtualmente tutti i casi di tipo familiare e nella metà di quelli sporadici di tumore tiroideo midollare. L'identificazione di queste mutazioni ha ovviamente avviato lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici che bersagliano in maniera specifica queste lesioni.

La maggior parte di queste sono mutazioni di tipo *gain-of-function* a carico di tirosin, serin o treonin-chinasi o di chinasi lipidiche. Sono stati quindi sviluppati diversi inibitori di chinasi *multitarget*.

Un altro bersaglio estremamente attraente nel trattamento dei tumori in generale è rappresentato dal fenomeno dell'angiogenesi; anche in questo caso sono stati sviluppati

diversi inibitori del *VEGF*. Sono diversi gli agenti terapeutici attualmente sotto valutazione clinica (Fig.1.7)

Compound	Class	Thyroid cancers
Axitinib	Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI)	DTC, MTC, ATC
Motesanib Diphosphate	TKI	DTC
Pazopanib	TKI	DTC
Sorafenib	TKI	DTC
Sunitinib	TKI	DTC, MTC, ATC
Thalidomide	Inhibitor of angiogenesis	DTC, MTC
Lenalidomide	Inhibitor of angiogenesis	DTC

Figura 1.7. Nuovi agenti sottoposti a valutazione clinica per il trattamento del cancro tiroideo avanzato (Brown *et al.*, 2011)

I costi associati alla gestione del carcinoma tiroideo sono destinati a salire negli anni a venire (Brown *et al.*, 2011). Parte di questo aumento deriva dai costi del trattamento standard del PTC, istotipo che ha visto un grande aumento per quanto riguarda la diagnosi. Per quanto fattori quali l'età o il sesso maschile aumentino la possibilità di avere una patologia progressiva, gli strumenti diagnostici attuali non sono in grado di predire quali pazienti siano in grado di rispondere alla terapia minima. Per quanto la chirurgia rimanga necessaria per una stadiazione adeguata, un utilizzo più giudizioso della RAI consentirebbe un contenimento dei costi.

Per quanto i pazienti con cancro tiroideo avanzato rappresentino una minoranza, richiederanno valutazione e terapia continuativa determinando quindi un aumento dei costi sanitari. La terapia "targettata" rappresenta un'opportunità terapeutica nuova per questi pazienti anche se i criteri di selezione dei candidati ideali dovranno essere rifiniti e migliorati (Brown *et al.*, 2011).

1.2.4 *BRAF* e *RAS* nel carcinoma tiroideo papillifero

Il proto-oncogene *BRAF* è situato in 7q24 e codifica per una serina/treonina chinasi che è implicata nella cascata di segnali Ras-Raf-MEK-ERK. La mutazione conferisce a *BRAF* una *gain-of-function* che attiva in maniera aberrante *ERK*, implicato nella tumorigenesi di molti cancri umani, come, ad esempio, il melanoma ed il carcinoma del

colon (Davies *et al.*, 2002). Tra le mutazioni puntiformi dell'esone 15 nei tumori tiroidei, *BRAF*^{V600E} è l'alterazione più comune nei tumori tiroidei papilliferi sporadici (Xing, 2005). Mutazioni *BRAF* sono state identificate nel 29-69% dei PTC ma non nei FC, fino al 13% nei PDTC e nel 35% dei carcinomi indifferenziati (Xing, 2005; Davies *et al.*, 2002; Nikiforova *et al.*, 2003). Nei PTC le mutazioni di *BRAF* correlano con le metastasi distali e con uno stadio clinico più avanzato (Namba *et al.*, 2003).

I tre proto-oncogeni *RAS* (*HRAS* situato sul cromosoma 11p11, *KRAS* situato sul cromosoma 12p12 e *NRAS* situato sul cromosoma 1p13) sono implicati nella tumorigenesi umana (Downward J, 2003). Mutazioni coinvolgenti il codone 61 di *HRAS* e *NRAS* sono stati riportati con frequenza variabile (0-21%) nei tumori tiroidei papilliferi (Esapa *et al.*, 1999; Basolo *et al.*, 2000). La mutazione *RAS* è più comune nelle lesioni con architettura follicolare che nei carcinomi papilliferi classici (Zhu *et al.*, 2003). Alcuni autori hanno ipotizzato che la presenza di mutazioni *RAS* nei tumori benigni implichi che questo sia un evento precoce nella tumorigenesi tiroidea.

1.3 CGH-array

L'utilizzo della citogenetica molecolare è stato descritto per la prima volta nel 1992 (Kallionemi *et al.*, 1992) nello studio dei tumori solidi. La nuova tecnologia introdotta, denominata Comparative Genomic Hybridization (CGH), fu applicata all'analisi dei tumori solidi facendo una comparazione fra il DNA di cellule maligne e il DNA di cellule normali. La metodica si basa sulla comparazione del genoma del paziente con un genoma normale di riferimento al fine di individuare variazioni nel numero di copie geniche e quindi delezioni e amplificazioni di segmenti di DNA (Fig.1.8). Oggigiorno si utilizza il CGH-array anche in diagnostica molecolare per l'identificazione di aberrazioni cromosomiche nei disordini genetici costituzionali.

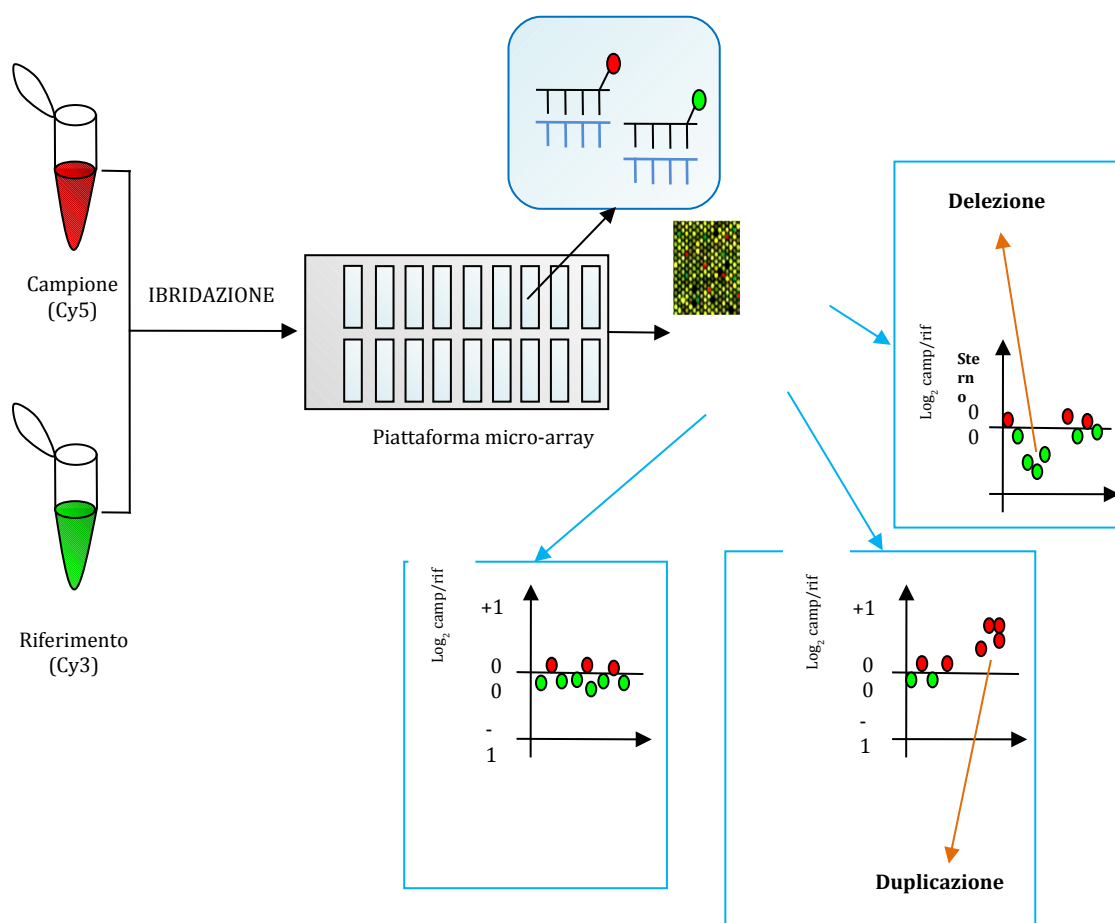


Figura 1.8. Schema semplificato del CGH-array. Il DNA estratto dal tumore del paziente (campione) ed il DNA estratto da tessuto sano (riferimento) dello stesso paziente, dopo incorporazione dei fluorocromi rosso (Cy5) e verde (Cy3) rispettivamente, vengono coibridati su una piattaforma micro-array su cui sono adesi gli oligonucleotidi. Mediante software viene letta la fluorescenza e calcolato il logaritmo in base due del rapporto fra la fluorescenza del campione e fluorescenza del riferimento per ciascuna sonda oligonucleotidica.

L'analisi CGH non necessita di conoscere a priori le aberrazioni da ricercare, a differenza delle altre metodiche molecolari quantitative quali, ad esempio, la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), l'MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification), la PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitativa.

La tecnica del CGH permette di valutare l'intero genoma in un unico esperimento ed ha un limite di risoluzione maggiore rispetto alle 3-5 Mb apprezzabili con l'analisi genomica classica mediante cariotipo. Il limite di risoluzione del CGH dipende dalla piattaforma usata per l'ibridazione: inizialmente venivano utilizzare piastre metafasiche

BAC-array che hanno un limite di risoluzione di circa 1-2 Mb ed infine piastre micro-array, che permettono di rilevare microaberrazioni di poche decine di migliaia di basi.

Con l'avvento delle piattaforme micro-array sono state scoperte numerose zone di DNA sparse in tutto il genoma che si presentano in un numero di copie diverso tra gli individui: esse sono dette Copy Number Variants (CNVs). Le CNVs sono definite come segmenti di DNA di lunghezza maggiore o uguale a 1kb che variano nel numero di copie da un individuo ad un altro (Choy *et al.*, 2010). Le CNVs spesso si trovano in regioni contenenti o fiancheggiate da duplicazioni segmentali, ossia regioni ad alta omologia (>90%) che durante il crossing-over possono andare incontro a ricombinazione omologa non allelica a seguito di un appaiamento scorretto dei cromosomi omologhi alla meiosi (meccanismo NAHR). Altri meccanismi di formazione delle CNVs sono i NHEJ e MMEJ, ossia non-homologous end joining e microhomology-mediated end joining mechanisms rispettivamente (Choy *et al.*, 2010). Si è visto che CNVs di grandi dimensioni sono associate a duplicazioni segmentali più frequentemente rispetto a quelle di dimensioni ridotte, tra le quali invece sembra dominare il meccanismo di formazione mediato da regioni non omologhe (Freeman *et al.*, 2006).

Negli anni '80 e '90 le CNVs erano state associate a disordini genetici, per esempio variazioni nel numero di copie al locus della alfa-globina erano state indicate come variazioni causative dell'alfa-talassemia, oppure la delezione del cromosoma 15q11-13 era stata associata alle sindromi di Prader-Willi e Angelman. Tuttavia negli ultimi anni le CNVs sono state riconosciute anche come una fonte di variazione inter-individuale nel genoma di individui sani; per esempio sono state ritrovate larghe delezioni e duplicazioni in porzioni di famiglie/clusters di geni come i recettori per l'olfatto, il complesso maggiore di istocompatibilità ed i geni presenti al locus per l'amilasi (Freeman *et al.*, 2006). Occorre quindi effettuare una distinzione tra CNVs patologiche e CNVs che coinvolgono loci polimorfici; di qui la difficoltà nell'interpretare i dati ottenuti mediante il CGH-array.

Nello studio delle aberrazioni coinvolte nella tumorigenesi, al fine di escludere le CNVs inter-individuali dal risultato dell'analisi, si compara il DNA estratto da tessuto tumorale con il DNA estratto dal tessuto sano dello stesso individuo in modo da evidenziare solamente le Copy Number Alterations (CNAs). Si evitano in tal modo di considerare le CNVs inter-individuali come variazioni coinvolte nello sviluppo della patologia.

La tecnica del CGH-array oltre ad avere molti vantaggi ha però anche dei limiti da tener presente: non è infatti in grado di identificare i riarrangiamenti cromosomici bilanciati, le poliploidie, le inversioni ed i mosaicismi a bassa percentuale (Oostlander *et al.*, 2004). Negli ultimi anni con il miglioramento della risoluzione, la tecnica CGH-array ha potuto rilevare la presenza di mosaicismi con l'8% di cellule anomale (Valli *et al.*, 2011).

1.3.1 CGH e tumori tiroidei

Negli ultimi anni parecchi studi hanno utilizzato la tecnologia CGH per la comparazione delle aberrazioni cromosomiche presenti nei tumori di origine tiroidea. In alcuni studi più recenti si sono comparati i profili di citogenetica molecolare derivanti dall'analisi CGH delle maggiori varianti istologiche di cancro tiroideo (PDTC, WDTC, ATC) per definire le variabili geniche associate alla progressione neoplastica, alla trasformazione dei carcinomi follicolari in anaplastici, allo sviluppo di metastasi (Rodriguez *et al.*, 2004, Rodriguez *et al.*, 2007; Wreesman *et al.*, 2002, Miura *et al.*, 2003; Sing *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008). In particolare diversi studi di analisi aCGH sui PTC hanno riportato aberrazioni ricorrenti. In questi studi sono state poste in evidenza le aberrazioni discriminati tra *RET/PTC* positivi e *RET/PTC* negativi (Unger *et al.* 2008) o le aberrazioni tipiche per tumori wildtype *RET* e *BRAF* (Finn *et al.*, 2007) o le aberrazioni tipiche dei tumori caratterizzati anche dalla presenza di aneuploidie (Rodriguez *et al.*, 2007).

Per definire le varianti genomiche neoplastiche i profili genomici dei campioni tumorali sono stati comparati con i profili genomici di DNA di donatori sani (Miura *et al.* 2003), di DNA commerciale costituito da un pool di linee cellulari tumorali (Finn *et al.*, 2007) oppure con il DNA estratto da campioni tiroidei non tumorali (Fehér *et al.*, 2012).

2. Scopo della tesi

Il carcinoma papillifero tiroideo (PTC) è il più comune cancro tiroideo differenziato. Sebbene la maggior parte dei casi presenti un decorso clinico indolente, alcuni di questi sviluppano invasività e metastasi distali ed in alcuni casi si trasformano in tumori tiroidei indifferenziati/anaplastici con un rapido decorso letale. Al fine di identificare alterazioni nel numero di copie geniche coinvolte nella tumorigenesi dei PTC con diversa aggressività e predittive di una potenzialità metastatica o di una trasformazione aggressiva, è stato effettuato uno studio di analisi genomica mediante la metodica array-CGH su 17 casi di PTC wild-type per *BRAF* e *RAS* (10 poco aggressivi, di grado T1 e 7 aggressivi, di grado T3). Il DNA tumorale, estratto da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina, è stato comparato con DNA di tessuto sano, ugualmente estratto da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina, del medesimo paziente, al fine di ottenere dai profili genici solamente le aberrazioni cromosomiche somatiche. In questo modo vengono così escluse tutte le varianti inter-individuali che potrebbero alterare i risultati dell'analisi. L'identificazione di aberrazioni cromosomiche somatiche presenti nel PTC è il principale elemento di novità di questo studio.

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

In questo studio sono stati analizzati 17 pazienti con diagnosi di PTC. I campioni di tessuto tumorale/sano fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati forniti dalla Clinica Medica II, Policlinico Umberto I, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Roma, Italia. Le procedure utilizzate in questo studio hanno seguito la dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato è stato fornito da ogni paziente.

L'età media dei pazienti è di 50.9 (SD±9.9); 16 sono di sesso femminile, 1 è di sesso maschile. In tab.3.1 sono riassunte le caratteristiche tumorali dei pazienti.

Tab 3.1 dati relativi ai pazienti esaminati

Aggressività	ID	Sesso	Età	METASTASI	ISTOLOGICO(variante)	STADIO	TNM
T1	1	F	65	NO	PTC (sclerosante)	1	T1 N0 M0
T3	2	F	62	POLMONARE	PTC	4c	T3 N0 M1
T1	3	F	60	NO	PTC (sclerosante)	1	T1 N0 M0
T3	4	F	60	LINFONODI	PTC	3	T3 N0 M0
T1	5	F	48	NO	PTC	1	T1 N0 M0
T3	6	F	52	NO	PTC	3	T3 N0 M0
T1	7	F	59	NO	PTC (sclero-nodulare)	1	T1 N0 M0
T1	8	F	46	NO	PTC	1	T1 N0 M0
T3	9	M	58	LINFONODI	PTC	4a	T3N1bM0
T1	10	F	49	NA	PTC	NA	Tx Nx M0
T1	11	F	76	NO	PTC	1	T1 Nx M0
T1	12	F	45	NO	PTC	1	T1 Nx M0
T1	13	F	28	NO	PTC	1	T1 Nx M0
T3	14	F	46	NO	PTC	3	T3NxM0
T3	15	F	47	LINFONODI	PTC	3	T3N1aMx
T1	16	F	34	NO	PTC	NA	T1NxMx
T3	17	F	30	LINFONODI	PTC	NA	T3N1bMx

3.2 Estrazione del DNA

Da ogni fettina è stato estratto il DNA, esclusivamente dalla porzione tumorale precedentemente delineata dall'anatomopatologo (comprendente almeno l'80% di cellule tumorali) mediante il Kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). Tale kit si basa su un sistema cromatografico per adsorbimento su matrice di silice. Una volta rimosso il tessuto dall'area tumorale della fettina, questo è stato lasciato ad incubare per 30' in una soluzione di xilene e, in seguito, è stato lavato con etanolo assoluto. Evaporato l'etanolo, è stata eseguita la lisi cellulare tramite incubazione overnight a 56° con una soluzione di proteinasi K e sodio-dodecil-solfato (SDS) che ha duplice azione: enzimatica e detergente. Il DNA estratto è stato poi purificato con l'aggiunta di etanolo

e sali caotropici ed il successivo passaggio in colonnine con membrane di silice, che adsorbono in modo reversibile e specifico gli acidi nucleici. Tali matrici silicee sono state lavate mediante passaggi successivi di soluzioni ad alte concentrazioni saline. Infine, il DNA purificato è stato staccato dalle membrane e allo stesso tempo eluito utilizzando un buffer di lavaggio debolmente alcalino a bassa concentrazione salina che veniva raccolto in tubetti sterili.

Allo scopo di valutare la purezza e la concentrazione del prodotto ottenuto, 1,5 microlitri di ogni DNA estratto sono stati letti in uno spettrofotometro (Nanodrop, ThermoScientific); lo strumento, sfruttando la caratteristica assorbanza (260 nm) del DNA, ne calcola la concentrazione e la purezza, cioè la possibile presenza di contaminazione da proteine (rapporto 260/280 \approx 1,8-1,9) e da fenoli (rapporto 260/230 \approx 2-2,2).

Un'aliquota di DNA estratto, utilizzata in seguito per l'analisi mediante a-CGH, è stata precipitata e risospesa in H₂O al fine di eliminare tutti i sali presenti nel buffer di eluizione, che interferiscono con la reazione di marcatura dell'acido nucleico. Alla soluzione è stato quindi aggiunto sodio acetato 3M (1/10 di volume) ed etanolo assoluto freddo (3 volumi), il tutto è stato vortexato e posto a -80°C per 30 minuti. Dopo una centrifugazione a 13.000 rpm per 30 minuti, è stato eliminato tutto il surnatante ed il pellet lavato con 200 μ l di etanolo al 70% freddo. Dopo una breve centrifugata a 13.000 rpm per 5 minuti, si è proceduto con l'eliminazione del surnatante, l'asciugatura del pellet e la risospensione dello stesso in H₂O. Il DNA è stato riquantizzato allo spettrofotometro. (Nanodrop, ThermoScientific)

3.3 Identificazione delle mutazioni attivanti *BRAF* e *RAS*

3.3.1 Amplificazione genomica (PCR)

Ogni regione genomica di interesse, della lunghezza di circa 300-400 bp, è stata amplificata mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in cappa sterile. 150 ng di ogni DNA sono stati introdotti in un volume totale di 50ul di una soluzione così composta: desossiribonucleotidi trifosfati (4 dNTPs, ognuno contenente una delle basi

azotate: adenina, citosina, guanina e timina) 200uM, 1,25U di Taq Gold Polimerasi e suo buffer specifico (1x), MgCl₂ 1,5mM e 10pmol di primers forward e reverse, opportunamente disegnati per ogni amplicone (Tab. 3.2)

3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio

Sono stati caricati 6 ul di reazione di PCR su gel di agarosio contenete il bromuro di etidio, un intercalante del DNA sensibile ad eccitazione con raggi UV, ed è stata eseguita la corsa elettroforetica a 100 V per circa 30 min. In questo modo, ponendo il gel nel transilluminatore, è stato possibile verificare l'altezza corretta della banda relativa all'amplicone in esame, la specificità della reazione e l'assenza di eventuali contaminazioni.

3.3.3 Purificazione dei prodotti di PCR

Una volta verificato il successo della reazione di amplificazione, il materiale genetico amplificato (amplicone) è stato purificato utilizzando il Kit "Isolate PCR and Gel" (BIOLINE) basato su colonnine a membrana di silice in grado di legare il DNA ma non tutti gli altri componenti della PCR. Il lavaggio con opportuni buffer e l'eluizione hanno permesso di purificare il DNA amplificato che è stato poi utilizzato nella successiva reazione di sequenziamento.

3.3.4 Reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata effettuata con BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems).

Il principio del sequenziamento utilizzato è stato quello di Sanger o "chain termination method". Si tratta di un metodo enzimatico fondato sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideossinucleotidi trifosfato, ddNTPs), molecole artificiali che si differenziano dai nucleotidi naturali per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' della molecola. Questa differenza impedisce la formazione del legame fosfodiesterico con altri nucleotidi, bloccando l'allungamento del filamento di neo-sintesi. Inoltre i 4

ddNTPs sono marcati ognuno con una diversa sostanza fluorescente.

Durante la reazione di sequenza i due filamenti di DNA dell'amplicone vengono replicati dalla polimerasi che incorpora i dNTPs e, casualmente, i ddNTPs che, grazie alle loro caratteristiche, terminano la sintesi del filamento e "marcano" la loro posizione con la fluorescenza specifica ad essi associata. Verranno così prodotti molti filamenti di DNA di lunghezza variabile, ognuno dei quali termina con uno dei 4 ddNTPs. È stata dunque preparata una soluzione di volume totale di 10ul in cui erano presenti: 2ul di MIX (contenente la polimerasi e i dNTPs e ddNTPs in proporzione ben definita), 1ul di buffer, 10 pmol di primer specifico (o forward o reverse, Tab 3.2) ed una quantità di amplicone calcolata mediante la seguente formula: lunghezza amplicone (n° bp)/50.

La reazione di sequenza è avvenuta in un termociclatore, il quale ha eseguito 25 volte il ciclo:

-1) Denaturazione a 96°C per 10''

-2) Ibridazione a 50°C per 5''

-3) Allungamento a 60°C per 4'

Tab. 3.2 Primers utilizzati nella reazione di amplificazione del DNA e nella reazione di sequenza (evidenziati in giallo)

AMPLIFICATO	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
HRAS Ex2	CAGGAGACCTGTAGGAGGA	AGCAGCTGCTGGCACCTGGA
HRAS Ex3	GAAGCAGGTGGTCATTGA	AGGACATGCGCAGAGAGG
KRAS Ex2	GGTACTGGTGGAGTATTTGAT	GGTCCTGCACCAGTAATATGC
KRAS Ex3	AGGATTCCTACAGGAAGCAAG	TAATTACTCCTTAATGTCCAGCT
NRAS Ex2	AGTACTGTAGATGTGGCTCG	GGTAAAGATGATCCGACAAGT
NRAS Ex3	GGCTTGAATAGTTAGATGCT	GTAGAGGTTAATATCCGCAA
BRAF Ex15	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	GGCCAAAAATTTAATCAGTGG

3.3.5 Purificazione della reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata purificata utilizzando le colonne Centri-Sep (Life Technologies). Esse contengono un gel che, una volta idratato, permette di eluire rapidamente le grandi molecole, e quindi il DNA, e di trattenere tutte le molecole piccole, e quindi gli altri componenti della reazione. Infine, i filamenti di DNA ottenuti dalla reazione di sequenza sono stati denaturati in formamide per 3' a 95°C.

3.3.6 Elettroforesi capillare ed analisi dei risultati

Le sequenze di DNA così preparate sono state caricate in un sequenziatore automatico (ABI PRISM 3130xl, Applied biosystems). Questo strumento esegue un'elettroforesi capillare del DNA ed è in grado di separare filamenti che differiscono di una sola base. Alla fine del cammino elettroforetico è posta una CCD camera (cell detection block) che rileva la fluorescenza emessa a seguito dell'eccitazione con laser di ogni ddNTP che passa. In questo modo il sequenziatore acquisisce i segnali emessi e li traduce in picchi colorati (elettroferogramma), in cui ad ogni colore corrisponde un nucleotide (verde, blu, nero e rosso, rispettivamente per ddAMP, ddCMP, ddGMP e ddTMP). La presenza di una sostituzione nucleotidica in omozigosi verrà rappresentata da un picco di colore diverso da quello originale (wild-type), mentre una sostituzione nucleotidica in eterozigosi sarà rappresentata da un doppio picco, uno corrispondente al nucleotide wild-type e l'altro al nuovo nucleotide.

3.4 CGH-array

Per l'analisi al CGH sono stati utilizzati vetrini SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 4x180K della ditta Agilent Technologies. I campioni di DNA estratto da tumore sono stati co-ibridati con il DNA estratto da tessuto sano dello stesso individuo.

3.4.1 Marcatura del DNA

La marcatura del Dna è stata effettuata con il kit ULS (Universal Linkage System) Labeling (Agilent Technologies) seguendo il protocollo (versione 3.3, Agosto 2011) fornito dalla ditta stessa.

500 ng di DNA contenuti in un volume finale di 8 µl sono stati frammentati mediante incubazione a 95°C per 5 minuti e posti in ghiaccio per 3 minuti prima di procedere alla marcatura.

I campioni tumorali sono stati coniugati alla Cianina 5 (Cy5), un fluorocromo che emette nel campo del rosso dopo eccitazione con raggio laser, mentre i DNA di riferimento (tessuto sano) sono stati coniugati con la Cianina 3 (Cy3), che emette invece

nel campo del verde. Ai campioni sono stati aggiunti 2 μ l di Labeling Master Mix così composto:

- 0,5 μ l di H₂O
- 0,5 μ l di ULS-Cy3 o ULS-Cy5
- 1 μ l di 10X labeling solution

i campioni sono stati trasferiti nel termociclatore ed incubati a 85°C per 30 minuti.

3.4.2 Purificazione dei campioni marcati

La purificazione del DNA marcato è necessaria al fine di rimuovere, prima dell'ibridazione dei campioni, le cianine ULS-Cy3 e ULS-Cy5 non incorporate al DNA stesso e che quindi interferiscono con l'esperimento incrementando il rumore di fondo.

Dopo un'incubazione di 3 minuti in ghiaccio ed una breve spinnata in microcentrifuga i campioni marcati sono stati purificati utilizzando le colonnine KREApure columns della ditta Agilent Technologies.

I campioni sono stati trasferiti nelle KREApure columns, precedentemente risospese, pre-spinnate e lavate. Le colonnine, poste in un tubo da microcentrifuga da 1.5 ml, sono state centrifugate a 17.000 g per 1 minuto.

3.4.3 Determinazione del grado di labeling e attività specifica

Per determinare il grado del labeling e l'attività specifica si è utilizzato lo spettrofotometro NanoDrop. Viene misurata l'assorbanza a 260 nm (DNA), 550 nm (Cy3), e 650 nm (Cy5).

Un grado ottimale di labeling per Cy5 è compreso tra 0.75% e 2.5%, mentre per la Cy3 è compreso tra 1.75% e 3.5% con un range Cy3 meno Cy5 tra 1% e 2%.

3.4.4 Ibridazione

L'ibridazione è stata effettuata mediante l'utilizzo del Kit Agilent oligo a CGH Hybridization kit.

Quantità equimolari di DNA marcato (DNA tumorale Cy5 e controparte sana Cy3) vengono combinate in un volume finale di 22 μ l. Ai campioni vengono aggiunti 61 μ l di

Hybridization Master Mix così composto:

- 5 μ l Cot-1 DNA (1.0 mg/ml, Invitrogen)
- 1 μ l Agilent 100X Blocking Agent
- 55 μ l Agilent 2X Hi-RPM Hybridization Buffer

I campioni sono stati quindi trasferiti nel termociclatore ed incubati a 95°C per 3 minuti ed a 37°C per 30 minuti. Ad ogni campione sono stati aggiunti 37 μ l di Agilent CGHblock precedentemente portato a temperatura ambiente.

100 μ l di ogni campione vengono posti sul vetrino coprioggetto 4X su cui viene adagiato il vetrino microarray SurePrint G3. Il tutto viene richiuso in una camera di ibridazione posta poi in un rotore ad ibridare a 65°C per 40h

3.4.5 Lavaggi post-ibridazione

Il vetrino viene disassemblato nel Wash Buffer 1.

Si effettuano i seguenti lavaggi in vaschette poste su un agitatore magnetico e contenenti il buffer ed un magnetino:

- 5 minuti in Oligo aCGH Wash Buffer 1 a temperatura ambiente
- 1 minuto in Oligo aCGH Wash Buffer 2 preriscaldato a 37°C
- 10 secondi in acetonitrile (Carlo erba) a temperatura ambiente

Dopo i lavaggi sopra il vetrino viene posta una copertura contro l'ozono per impedire la degradazione della Cianina 5 sensibile a questo gas.

Il vetrino viene letto immediatamente al fine di minimizzare l'impatto degli ossidanti ambientali sull'intensità dei segnali di fluorescenza.

3.4.6 Lettura del vetrino

Per l'analisi dei vetrini è stato utilizzato lo scanner Agilent G2505C Microarray. Lo scanner microarray è un sofisticato scanner a fluorescenza laser-indotta progettato per la lettura delle piattaforme microarray. Esso misura l'intensità di fluorescenza di entrambi i fluorocromi incorporati dal DNA genomico contemporaneamente. La scansione del vetrino avviene mediante i laser SHG-YAG (532 nm) alla potenza di 20 mW e Helium-Neon (633nm) alla potenza di 23 mW. Gli elettroni dei fluorocromi, eccitati dai laser, tornando allo stato fondamentale, emettono fluorescenza alle bande 550-610 nm (Cy3) e

650-750 nm (Cy5). Il segnale fluorescente viene convertito in impulso elettrico e amplificato da un fotomoltiplicatore ad alta prestazione. Successivamente il segnale elettrico viene trasformato in formato digitale. Si ottiene così un'immagine TIFF (.tif) del vetrino microarray che viene in seguito analizzata mediante il software Feature Extraction.

3.4.7 Analisi dell'immagine

Le piattaforme microarray che sono state utilizzate sono i vetrini Agilent 4x180k contenenti quattro arrays ciascuno. Ogni array è costituito da circa 180.000 spots che contengono picomoli di specifiche sequenze di DNA, dette probes. Le probes consistono in sessantameri (oligonucleotidi costituiti da 60 nucleotidi) costruiti direttamente sulla superficie del vetrino mediante la tecnologia "ink-jet printing". Ogni oligonucleotide è presente in più punti sullo stesso array per consentire una corretta ibridazione.

Per l'analisi dell'immagine in formato TIFF ottenuta con lo scanner si è utilizzato il software Feature Extraction nella versione 6.4. Il software quantifica l'intensità di segnale per ogni pixel, segnala i valori che sono al di fuori della media e sottrae il segnale dato dal rumore di fondo. Successivamente, in associazione con il software Agilent Genomic Workbench Software, i dati estrapolati dall'immagine dopo lettura allo scanner vengono convertiti in log ratios, permettendo all'operatore di misurare le variazioni nel numero di copie del DNA nei suoi esperimenti.

Il software Feature Extraction dai dati estratti produce un QC Report, ossia un resoconto del confronto fra i parametri ottenuti e quelli di riferimento. Essi risultano corretti solo se si è analizzato DNA di ottima qualità con i CGH microarrays Agilent seguendo le procedure raccomandate dal protocollo fornito dalla ditta. I parametri ottenuti possono dunque essere considerati come controllo della qualità del vetrino e i loro valori sono influenzati da molti fattori, tra i quali il formato di microarray (1x, 2x, 4x o 8x), l'origine del campione biologico, la qualità del DNA di partenza, la procedura di preparazione dei campioni, la sensibilità dello scanner e la processazione dell'immagine.

3.4.8 Analisi dei dati ottenuti

Per l'analisi dei dati estratti mediante Feature Extraction è stato utilizzato il software Agilent Genomic Workbench versione 6.5. Questo software, dopo l'applicazione di determinati parametri d'analisi, permette all'operatore di osservare graficamente i risultati con l'esatta localizzazione cromosomica delle aberrazioni e dei geni interessati. Per ogni probe viene calcolato il logaritmo in base due del rapporto fra il segnale fluorescente dato dal campione e quello dato dal riferimento al fine di rilevare variazioni nel numero di copie fra i due DNA posti a confronto. I parametri di analisi che sono stati utilizzati in questo studio sono: ADM-2: 5.0, Fuzzy-zero: ON, Centralization algorithm: ON, Moving Average algorithm: *triangular*, Aberration Filter: *minimo numero di probes 3*.

ADM-2: l'algoritmo ADM-2 (Aberration Detection Method 2) consente la rilevazione di regioni genomiche con log ratio aberrante rispetto alla media attesa di 0. È stato utilizzato ADM-2 invece degli algoritmi Z-SCORE o ADM-1 poiché il primo considera solo regioni di grandezza definita in cui ci sia un'abbondanza o una scarsità di probe aberranti, mentre il secondo non considera il log ratio error ma solo il log ratio value. Il valore soglia (threshold value) valutato come ottimale è 5.0. (Fig.3.1)

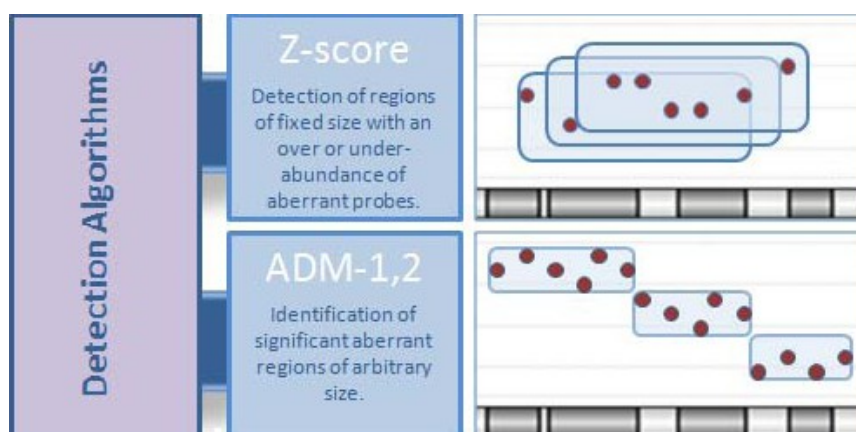


Figura 3.1. Confronto tra gli algoritmi Z-score e ADM 1,2 nella rilevazione delle regioni genomiche ove sono presenti probe aberranti

Fuzzy-zero: la correzione Fuzzy-Zero applica ad ogni regione aberrante rilevata dagli algoritmi ADM-1 o ADM-2 il modello di errore globale per evitare la segnalazione di aberrazioni erronee quando sono presenti errori correlati. Gli algoritmi ADM invece

considerano solo gli errori indipendenti calcolati per ogni probe.

Centralization algorithm: l'algoritmo Centralization è un algoritmo di normalizzazione che viene usato insieme agli algoritmi ADM. Esso aggiunge o sottrae lo stesso valore costante ad ogni misurazione di log ratio per consentire una migliore centralizzazione dei dati. Facendo ciò la più comune ploidia viene posta come il nuovo punto-zero.

Moving Average algorithm (*triangular/window 1Mb*): l'algoritmo Moving Average pone un intervallo di grandezza fissa intorno ad ogni punto di interesse. La media di quel punto e di quelli vicini ad esso che ricadono all'interno della finestra fissata è riportata come il valore della media di quel dato punto. L'algoritmo è disponibile in due modi: linear o triangular smoothing.

Aberration Filter (*minimo numero di probes 3*): applicando l'Aberration Filter con minimo numero di probes uguale a tre vengono segnalate solo le regioni aberranti in cui ci sono almeno tre probes contigue.

3.4.9 Analisi delle aberrazioni comuni

Per l'identificazione delle aberrazioni comuni statisticamente significative tra i campioni T1 e T3 si è utilizzato il programma Agilent Genomic Workbench versione 6.5 (Agilent Technology) impostando l'algoritmo di analisi statistica *Context-Corrected Common Aberrations* (P-value threshold 0.05; overlap threshold 0.1) che "corregge" la significatività dell'aberrazione tenendo in considerazione lo stato totale delle aberrazioni genomiche del campione in esame. Più aberrante è il campione, meno significatività viene data alla particolare aberrazione del campione stesso.

3.5 Analisi delle correlazioni geniche

Per valutare le attività biologiche più rappresentative presenti nella nostra lista di geni, abbiamo utilizzato il metodo statistico del software DAVID (Database for Annotation,

Visualization and Integrated Discovery) (Dennis *et al.* 2003, Hosack *et al.*, 2003) che evidenzia le funzioni più rappresentate in accordo con le annotazioni del database Gene Ontology. Sono state prese in considerazione le funzioni aventi P-value<0.05.

3.6 Validazione dei risultati aCGH

3.6.1 Real-time PCR quantitativa

La validazione dei risultati ottenuti tramite CGH è stata effettuata su alcuni campioni per i geni *FNI* e *ARAP2*. I primers (MWG-operon) sono stati disegnati con il software PrimerExpress v. 3.0 (Applied Biosystems). Come gene endogeno è stata utilizzata l'Albumina (*ALB*). Tutte le PCR sono state effettuate in triplicato. La sequenza dei primers utilizzati è riportata in tab. 3.3

Tab. 3.3 Primers utilizzati nella reazione PCR quantitativa

AMPLIFICATO	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
ALB	ATGCTGCACAGAATCCTTGGT	TCATCGACTTCCAGAGCTGAAA
FNI	CCGAGGAGAGTGGAAAGTGTGA	GAAAGATGGATTTGCGGAAATATT
ARAP2	GGCTACTTTGCTGTGTCTGTCT	GTGGGCTAATGCTGTCTGAAGTG

Nella reazione di PCR sono stati amplificati 10 ng di DNA genomico per campione in un volume finale di 12,5 µl totali.

Miscela di reazione :

- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) 1x
- 300 nM di ciascun primer (F e R)
- H₂O MQ sterile: a volume

L'amplificazione è stata effettuata con termociclatore ABI Prism 7300 Sequence detection System (Applied Biosystems) impostando il seguente programma:

Fase iniziale

50° C 2 minuti

95° C 10 minuti denaturazione, attivazione Taq polimerasi

Fase di termociclo - 40 cicli

95°C 15 secondi denaturazione

60°C 60 secondi annealing, lettura della fluorescenza ed elongazione

3.6.2 Analisi e quantificazione

La quantificazione relativa tra i diversi campioni è stata eseguita con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizzando il software in dotazione all'apparecchiatura ABI Prism 7300 Sequence detection System (Applied Biosystems).

Nell'analisi viene prima di tutto normalizzato il C_T del gene target rispetto a quello di riferimento (rif.) sia per il campione test che per il calibratore:

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{rif., test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibratore}) = C_T(\text{target, calibratore}) - C_T(\text{ref., calibratore})$$

Viene poi normalizzato il ΔC_T del campione test sul ΔC_T del calibratore

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{calibratore})$$

Infine viene calcolato il rapporto di espressione, cioè il numero di volte di incremento (o decremento) del gene target nel test campione in relazione al campione calibratore e normalizzato verso il gene di riferimento mediante la formula seguente:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{rapporto di espressione normalizzato}$$

Dopo aver settato la linea di base ed il C_T , l'algoritmo ha quindi elaborato i livelli di quantità genica relativa attraverso il metodo del $\Delta\Delta C_T$ usando come calibratore il tessuto sano del campione analizzato; per il soggetto in esame il valore di RQ del calibratore, nella tabella di output di analisi dati, è pari ad 1. Il tessuto tumorale dello stesso individuo è stato così valutato rispetto a questo valore. Per i campioni amplificati il valore di RQ si attesterà a 1.5 (3 copie geniche) oppure al valore di 0.50 (1 copia genica) in caso di delezione.

4. Risultati

In questo studio sono stati analizzati 17 pazienti con diagnosi di PTC. Sulla base delle caratteristiche TNM sono stati analizzati i tumori PTC dividendoli in due gruppi: un gruppo di 10 pazienti considerato a “bassa aggressività” e definito T1 ed un gruppo di 7 pazienti considerato ad “alta aggressività” e definito T3. Il criterio da noi adottato per l’inclusione dei pazienti nel gruppo T1 o nel gruppo T3 si è basato sulla valutazione delle dimensioni della massa tumorale. La grandezza del tumore è considerata come fattore predittivo indipendente di una prognosi peggiore, assieme ad età e positività per metastasi linfonodali (Passler *et al*, 2004) .

L’età media dei pazienti appartenenti ai due gruppi è simile [gruppo T1: 51 anni (SD±11.2), gruppo T3: 50.7 anni (SD+8.3)]. Nel gruppo T1 tutti i pazienti sono di sesso femminile, mentre il gruppo T3 comprende 1 paziente di sesso maschile.

Dei 7 pazienti definiti T3 uno presenta metastasi ai polmoni, quattro pazienti presentano metastasi ai linfonodi e due pazienti non presentano metastasi.

Tutti i nostri campioni sono negativi per la mutazione *BRAF* e per le mutazioni attivanti *RAS*.

Il DNA estratto da tessuto fissato ed incluso in paraffina è spesso degradato o danneggiato e per tale motivo per l’analisi CGH-array si è scelto di utilizzare un metodo chimico di marcatura del DNA, anziché un metodo enzimatico. Una marcatura enzimatica su corti frammenti di DNA risulta spesso avere bassa attività specifica dei fluorocromi e, di conseguenza, si possono rilevare rumori di fondo nei dati aCGH che vanno ad influire sui risultati dell’esperimento.

Il protocollo utilizzato in questo studio si basa sulla tecnologia Kreatech “Universal Linkage System” (ULS™), una metodologia diretta di marcatura non enzimatica. La tecnologia si basa sulle proprietà di legame stabile di un complesso al Platino con il DNA (o RNA o proteine) (Fig.4.1).

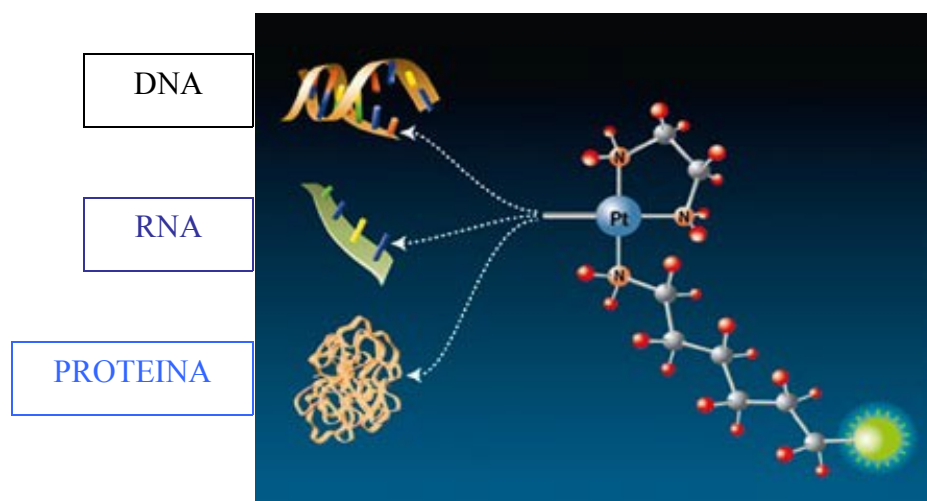


Figura 4.1. Meccanismo di marcatura Universal Linkage System. ULS™ lega il DNA genomico (o RNA o proteine) tramite il suo sito attivo e lo marca attraverso la formazione di un legame in posizione N7 della guanina. La molecola rilevata (circolo verde), quale ad esempio Cy3 o Cy5, è legata alla molecola ULS mediante un distanziatore.

I vantaggi della marcatura con metodo chimico sono:

- marcatura diretta del DNA, indipendente dalla lunghezza dei frammenti del DNA stesso;
- viene eliminato lo step di amplificazione e quindi qualsiasi manipolazione del DNA genomico.

Il controllo di qualità (QC report) dei dati ottenuti dopo lettura allo scanner riporta, tra gli altri, il valore DLRS. Il DLRSpread (Derivative Log Ratio Spread) è lo spread (deviazione standard robusta) dei valori di DLR (Derivative Log Ratio) che a sua volta rappresenta la differenza tra valori di log ratio di sonde consecutive.

Nei campioni di DNA estratto da FFPE il valore DLRS, per essere eccellente, dev'essere inferiore a 0.4. (Agilent Oligonucleotide Array-based CGH for genomic DNA Analysis, versione 3.3). In alcuni dei campioni analizzati i valori erano più elevati di 0.4 (0.46 e 0.53). I dati ottenuti da questi campioni tramite elaborazione automatica del software Workbench 5.0 sono stati valutati manualmente.

Nello studio delle alterazioni genomiche coinvolte nella tumorigenesi dei PTC con diversa aggressività, al fine di escludere le CNVs inter-individuali dal risultato dell'analisi, il DNA estratto da tessuto tumorale è stato comparato al DNA estratto dal tessuto sano dello stesso individuo. In tal modo sono state evidenziate solamente le

variazioni somatiche (Copy Number Alterations, CNAs).

L'impostazione dei parametri di analisi è stata valutata su un campione di DNA ibridato con sé stesso (self-self).

Se lo stesso campione di DNA è sia "test" che "reference", il rapporto logaritmico deve essere "0" su tutto il genoma.

Per i campioni self/self sono stati ottenuti tracciati con assenza di deviazioni rispetto allo "0". Un esempio di tracciati self/self è mostrato in figura 4.2.

Come si può valutare dalla figura, l'analisi ottenuta mediante l'impostazione degli algoritmi sotto indicati, non ha evidenziato alcuna alterazione genomica.

Dunque questo risultato suggerisce che, impostando gli algoritmi sotto indicati per l'analisi dei campioni, la nostra metodica risulta molto specifica per l'individuazione di sbilanciamenti genomici.

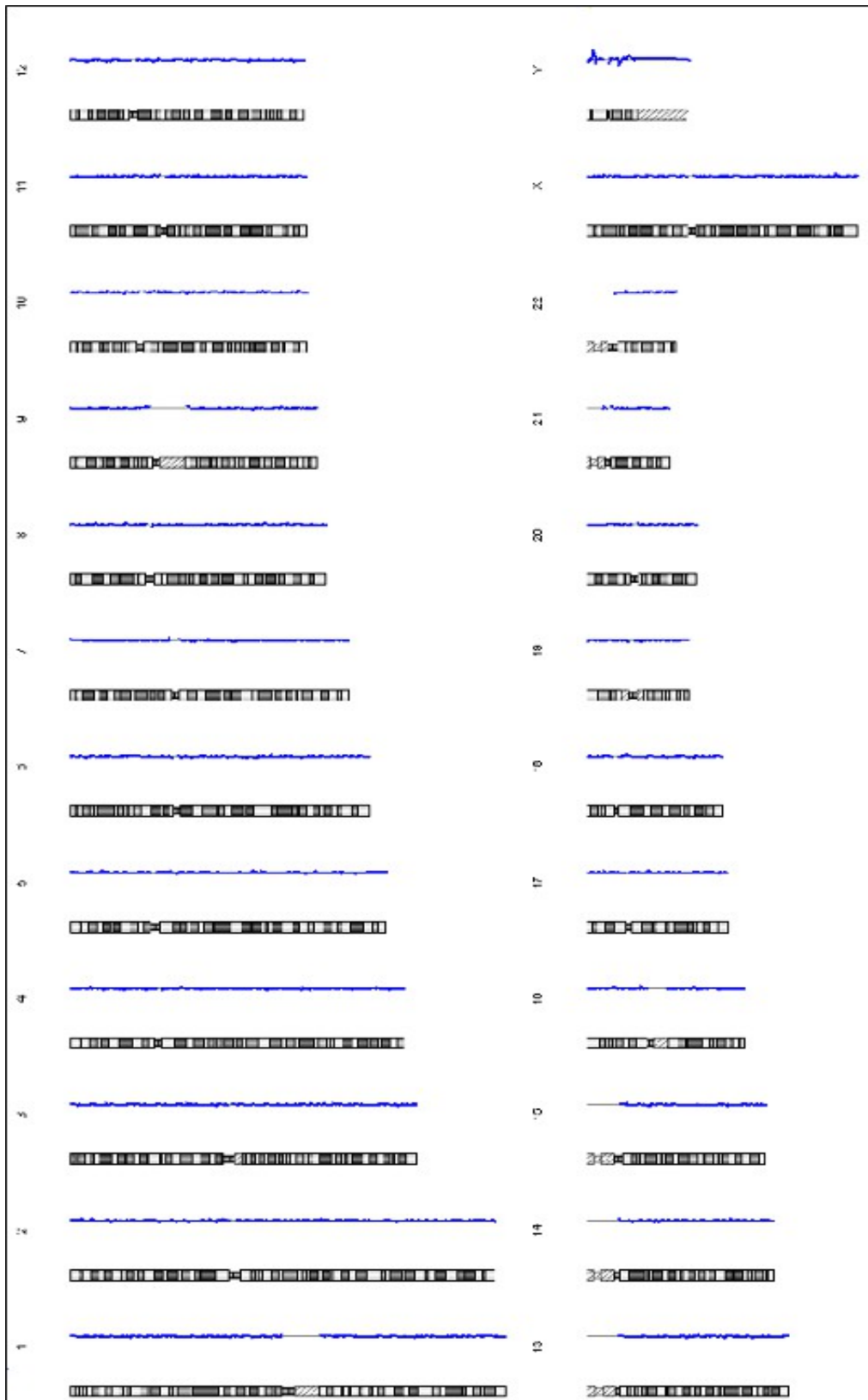


Figura 4.2 Genome view di un campione self/self utilizzato per verificare il setting dei parametri di analisi

Si è quindi proceduto con l'analisi di tutti gli altri campioni con le medesime impostazioni algoritmiche.

Per ogni probe il software calcola il logaritmo in base due (Log ratio data) del rapporto fra l'intensità del segnale fluorescente emesso dal campione (rosso) e l'intensità del segnale fluorescente emessa dal riferimento (verde), al fine di rilevare variazioni nel numero di copie fra i due DNA posti a confronto. Il valore logaritmico su base 2 del rapporto tra campione analizzato e reference è pari a +0.58 per le amplificazioni e -1 per le delezioni in eterozigosi (il valore si sposta a -3, -4 per le delezioni in omozigosi, in quanto risulta impossibile il rapporto 0/2).

I parametri impostati per l'analisi dei campioni oggetto di questo studio sono i seguenti:

ADM-2: 5.0.

Fuzzy-zero: ON.

Centralization algorithm: ON.

Moving Average algorithm: *triangular /window 1Mb*

Aberration Filter: (*minimo 3 probes*)

Dopo l'elaborazione dei dati, il software di analisi Workbench 5.0 presenta i risultati ottenuti in diverse finestre: *genome view* (si ha una panoramica delle aberrazioni presenti in tutto il genoma), *chromosome view* (vengono visualizzati i singoli cromosomi selezionati dal genome view), *gene view* (viene visualizzata solamente la regione selezionata dal chromosome view) e una tabella riportante i valori dei log ratio delle singole sonde, la posizione delle probes ed i geni situati nella regione. Sulla destra dei cromosomi vengono visualizzate le amplificazioni genomiche rilevate, mentre sulla sinistra vengono evidenziate le delezioni. Nella figura 4.3 è riportato un esempio di *genome view*, mentre in figura 4.4 è riportato un esempio di *chromosome view* e di *gene view* ottenuto da un campione analizzato.

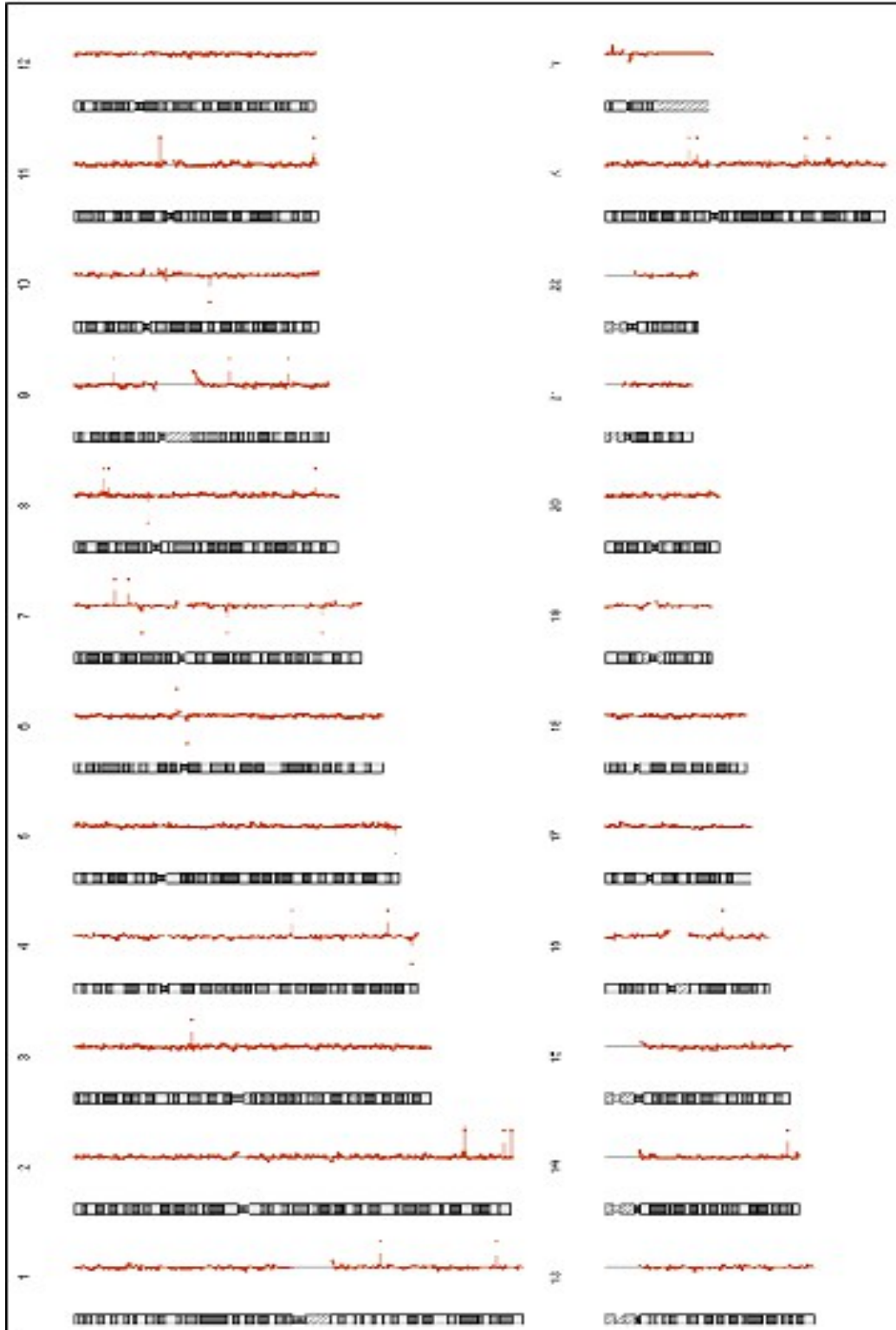


Figura 4.3. Genome view risultante dall'analisi di un campione T3. Le aberrazioni evidenziate sulla destra del cromosoma indicano le amplificazioni, a sinistra le delezioni

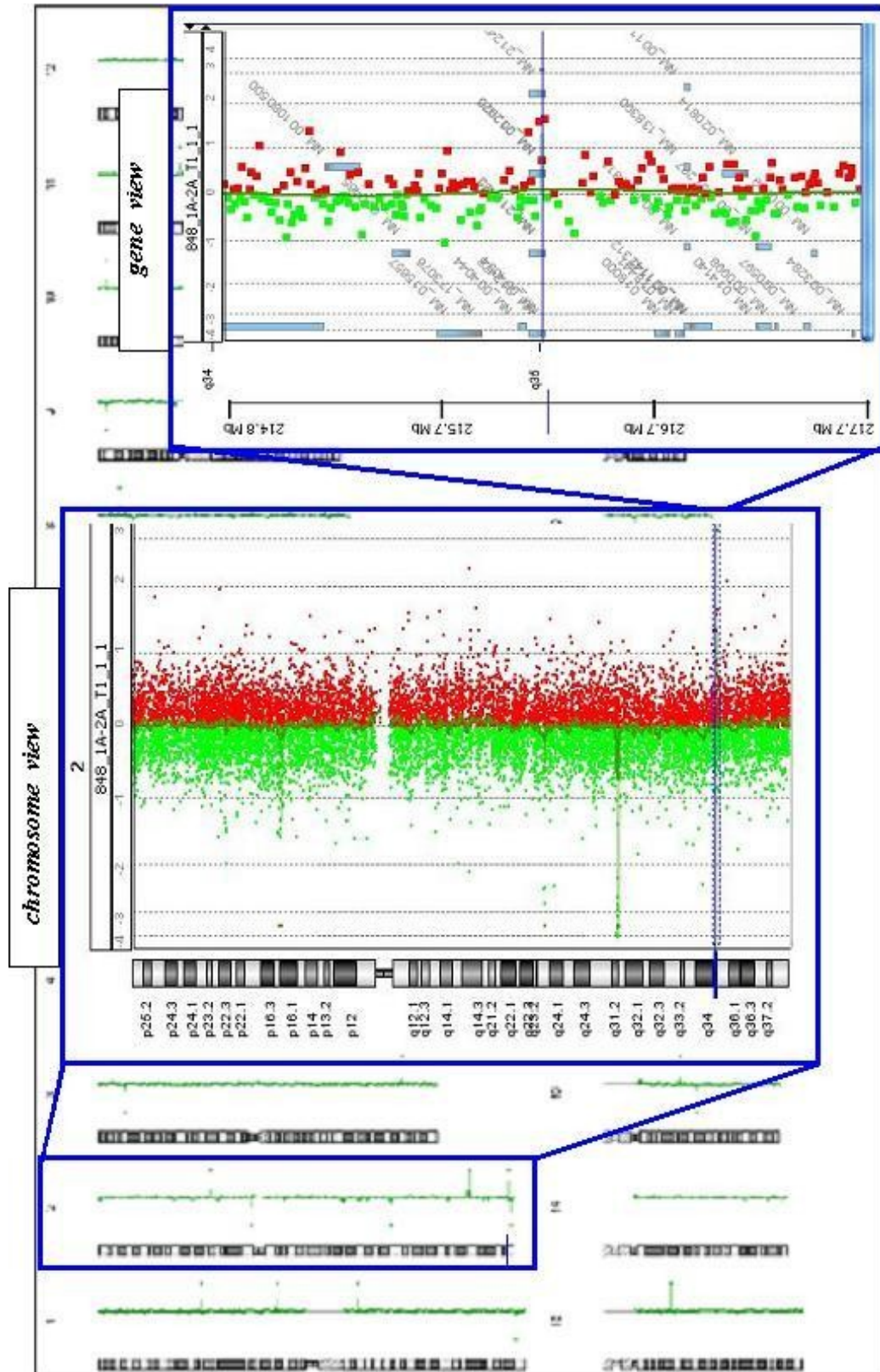


Figura 4.4 Dal genome view si seleziona un cromosoma per ottenere il chromosome view, mentre da questo si seleziona la regione da visualizzare in gene view.

L'analisi dei campioni PTC è stata effettuata separatamente sui due gruppi di campioni presi in esame: tumori definiti T1 e tumori T3. Per ogni gruppo sono state prese in considerazione le copy number aberrations presenti in almeno il 25% dei campioni esaminati (3 campioni per il gruppo T1 a bassa aggressività e 2 campioni per il gruppo T3 ad alta aggressività).

I dati così ottenuti sono riportati in figura 4.5.

Come si può osservare dall'ideogramma, le aberrazioni cromosomiche comuni ai tumori T3 coinvolgono più spesso duplicazioni di regioni geniche.

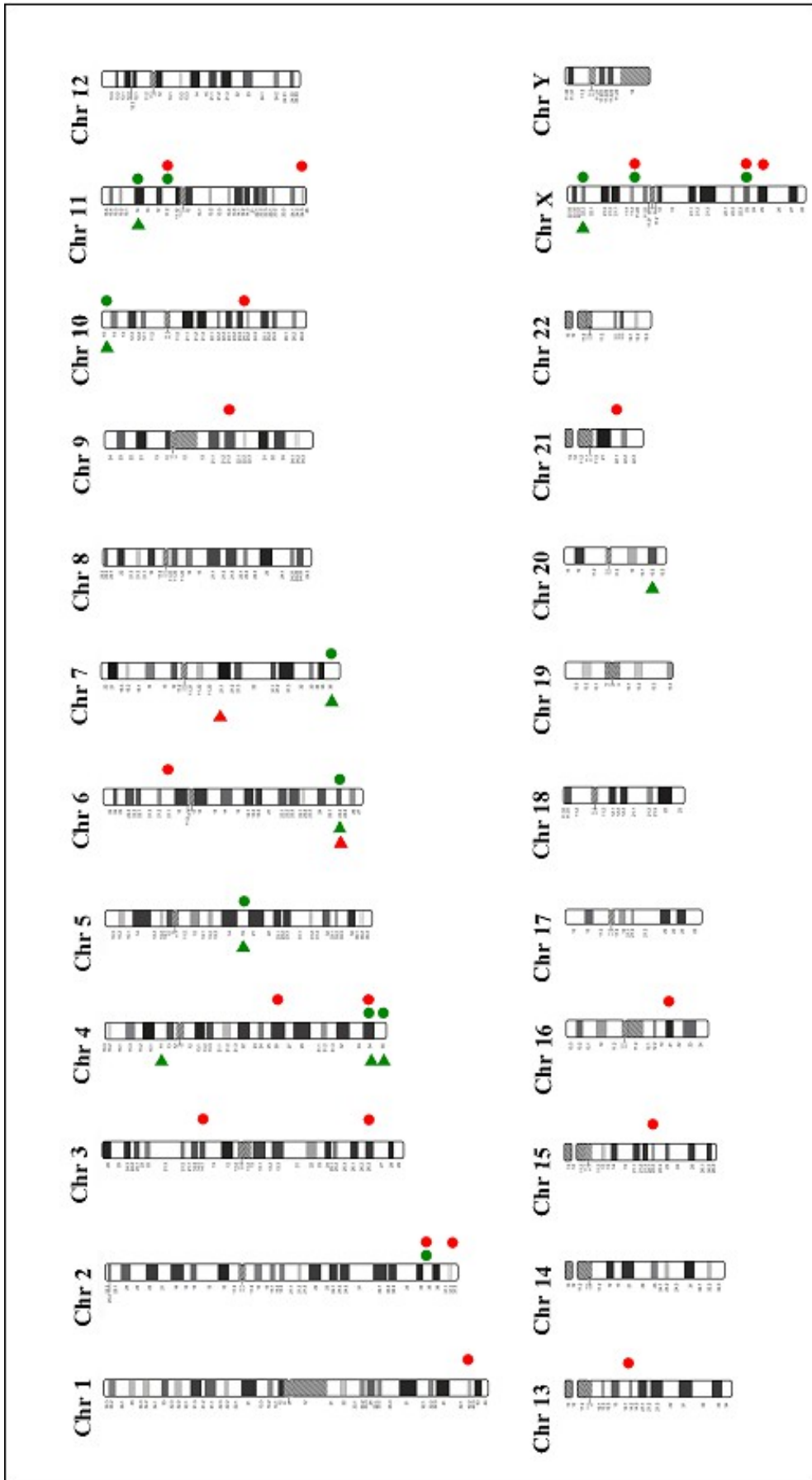


Figura 4.5. Ideogramma genomico in cui sono state evidenziate le aberrazioni del numero di copie geniche presenti in almeno tre tumori T1 (verde) ed in almeno due tumori T3 (rosso). Le amplificazioni sono riportate sulla destra del cromosoma (cerchi), mentre le delezioni sono riportate sulla sinistra del cromosoma interessato (triangoli).

Le aberrazioni identificate hanno grandezza variabile: dalle poche decine di kilobasi fino ad alcune megabasi. Il numero di aberrazioni con grandezza minore risulta più elevato di quelle che coinvolgono grandi regioni genomiche. La percentuale delle aberrazioni rispetto al totale delle stesse riscontrate in ciascun gruppo, sono riportate nell'istogramma della figura 4.6. Come si può notare la percentuale di aberrazioni con grandezza inferiore a 200 chilobasi è maggiore nel gruppo di tumori a bassa aggressività, mentre nei tumori ad alta aggressività è maggiore la percentuale di aberrazioni avente grandezza compresa tra le 200 e le 500 chilobasi.

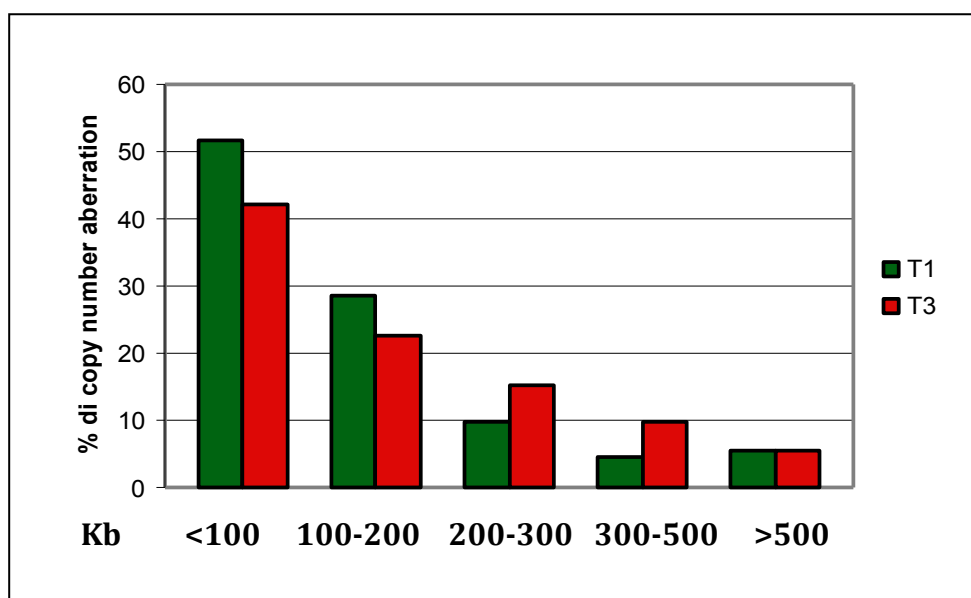


Figura 4.6. Istogramma della percentuale delle aberrazioni cromosomiche riscontrate nel gruppo di tumori T1 (verde) e nel gruppo di tumori T3 (rosso) suddivise per grandezza.

Nell'istogramma in figura 4.7 viene evidenziato il numero medio di aberrazioni riscontrate nei campioni appartenenti al gruppo T1 o al gruppo T3. Tali aberrazioni sono state suddivise tra amplificazioni e delezioni riscontrate in ogni singolo caso analizzato. Il numero di aberrazioni riscontrate sui singoli campioni risulta, in media, leggermente superiore nei campioni T3 (alta aggressività) rispetto a quelli a bassa aggressività (T1). Le aberrazioni di questi ultimi si suddividono in maniera equa tra amplificazioni e delezioni, mentre nei campioni ad alta aggressività il numero medio delle amplificazioni prevale sul numero medio delle delezioni.

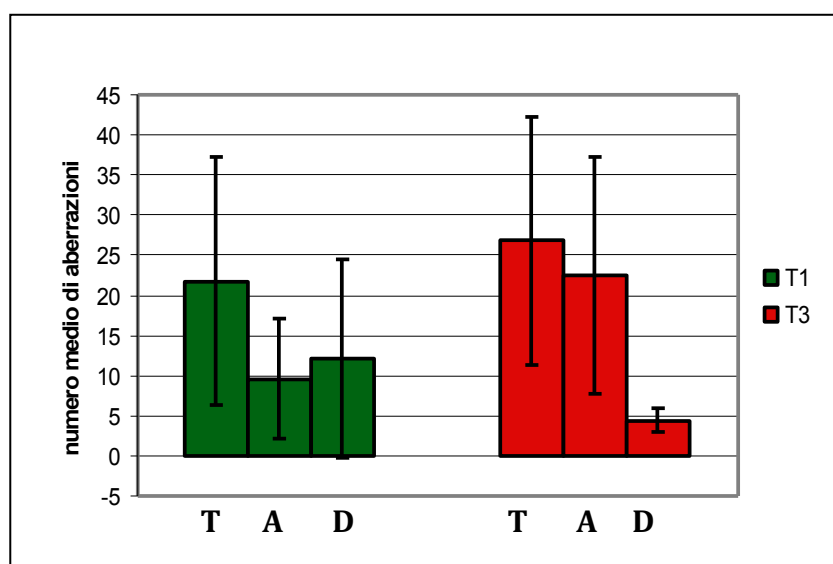


Figura 4.7. Istogramma del numero di aberrazioni cromosomiche riscontrate per ciascun campione analizzato. La prima colonna indica il numero medio di aberrazioni totali (T), suddivise poi in amplificazioni (A) e delezioni (D) medie.

Sono state così riscontrate aberrazioni specifiche per ciascun gruppo (T1 o T3) e aberrazioni che interessano sia i tumori T1 che i tumori T3 (Tab. 4.1). In questa tabella sono elencate le posizioni cromosomiche ed i geni coinvolti nelle aberrazioni comuni e riscontrate rispettivamente in almeno il 25% dei campioni dei tumori classificati come T1 o come T3 (P-value<0.05)

Le posizioni cromosomiche ed i geni coinvolti nelle aberrazioni specifiche dei tumori PTC meno aggressivi (T1) sono riportate in tabella 4.2. In questa tabella sono riportate le aberrazioni riscontrate in almeno 3 campioni dei tumori T1.

Nella tabella 4.3 sono invece riportate le posizioni cromosomiche ed i geni coinvolti nelle aberrazioni specifiche dei tumori PTC più aggressivi (T3) e riscontrate in almeno 2 campioni dei tumori T3.

Lo studio di comparazione tra le aberrazioni riscontrate in entrambi i gruppi di tumore analizzati ha portato all'identificazioni di aberrazioni comuni coinvolgenti numerosi geni.

Molte aberrazioni sono presenti, nell'ambito dello stesso gruppo analizzato, sia in delezione che in amplificazione. Abbiamo considerato tali sbilanciamenti come "passenger aberration" nell'ambito della trasformazione neoplastica. Con "passenger aberration" si intende un'alterazione genica somatica, dunque avvenuta durante la tumorigenesi, che però non ha un ruolo nella trasformazione e/o nella progressione della neoplasia; non sono implicate, dunque, nell'oncogenesi.

Viceversa, le aberrazioni presenti unicamente come delezione o amplificazione e riscontrate in almeno il 25% dei casi analizzati (3 campioni nei tumori T1 e 2 campioni nei tumori T3) possono essere considerate come "driver aberration". Con questo termine si intendono le aberrazioni che possono avere un ruolo nella trasformazione e/o nella progressione della neoplasia e che contribuiscono, quindi, allo sviluppo del tumore.

Tab. 4.1 Geni presenti in aberrazioni comuni ai tumori T1 ed ai tumori T3

Chr.	CytoBand	Geni (HGNC)	Tumori	# campioni		P-value
				Ampl	Del	
2	q35	FN1	T1	5		1.73E-37
			T3	5		
2	q37.3	PASK	T1	2		1.47E-19
			T3	4		
3	p14.1	ADAMTS9	T1	2		2.92E-17
			T3	3		
4	p14	ARAP2	T1		3	2.65E-08
			T3		1	
4	q26	PDE5A	T1	2		3.89E-10
			T3	2		
4	q34.1	GALNTL6	T1	2	1	8.14E-14
			T3	3		
6	q25.2	SYNE1	T1		3	5.93E-06
			T3		1	
6	q25.2	OPRM1 - IPCEF1	T1	1	4	3.02E-15
			T3		2	
7	q21.11	SEMA3D	T1		1	1.29E-06
			T3		2	
9	q21.32	FRMD3	T1	2		2.84E-10
			T3	3		
10	p15.1	KLF6	T1	1	2	0.000298
			T3		1	
10	q24.1	SLIT1	T1	1		4.88E-05
			T3	2		
11	p11.2	LRP4	T1	3		5.56E-16
			T3	2		
16	q21	CDH11	T1	1		3.84E-11
			T3	3		
21	q22.11	TIAM1	T1	1		3.89E-06
			T3	2		
X	p11.22	SHROOM4	T1	3		3.00E-08
			T3	2		
X	q23	TRPC5	T1	3		5.97E-09
			T3	2		
X	q25	ODZ1	T1	2		2.36E-17
			T3	5		

In grassetto sono evidenziate le “driver aberration”

Tab. 4.2 Geni presenti in aberrazioni specifiche dei tumori T1

Chr.	CytoBand	Geni (HGNC)	# campioni		P-value
			Ampl	Del	
4	q35.1	SORBS2	1	3	9.67E-10
5	q15	ELL2	1	4	0,01825
7	q36.3	ESYT2	1	2	0.00044
11	p14.1	MPPED2	1	2	5.41E-05
20	q13.2	NFATC2		4	0.000268
X	p22.2	ARHGAP6	1	2	4.25E-05

In grassetto sono evidenziate le “driver aberration”

Tab. 4.3 Geni presenti in aberrazioni specifiche dei tumori T3

Chr.	CytoBand	Geni (HGNC)	# campioni		P-value
			Ampl	Del	
1	q42.2	PCNXL2	2		6.91E-05
3	q26.31	TNIK	2		9.17E-05
6	p21.1	CCND3	2		0.009925
11	q25	OPCML	2		3.31E-09
13	q14.2	DLEU2	2		0.000134
15	q22.2	CA12	2		4.97E-06

In grassetto sono evidenziate le “driver aberration”

Nelle tabelle i geni riportati in grassetto sono quelli inclusi nelle aberrazioni considerate come “driver mutation”.

Tutti i campioni analizzati sono negativi per le mutazioni nel gene *BRAF* e per le mutazioni dell'oncogene *RAS*.

Per 2 geni la validazione dei risultati ottenuti dall'analisi array-CGH è stata effettuata mediante saggio di Real-Time SYBR Green utilizzando il metodo di quantificazione relativa $\Delta\Delta C_T$. I DNA dei campioni tumorali dei pazienti sono stati confrontati rispetto il DNA del tessuto sano dello stesso paziente. Il numero di volte di incremento (o decremento) del gene target nel test campione (tessuto tumorale) è stato calcolato, quindi, in relazione al campione calibratore (tessuto sano) e normalizzato verso il gene di riferimento. Per il soggetto in esame il valore di RQ (Relative Quantity) del

calibratore (tessuto sano) nella tabella di output di analisi dati, è pari ad 1. Il tessuto tumorale dello stesso individuo è stato così valutato rispetto a questo valore. Per i campioni amplificati il valore di RQ si attesterà a 1.5 (3 copie geniche) in caso di amplificazione oppure al valore di 0.50 (1 copia genica) in caso di delezione. I valori medi ottenuti dalle amplificazioni dei campioni T3 per il gene *FNI* (amplificato nella nostra casistica) e dei campioni T3 e T1 per il gene *ARAP2* (deleto nella nostra casistica) sono riportati nell'istogramma in figura 4.8.

Non è stato possibile effettuare l'analisi in oggetto su tutti i campioni in quanto in alcuni di questi il numero di copie geniche in esame differiva già in maniera significativa tra i diversi campioni di tessuto sano. Ciò a causa, molto probabilmente, della frammentazione/degradazione del DNA in esame che è stato ottenuto mediante estrazione da campione incluso in paraffina e quindi assoggettato a diverse manipolazioni. Tale frammentazione può infatti influire notevolmente sulla reazione di amplificazione e quindi sul risultato stesso dell'analisi.

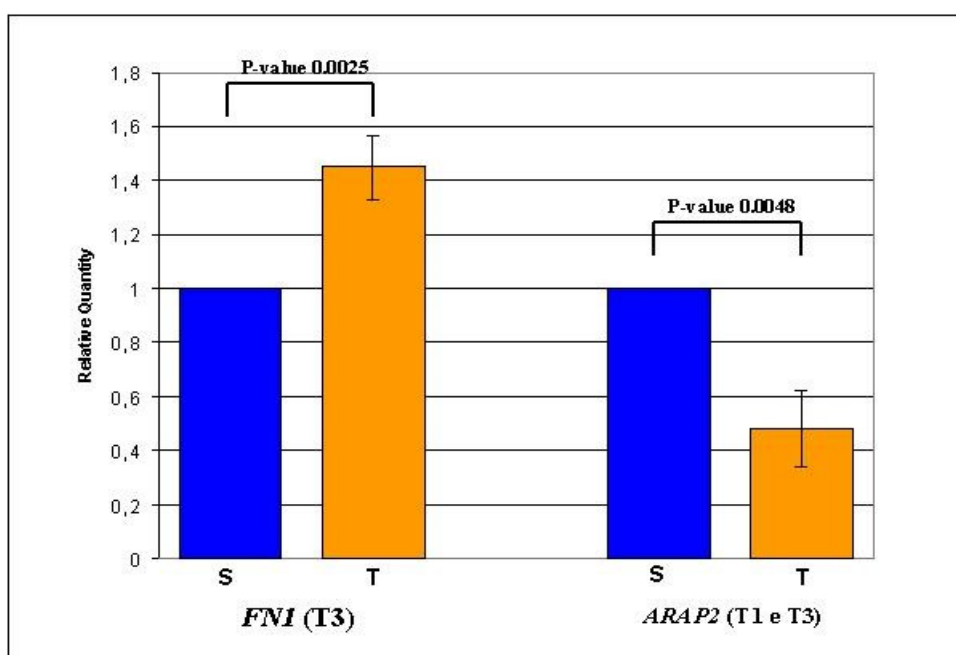


Figura 4.8 Relative Quantity (RQ) del numero di copie geniche ottenuto mediante amplificazione tramite Real-Time PCR. Nella parte sinistra dell'istogramma sono stati riportati i valori medi di RQ per il gene *FNI* (amplificato nella nostra casistica) ottenuti dalle amplificazioni dei tessuti tumorali (T) rispetto ai tessuti sani [(S), RQ=1 vedi testo] dei campioni T3. Nella parte destra dell'istogramma sono stati riportati i valori medi di RQ ottenuti dalle amplificazioni dei tessuti tumorali (T) rispetto ai tessuti sani [(S), RQ=1 vedi testo] dei campioni T1 e T3 per il gene *ARAP2* (deleto nella nostra casistica).

5 Discussione

5.1 Geni presenti in aberrazioni somatiche comuni ai tumori T1 ed ai tumori T3

Di seguito viene descritta la funzione e l'eventuale coinvolgimento nella tumorigenesi dei prodotti genici coinvolti nelle aberrazioni comuni ai tumori T1 ed ai tumori T3. Sono stati presi in considerazione solamente i geni correlati a "driver mutation" (Tab 4.1, geni evidenziati in grassetto).

FN1, Fibronectin 1 (amplificato nella nostra casistica): è una glicoproteina presente nel plasma in forma di dimero solubile o in forma multimerica o dimerica sulla superficie cellulare o nella matrice extracellulare. La fibronectina si lega alle superfici cellulari ed a varie molecole, quali collagene, fibrina, eparina, DNA ed actina. E' coinvolta nei processi di adesione cellulare e migrazione cellulare, nell'embriogenesi, nella coagulazione del sangue, nella difesa immunitaria e nelle metastasi. Numerosi studi ne hanno evidenziato l'overespressione nei tumori tiroidei ed è stata indicata come marker molecolare nei tumori tiroidei differenziati (Hesse *et al.*, 2005), nella discriminazione tra tumori tiroidei follicolari benigni e maligni (Fryknäs *et al.*, 2006), e come importante modulatore dell'adesività e della crescita neoplastica cellulare tiroidea. (Liu *et al.*, 2005). In uno studio del 2005 Prasad e colleghi hanno indicato come la coespressione di FN1 e GAL3 o di FN1 e HBME1 rilevata mediante immunisto chimica può essere d'aiuto nella diagnosi differenziale tra tumori follicolari tiroidei (lesioni maligne) ed adenomi follicolari (lesioni benigne). Uno studio sui carcinomi tiroidei papilliferi aneuploidi ha evidenziato che la co-overespressione di FN1 e MET è presente solamente in tumori positivi per la mutazione attivante *BRAF* (Rodrigues *et al.*, 2007). Anche l'analisi molecolare su biopsie tiroidee ha rilevato un'overespressione di FN1, GALE, MET, e QPCT nei carcinomi papilliferi tiroidei (da Silveira Mitteldorf *et al.*, 2011).

PASK, PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase (amplificato nella nostra statistica): appartiene alla famiglia delle serine/treonine chinasi e contiene due domini PAS. L'espressione genica è controllata dal glucosio e la proteina è coinvolta

nella regolazione dell'espressione genica dell'insulina. Ha un ruolo nell'omeostasi energetica e nella modificazione post-traduzionale (fosforila *EEF1A1*, *GYS1*, *PDX1* e *RPS6*). Agisce come sensore nell'omeostasi energetica: regola la sintesi della glicogeno sintetasi mediante fosforilazione e conseguente inattivazione di *GYS1*. Può anche partecipare alla regolazione respiratoria. L'attività di questo enzima è stata associata allo sviluppo del melanoma maligno (Marchetti *et al.*, 2003).

Non ci sono studi su un coinvolgimento di *PASK* nella tumorigenesi tiroidea.

ADAMTS9, A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif (amplificato nella nostra statistica): le proteine appartenenti alla famiglia delle proteine *ADAMTS* condividono distinti moduli proteici, inclusi una regione propeptidica, un dominio metalloproteico, un dominio disintegrina-like e un motivo trombospondina tipo 1 (TS). Alcune proteine appartenenti alla famiglia *ADAMTS* sono implicate nel taglio dei proteoglicani, nel controllo della forma dell'organo durante lo sviluppo e nell'inibizione dell'angiogenesi.

Dai dati presenti nella letteratura recente risulta avere attività di soppressore tumorale. In uno studio si dimostra che il suo silenziamento genico porta all'incremento dell'estensione dei filopodi cellulari, decremento dell'adesione cellulare e incremento della migrazione cellulare (Koo *et al.*, 2010). In uno studio sul tumore gastrico si è dimostrato che l'attività di soppressore tumorale agisce mediante l'inibizione della pathway *AKT/mTOR* (Du *et al.*, 2012).

Non ci sono studi su un coinvolgimento di *ADAMTS9* nella tumorigenesi tiroidea.

ARAP2, ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain (deleto nella nostra casistica): appartiene alla famiglia delle proteine aventi un dominio catalitico comune che induce l'idrolisi del GTP legato alle proteine leganti *Arf-GTP*. Modula l'actina del citoscheletro e le attività cellulari come la migrazione ed il movimento, che dipendono dal citoscheletro. (Randazzo *et al.*, 2007). In particolare *ARAP2* media gli effetti di *RhoA* sulla formazione ed il rimodellamento della struttura cellulare, incluse le adesioni focali e lo stress delle fibre di actina (filopodia e lamelliopodia) (Yoon *et al.*, 2006).

Non ci sono evidenze di un coinvolgimento di *ARAP2* nei tumori tiroidei.

PDE5A, Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (amplificato nella nostra statistica): è una fosfodiesterasi che idrolizza specificatamente cGMP a 5'-GMP. E' coinvolta nella regolazione della concentrazione intracellulare di nucleotidi ciclici ed è importante per il rilassamento della muscolatura liscia nel sistema cardiovascolare.

Questo enzima è coinvolto in varie vie di trasduzione del segnale che regolano la proliferazione e la contrazione della muscolatura liscia vascolare, la contrattilità cardiaca, l'aggregazione delle piastrine, la secrezione ormonale, l'attivazione delle cellule del sistema immunitario, l'acquisizione delle nozioni e la memoria. Nella linea cellulare tumorale umana del colon HT29 la soppressione dell'espressione genica di PDE5A mediante RNA antisenso inibisce la crescita cellulare e induce apoptosi (Zhu *et al.*, 2005)

In uno studio recente (Azozarena *et al.*, 2011) è stato dimostrato che l'oncogene *BRAF*, in cellule di melanoma, induce invasione cellulare mediante downregolazione di PDE5A. Sebbene la downregolazione di PDE5A causa un piccolo decremento nella proliferazione, l'impatto maggiore è la forte stimolazione dell'invasività cellulare del melanoma. Non è stata osservata questa pathway in mutanti di melanoma *NRAS* o mutanti *BRAF* nelle cellule del colonretto.

Non ci sono evidenze di un coinvolgimento di PDE5A nei tumori tiroidei.

SYNE1, Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1 (deleto nella nostra casistica): è una proteina modulare multi-isomerica che forma un network tra gli organelli e il citoscheletro per mantenere l'organizzazione spaziale subcellulare. E' coinvolta quindi nel mantenimento dell'integrità e dell'organizzazione cellulare. Il gene SYNE1 risulta essere frequentemente metilato in tutte le lesioni neoplastiche premaligne del tratto gastrointestinale (Dhir *et al.*, 2011). In uno studio sulla deregolazione genica nel carcinoma ovarico è risultato downregolato l'mRNA codificante per una proteina di 350 Kda, Drop1. L'mRNA è codificato da un set di esoni siti nella regione al 5' del gene SYNE1. La perdita di espressione di Drop1 risulta comune a molti tumori, compreso quello tiroideo (Marmè *et al.*, 2008).

SEMA3D, Semaphorin 3D (deleto nella nostra casistica): induce il collasso e la paralisi dei coni di crescita neuronale. In uno studio recente sullo sviluppo dei glioblastomi multiformi, Sabag e colleghi hanno riscontrato che SEMA3D inibisce

l'angiogenesi e quindi ha un effetto anti-tumorigenico (Sabag *et al.*, 2012).

Non ci sono studi su un coinvolgimento di SEMA3D nella tumorigenesi tiroidea.

FRMD3, FERM domain containing 3 (amplificato nella nostra statistica): la funzione della proteina non è stata determinata. Un lavoro ne evidenzia la sua attività di tumor suppressor-gene implicato nell'origine e nella progressione del tumore ai polmoni. La sua overespressione in diverse linee cellulari epiteliali ha dimostrato avere come effetto un decremento della clonigenicità. Le capacità di attaccamento cellulare ed il tasso di proliferazione sono rimasti invariati, ma il fenotipo è stato ricondotto all'apoptosi (Haase *et al.*, 2007). Il gene è compreso nella regione comunemente deleta del cromosoma 9q, aberrazione ricorrente nella leucemia mieloide cronica. (Sweetser *et al.*, 2005).

Non ci sono studi specifici su un coinvolgimento di FRMD3 nei tumori tiroidei.

SLIT1, Slit homolog 1 (Drosophila) (amplificato nella nostra casistica): è un componente della famiglia di glicoproteine di secrezione composta da 3 membri (SLIT1, SLIT2 e SLIT3) che in origine sono stati identificati come regolatori della migrazione neuronale e della proiezione assonale (Brose *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999). I recettori per SLIT sono le proteine transmembrana Roundabout (ROBO). Wang et al nel 2003 hanno dimostrato che SLIT è secreta da diverse cellule tumorali ed è in grado di attrarre, in vitro, le cellule vascolari endoteliali che esprimono ROBO1 e quindi promuovere l'angiogenesi e la progressione tumorale. Gli studi di questi ultimi anni sul ruolo delle proteine SLIT nella tumorigenesi risultano contrastanti. In alcuni lavori queste vengono indicate come soppressori della tumorigenesi; l'espressione ne risulta silenziata in diversi tipi di cancro attraverso l'ipermetilazione del promotore. (Marlow *et al.*, 2008; Narayan *et al.*, 2006). Latil et al. (2003) hanno invece riscontrato un overespressione delle proteine SLIT1, SLIT3 e dei loro recettori Robo nei tumori umani della prostata. Studi del cariotipo molecolare sui tumori epatici non hanno evidenziato variazione del numero di copie geniche associate ad overespressione proteica (Midorikawa *et al.*, 2006; Midorikawa *et al.*, 2007). In uno studio di espressione genica effettuato su 26 PTC, al fine di correlare il fenotipo molecolare alla patologia, si è evidenziata un up-regolazione di SLIT1 (Delys *et al.*, 2007).

LRP4, Low density lipoprotein receptor-related protein 4 (amplificato nella nostra casistica): la proteina fa parte della famiglia delle lipoproteine a bassa densità associate ai recettori. Ha un ruolo chiave nella formazione e nel mantenimento delle giunzioni neuromuscolari, le sinapsi tra i motoneuroni ed il muscolo scheletrico. Può essere coinvolta nella regolazione negativa della via di segnale di Wnt. Uno studio sul diverso profilo di espressione genica tra 23 pazienti PTC e 10 pazienti con altra patologia tiroidea, ha evidenziato un incremento dell'espressione genica di LRP4 nei PTC (Jarzab *et al.*, 2005).

CDH11, Cadherin 11 (amplificato nella nostra casistica): è un componente della superfamiglia delle caderine, proteine integrali di membrana che mediano l'adesione cellulare calcio-dipendente. In diversi studi è stato dimostrato che CDH11 agisce come inibitore della crescita tumorale, della motilità e dell'invasività cellulare (Li *et al.*, 2012, Carmona *et al.*, 2012).

Non ci sono studi specifici su un coinvolgimento di CDH11 nei tumori tiroidei.

TIAM1, T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (amplificato nella nostra casistica): modula l'attività delle proteine RHO-like e connette i segnali extracellulari con l'attività del citoscheletro. Agisce come dissociatore GDP che stimola l'attività di scambio GDP-GTP delle GTPasi RHO-like attivandole. E' coinvolta nella proliferazione cellulare, nell'organizzazione del citoscheletro, nell'adesione cellulare e nell'attivazione trascrizionale. In uno studio recente (Hsueh *et al.*, 2011) è stata analizzata l'espressione di Tiam1 in PTC e la sua associazione con i dati clinicopatologici ed il suo significato prognostico. L'espressione di Tiam1 è stata considerata come un indicatore prognostico significativo ed indipendente (bassa espressione, minor tempo di sopravvivenza rispetto al gruppo con alta espressione). Un altro studio ha dimostrato che l'espressione di Tiam è regolata dall'oncomir microRNA-21. Una diminuzione nell'espressione di Tiam1 incrementa la migrazione e l'invasione cellulare via upregolazione di B-catenina, vimentina e metalloproteinase-2 nelle cellule epatiche (Huang *et al.*, 2013)

SHROOM4, Shroom family member 4 (amplificato nella nostra casistica): la proteina è un regolatore dell'architettura del citoscheletro mediante la modulazione spaziale della

miosina II. Mutazioni del gene Shroom4 sono associate a ritardo mentale (Hagens *et al.*, 2005).

Non ci sono evidenze di un coinvolgimento di SHROOM4 nei tumori tiroidei.

TRPC5, Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (amplificato nella nostra casistica): è una proteina transmembrana che funziona come recettore-attivato da canale cationico non selettivo. La proteina è attiva da sola o come eterodimero in assemblamento con altre proteine TRPC (1, 3, 4). In uno studio effettuato su un modello di topo nudo atimico l'overespressione di TRPC5 decrementa la crescita tumorale. NFACT3 è il fattore trascrizionale che lega l'attività di TRPC5 alla produzione P-gp, coinvolto nella resistenza ai farmaci delle cellule cancerogene. (Ma *et al.*, 2012).

Non ci sono evidenze di un coinvolgimento di TRPC5 nei tumori tiroidei.

ODZ1, odz, odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila) (amplificato nella nostra statistica): la proteina fa parte della famiglia delle tenascine e della subfamiglia delle teneurine. E' espressa nei neuroni e può funzionare come trasduttore del segnale cellulare. In uno studio di espressione genica mediante DNA-array effettuato su 8 tessuti di PTC comparati a tessuto di tiroide normale, ODZ1 risulta overespresso (Huang *et al.*, 2001).

In figura 5.1 sono riportati, in sintesi, il numero dei campioni coinvolti nelle diverse aberrazioni suddivisi per funzione genica in accordo con GeneOntology.

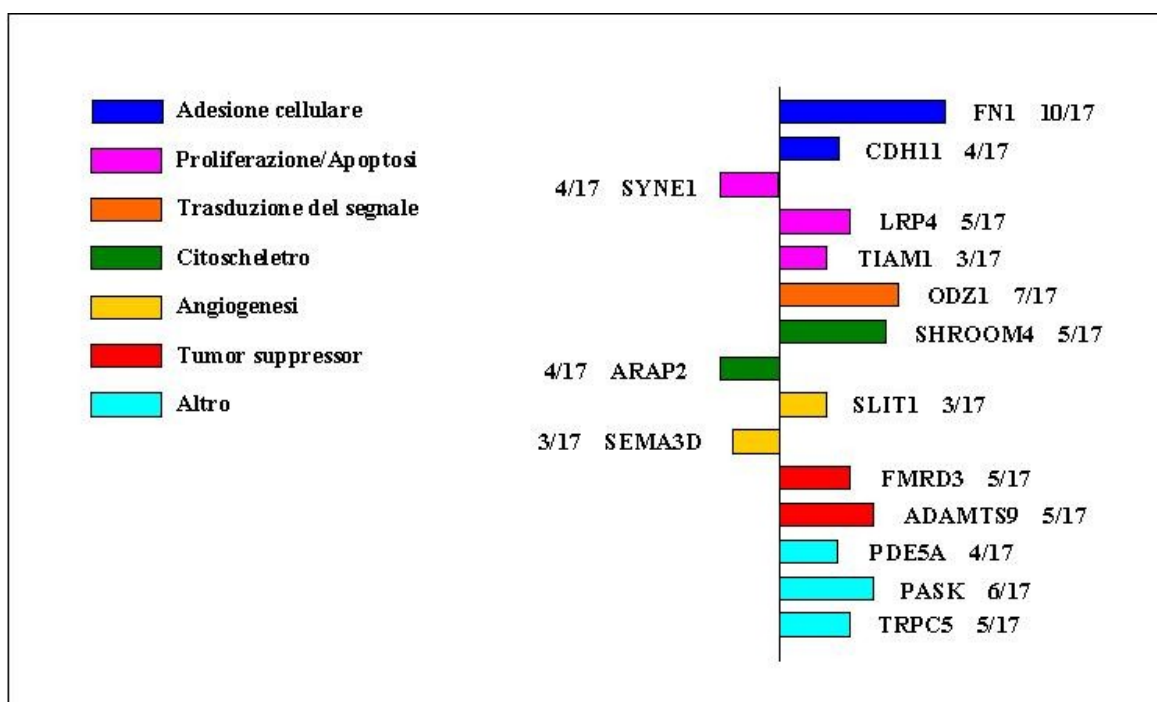


Figura 5.1. Riassunto schematico delle “driver aberration” comuni ai campioni T1 e T3. I geni riportati a destra della linea risultano amplificati, quelli riportati a sinistra della linea risultano deleti.

Complessivamente quindi le regioni genomiche alterate nei tumori tiroidei papilliferi a bassa ed alta aggressività e considerate come “driver aberration” nello sviluppo neoplastico contengono geni che codificano per proteine coinvolte nel processo di adesione cellulare (FN1, CDH11 nell’82,3% dei campioni) e nel controllo della proliferazione/morte cellulare (SYNE1, LRP4 e TIAM1 nel 70,6% dei campioni).

Molte di queste proteine, sopra catalogate sotto un’unica funzione cellulare, sono però coinvolte nella regolazione di diversi processi biologici.

Per valutare le attività biologiche più rappresentative presenti nella nostra lista di geni, abbiamo utilizzato il metodo statistico del software DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Dennis *et al.* 2003, Hosack *et al.*, 2003) che evidenzia le funzioni più rappresentate in accordo con le annotazioni del database Gene Ontology. I principali processi biologici globali alterati nelle PTC sono: adesione cellulare mediata dal segnale (*ADAMTS9*, *CDH11*, *FN1*, *ODZ1*, *SLIT1*, P-value 0.00017), comunicazione cellulare (*ADAMTS9*, *CDH11*, *FN1*, *ODZ1*, *SEMA3D*, *SLIT1*, P-value 0.0016), morfogenesi cellulare (*FN1*, *SHROOM4*, *SLIT1*, P-value 0.032), struttura e motilità cellulare (*ARAP2*, *TIAM1*, *FN1*, *SLIT1*, P-value 0.043),

differenziamento cellulare (*TIAMI*, *FNI*, *SEMA3D*, *SLIT1*, *SYNE1*, P-value 0.048).

I nostri risultati corroborano precedenti studi in letteratura nei quali adesione e disregolazione nella trasduzione del segnale sono indicati come eventi fondamentali della tumorigenesi.

5.2 Geni presenti in aberrazioni somatiche specifiche dei tumori T1

Di seguito viene descritta la funzione e l'eventuale coinvolgimento nella tumorigenesi dei prodotti genici coinvolti nelle aberrazioni specifiche al gruppo di tumori a bassa aggressività (T1). Sono stati presi in considerazione solamente i geni amplificati o deleti nell'ambito del gruppo analizzato (Tab 4.2, gene evidenziato in grassetto)

NFATC2, Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (deleto nella nostra casistica): proteina facente parte del complesso di trascrizione NFATC attivato dalla famiglia delle cellule T. Il complesso ha un ruolo centrale nell'indurre la trascrizione genica durante la risposta immunitaria. NFATC2 ha funzione pro-apoptotica nelle cellule con linfoma di Burkitt (Kondo *et al.*, 2003). In uno studio effettuato sul tumore del pancreas si è dimostrato che NFACTc2 è un target trascrizionale nella via di segnale di WNT5A, a sua volta target del fattore di trascrizione antiapoptotico CUX1. NFACTc2 conferisce un forte fenotipo antiapoptotico modulando gli effetti di WNT5A sulla resistenza ai farmaci inducenti apoptosi e quindi la sopravvivenza cellulare tumorale. Entrambe queste proteine risultano overesprese nel tumore pancreatico umano (Griesmann *et al.*, 2013).

Non ci sono studi su un coinvolgimento di *NFATC2* nella tumorigenesi tiroidea.

In figura 5.2 è riportato, in sintesi, il numero dei campioni coinvolti nell'aberrazione specifica per i campioni T1 evidenziato per funzione genica in accordo con GeneOntology

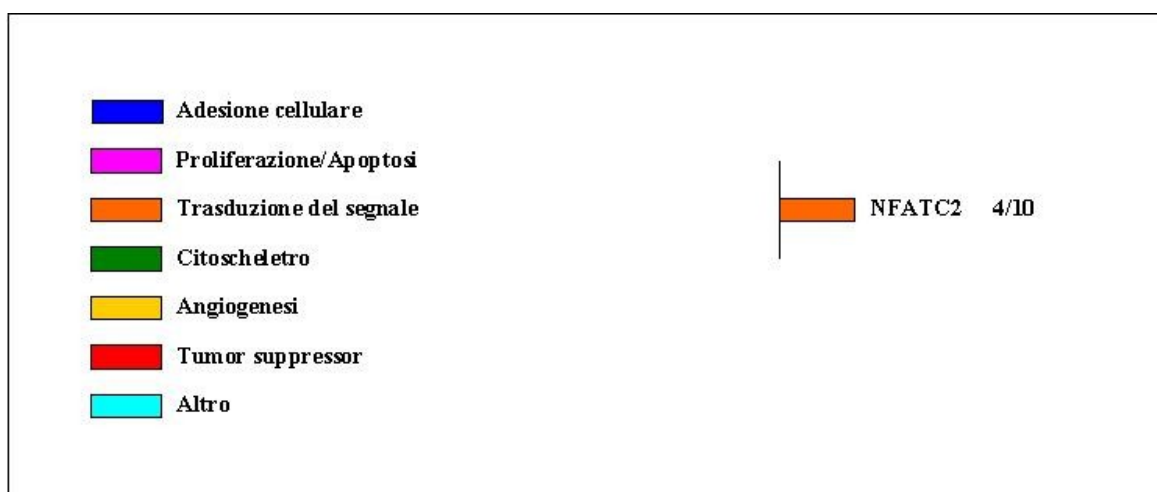


Figura 5.2. Riassunto schematico della “driver aberration” comune ai campioni T1. I geni riportati a destra della linea risultano amplificati, quelli riportati a sinistra della linea risultano deleti

Complessivamente nei tumori T1 (bassa aggressività) l’unico gene riscontrato aberrato (amplificato) in 4 campioni su 10 (40%) risulta implicato nella via di segnale Wnt.

Per valutare le attività biologiche più rappresentative con il metodo statistico DAVID abbiamo inserito questo gene alla lista dei geni compresi nelle “driver aberration” comuni. Il principale processo biologico alterato nei tumori T1 a bassa aggressività è implicato nei processi di sviluppo cellulare e coinvolge i geni *CDH11*, *LRP4*, *ODZ1*, *SEMA3D*, *SLIT1*, *NFATC2* (P-value 0.029).

5.3 Geni presenti in aberrazioni somatiche specifiche dei tumori T3

Di seguito viene descritta la funzione e l’eventuale coinvolgimento nella tumorigenesi dei prodotti genici coinvolti nelle aberrazioni specifiche al gruppo di tumori ad alta aggressività (T3). Sono stati presi in considerazione solamente i geni amplificati o deleti nell’ambito del gruppo analizzato (Tab 4.3, geni evidenziati in grassetto).

PCNXL2, Pecanex-like 2 (Drosophila) (amplificato nella nostra casistica): può giocare un ruolo nella tumorigenesi del carcinoma del colonretto con alta instabilità dei microsatelliti. L'alta frequenza dell'instabilità dei microsatelliti è una caratteristica molecolare nei tumori associati al cancro del colonretto ereditario senza poliposi dove PCNXL2-2 risulta come antigene mutato in frameshift. (Speetjens *et al.*, 2008).

Non ci sono evidenze di un coinvolgimento di *PCNXL2* nei tumori tiroidei.

TNIK, TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (amplificato nella nostra casistica): è una serina-treonina chinasi ed è un attivatore essenziale nella via di segnale Wnt (Mahmoudi *et al.*, 2009). Fa anche parte di un complesso di segnali composto anche da NEDD4 e RAP2A che regola l'estensione dendritica dei neuroni e l'arborizzazione durante lo sviluppo. Gioca inoltre un ruolo nei riarrangiamenti del citoscheletro e regola la diffusione cellulare. Le proteine Wnt svolgono un ruolo importante nello sviluppo embrionale attraverso il controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento cellulare e tissutale e della polarità cellulare. L'attivazione della via di segnale Wnt ha un ruolo nella tumorigenesi tiroidea, sia come evento precoce della carcinogenesi che come evento coinvolto nella progressione da carcinoma differenziato (meno aggressivo) a carcinoma poco o indifferenziato (carcinoma anaplastico, più aggressivo) (Sastre-Perona *et al.*, 2012).

CCND3, Cyclin D3 (amplificato nella nostra casistica): le cicline funzionano come regolatori delle CDK kinasi. CCND3 forma un complesso con CDK4 o CDK6 ed è una subunità regolatoria dell'attività del complesso stesso, che è richiesto per la transizione G1/S del ciclo cellulare. Componente regolatorio del complesso D3-CDK4 (DC) che fosforila e inibisce membri della famiglia proteica del retinoblastoma (RB) incluso RB1 e, come detto sopra, regola il ciclo cellulare durante la transizione G(1)/S. Overespressa nei carcinomi tiroidei a cellule Hurthle (Troncone *et al.*, 2009). È anche substrato di SMAD3; la fosforilazione da parte di SMAD3 in maniera ciclo cellulare-dipendente, reprime la sua attività trascrizionale.

OPCML, Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like (amplificato nella nostra casistica): appartiene alla subfamiglia IgLON inclusa nella superfamiglia delle immunoglobuline. In numerosi studi viene dimostrata una correlazione significativa tra

perdita di espressione genica e sviluppo tumorale, evidenziando quindi l'attività oncosoppressoria di OPCML (indicato come oncosoppressore (Sellar *et al.*, 2003; Duarte-Pereira *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2008).

Non ci sono studi su un coinvolgimento di *OPCML* nella tumorigenesi tiroidea.

DLEU2, deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding) (amplificato nella nostra statistica): il prodotto genico è un RNA non codificante che subisce poliadenilazione e splicing (Migliazza *et al.*, 2001). In una regione intronica è localizzato il cluster dei miRNA (miR)-15a/16-1 (Lagos-Quintana *et al.*, 2001) coinvolti nel controllo della proliferazione delle cellule B. La funzione di DLEU2 è sconosciuta e la sua sequenza non mostra analogia con altri RNA non codificanti. E' stato identificato come un potenziale soppressore tumorale ed è stato trovato spesso deleto in pazienti con leucemia linfocitica cronica, adenomi della ghiandola pituitaria, e carcinomi della prostata. (Aqeilan *et al.*, 2010). L'espressione di miR-15a risulta disregolata nei PTC con mutazione BRAFV600E (Huang *et al.*, 2013).

CA12, Carbonic anhydrase XII (amplificato nella nostra casistica): le anidrasi carboniche (CAs) sono una grande famiglia di metalloenzimi che catalizzano l'idratazione reversibile del diossido di carbonio. Partecipano ad una varietà di processi biologici, quali respirazione, calcificazione, bilancio acido-base, riassorbimento osseo. CA12 è altamente espressa in tessuti normali quali reni, colon e pancreas ed è stata trovata overespressa nel 10% dei carcinomi renali a cellule chiare (Tureci *et al.*, 1998), nei tumori del colonretto (Kivela *et al.*, 2000a) e nei tumori del pancreas (Kivela *et al.*, 2000b). Stein e colleghi in uno studio del 2010 riportano un'alterazione del numero di copie e dell'espressione genica di 4 geni specifici, tra cui *CA12*, in cancro tiroideo post-Chernobyl.

In figura 5.3 è riportato, in sintesi, il numero dei campioni coinvolti nell'aberrazione specifica per i campioni T3 evidenziato per funzione genica in accordo con GeneOntology

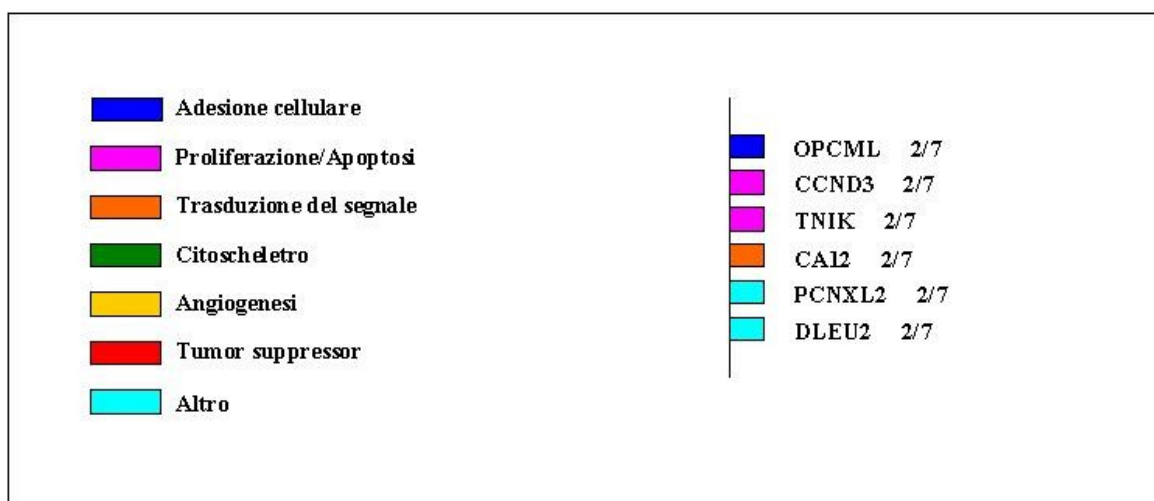


Figura 5.3. Riassunto schematico della “driver aberration” comune ai campioni T3. I geni riportati a destra della linea risultano amplificati, quelli riportati a sinistra della linea risultano deleti

Complessivamente quindi le regioni genomiche alterate nei tumori tiroidei papilliferi ad alta aggressività contengono geni che codificano per proteine coinvolte nel processo di proliferazione/apoptosi cellulare (*CCND3*, *TNIK* nel 57.1% dei campioni), mentre una disregolazione nel processo di adesione cellulare (*OPCML*) interessa il 28.5% dei campioni.

Molte di queste proteine, qui catalogate sotto un'unica funzione cellulare, sono però coinvolte nella regolazione di diversi processi biologici.

Per valutare le attività biologiche più rappresentative con il metodo statistico DAVID abbiamo inserito questi geni alla lista dei geni compresi nelle “driver aberration” comuni. I principali processi biologici alterati nei tumori T3 ad alta aggressività sono implicati nei processi di adesione cellulare (*ARAP2*, *CDH11*, *FNI*, *OPCML*, P-value 0.032) e nella differenziazione cellulare (*TIAMI*, *FNI*, *SEMA3D*, *SLIT1*, *SYNE1*, *OPCML*, P-value 0.049).

Nell'ambito dei tumori T3 abbiamo riscontrato che alcune variazioni genomiche specifiche per tale gruppo sono comuni tra alcuni campioni. In particolare abbiamo rilevato una co-amplificazione delle regioni geniche coinvolgenti i geni *CCND3* e *DLEU2* in due campioni T3 con metastasi ai linfonodi; una co-amplificazione di *TNIK* e *CAI2* in due campioni, uno con metastasi linfonodale ed uno con metastasi polmonare.

6. Considerazioni finali

Il carcinoma tiroideo papillifero è il più comune cancro tiroideo differenziato. Sebbene la maggior parte dei casi esibisca un decorso clinico indolente con un'alto rapporto di casi curati, circa il 10-15% dei PTC sviluppano metastasi distali, invasività, ricorrenza ed in alcuni casi vi è una trasformazione in carcinomi tiroidei anaplastici, non differenziati, con decorso clinico letale.

L'utilizzo della metodica CGH per la rilevazione, in un unico esperimento, degli sbilanciamenti genomici è stata ampiamente utilizzata nello studio delle neoplasie. Peraltro, in nessuno studio il campione patologico è stato comparato al tessuto normale dello stesso soggetto. Effettuare un CGH-array comparando il tessuto normale con il tessuto sano dello stesso soggetto è l'unica procedura per identificare mutazioni somatiche; mutazioni cioè non presenti nel tessuto normale del soggetto in esame, ma unicamente nel tessuto tumorale.

Nel nostro studio, dunque, non sono presenti eventuali aberrazioni germinali che potrebbero predisporre all'insorgenza della neoplasia. Concentrandoci invece sulle mutazioni somatiche, in teoria, il nostro studio dovrebbe dare informazioni su meccanismi di malattia non ereditabili.

Il CGH-array è stato utilizzato in altri studi per identificare aberrazioni presenti nei tumori tiroidei. In tutti questi studi il DNA di riferimento utilizzato non è stato mai il DNA germinale del soggetto in esame. Questa è la differenza più importante tra lo studio presente ed i precedenti.

Segue una breve analisi di alcuni studi aCGH effettuati sui tumori tiroidei.

Rodriguez ed il suo gruppo nel 2004 hanno studiato le alterazioni genetiche che sottostanno alla progressione del FTC verso l'anaplasia. In questo studio sono stati comparati i profili CGH di 20 FTC, 12 carcinomi tiroidei poco differenziati (PDTC) e 7 carcinomi tiroidei anaplastici, al fine di identificare sbilanciamenti cromosomici potenzialmente associati alla progressione neoplastica.

Considerando la trasformazione diretta dei FTC in ATC, sono state considerate significativamente importanti amplificazioni presenti in 3q e 20q e delezioni in 7q e Xp. Considerando i PDTC come entità intermedia indipendente nella trasformazione anaplastica di cancri follicolari, sono state evidenziate importanti alterazioni coinvolte nell'anaplasia: delezioni nel numero di copie di sequenze in 7q e 13q ed amplificazioni

di DNA in 7p e 12q . Questi risultati hanno evidenziato le regioni cromosomiche dove mappano geni coinvolti nella trasformazione tiroidea anaplastica e si è dimostrato che sbilanciamenti del numero di copie geniche sono associati alla pathway di trasformazione diretta dei cancri follicolari in anaplastici. In questo caso l'analisi CGH è stata effettuata su metafasi e con una risoluzione, quindi, di alcune megabasi.

Nel 2007 Finn ottimizza la tecnica CGH-array mediante microdissezione laser (laser capture micordissection) del campione esaminato, in modo da assicurare una percentuale di cellule tumorali da analizzare molto vicina al 100%. In questo studio sono stati analizzati 8 PTC: 5 con morfologia classica, 3 varianti follicolari. Come DNA di controllo è stato utilizzato un pool di DNA di linee cellulari tumorali caratterizzate per la variazione del numero di copie geniche (COLO320 HSR, SJSA-1 e BT-474). Amplificazioni e delezioni sono state riscontrate in tutti i campioni analizzati. Le principali amplificazioni geniche sono state riscontrate nei cromosomi 1, 5, 7, 11,15, 17 e 22 mentre delezioni sono ricorrenti nei cromosomi 4, 18 e 19. L'analisi dei dati sugli 8 PTC ha evidenziato che amplificazioni di *TP73* (1p36.33), *SNRPN* (15q12) e *PDGFB* (22q13.1) vengono riscontrate esclusivamente nei tumori *BRAF* wild type.

Fehér nel 2011, al fine di identificare le alterazioni del numero di copie geniche predittive di potenziale metastatico o di trasformazione aggressiva, effettua uno studio CGH-array su 43 casi di PTC (16 casi non presentano metastasi, 14 casi presentano metastasi linfonodali regionali e 13 casi presentano metastasi distali, ricorrenza estensioni extratiroidee). I campioni di DNA sono stati estratti da tessuto fissato ed incluso in paraffina. Il DNA è stato amplificato mediante PCR prima di dell'ibridazione sull'array. Le variazioni del numero di copie geniche dei campioni analizzati sono state riportate a due campioni di tessuto normale tiroideo (non neoplastici). Vengono identificate delezioni nei loci genici *EIF4EBP3* e *TRAK2*, mentre l'amplificazione delle regioni *TB10* e dell'oncogene Tre-2 rappresentano dei markers per PTC. In altri studi di espressione *TB10* è stato considerato come un marker specifico, ed in questo report per la prima volta si è osservata anche un'amplificazione a livello genico. Sebbene l'amplificazione nelle regione genica *AKAP13* non correli con una buona o cattiva prognosi, questo rappresenta un marker discriminativo per lo sviluppo di metastasi: si trova infatti amplificato nel 42.9% delle metastasi locali e nel 15.4% delle metastasi distali, mentre alcuna amplificazione è stata riscontrata nei casi senza metastasi.

Nel nostro studio sono stati analizzati 17 PTC: 10 meno aggressivi (T1) e 7 più

aggressivi (T3). Tutti i nostri campioni sono wildtype *BRAF* e *RAS*.

I profili genomici ottenuti dai due gruppi sono stati comparati tra loro, al fine di rilevare la presenza di alterazioni genomiche coinvolte nella progressione tumorale.

Il DNA analizzato, estratto da campioni di tessuto tumorale e sano fissati ed inclusi in paraffina, è stato marcato mediante legame chimico, in modo da non manipolare ulteriormente il DNA che, a seguito dei trattamenti precedentemente subiti, risulta essere particolarmente frammentato/degradato. A differenza di altri studi effettuati su campioni di PTC, abbiamo effettuato l'analisi di comparazione genomica tra il campione tumorale ed il tessuto sano dello stesso paziente. Ciò ha permesso di evidenziare solamente le copy number aberration somatiche. In tutti i nostri campioni sono stati rilevati degli sbilanciamenti genomici.

Al fine di identificare alterazioni nel numero di copie geniche coinvolte nella tumorigenesi dei PTC con diversa aggressività e predittive di un potenzialità metastatica o di una trasformazione aggressiva, le aberrazioni presenti nei carcinomi più aggressivi (T3) sono state comparate con quelle identificate nei tumori meno aggressivi (T1).

Tra le aberrazioni somatiche riscontrate nei tumori T3 risultano di particolare rilevanza quelle co-presenti nei campioni analizzati. Le regioni geniche coinvolte in tali aberrazioni comprendono i geni *TNIK*, *CA12*, *DLEU2* e *CCND3*.

La proteina *TNIK* è una serina/treonina chinasi che agisce come attivatore essenziale nella via di segnale Wnt. Gioca un ruolo nei riarrangiamenti del citoscheletro e regola la diffusione/migrazione cellulare. L'attivazione della via di segnale Wnt ha un ruolo nella tumorigenesi tiroidea (Sastre-Perona *et al.*, 2012).

La proteina *CA12* fa parte della famiglia delle zinc-proteins (metalloenzimi) che catalizza l'idratazione reversibile della CO_2 . Partecipa in una varietà di processi biologici quali: respirazione, calcificazione, bilancio acido-base, riassorbimento osseo e nella formazione del liquido cerebrospinale, saliva, acido gastrico. Il numero di copie geniche risulta alterato in cancro tiroideo post-Chernobyl (Stein *et al.*, 2010)

In una regione intronica del gene *DLEU2* è localizzato il cluster dei miRNA (miR)-15a/16-1 coinvolti nel controllo della proliferazione delle cellule B. La funzione di *DLEU2* è sconosciuta. L'espressione di miR-15a risulta disregolata nei PTC con mutazione *BRAFV600E* (Huang *et al.*, 2013).

La proteina *CCND3*, famiglia delle cicline, regolatore di CDK chinasi. Questa ciclina forma un complesso, funzionando come subunità regolatoria, con *CDK4* e *CDK6*, la cui

attività è richiesta per la transizione G1/S del ciclo cellulare. Risulta essere overespressa nei carcinomi tiroidei a cellule Hurthle (Troncone *et al.*, 2009).

Dai dati ottenuti in questo studio riteniamo che l'amplificazione nelle regioni geniche *CCND3*, *TNIK*, *SLIT1* e *CA12* possano essere eventi somatici importanti associati allo sviluppo di neoplasia tiroidea con caratteristiche di maggiore aggressività nei PTC wildtype *BRAF* e *RAS*.

A tal proposito si intende procedere estendendo l'analisi quantitativa di queste regioni genomiche, mediante Real-Time PCR, su una coorte di pazienti con tumore T1 e T3 per confermare tali risultati.

6. Bibliografia

Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. *miR-15a and miR16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives*. Cell Death Differ 2010; 17(2):215-20

Arozarena I, Sanchez-Laorden B, Packer L, Hidalgo-Carcedo C, Hayward R, Viros A, Sahai E, Marais R. *Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A*. Cancer Cell. 2011; 19(1):45-57

Arvan P, Di Jeso B. *Thyroglobulin structure, function, and biosynthesis*. *The thyroid: a Fundamental and Clinical text*, Braverman LE and Utiger R, eds Lippincott-Williams-Wilkins 2005; pp. 77-95.

Bagchi N and Fawcett DM. *Role of sodium ion in the active transport of iodide by cultured thyroid cells*. Biochim Biophys Acta 1973; 318: 235-251.

Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, Iacconi P, Miccoli P, Pacini F. *N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression*. Thyroid 2000; 10:19-23

Bizhanova A, Kopp P. *Minireview: The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid*. Endocrinol 2009; 150(3): 1084-1090

Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B. *A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example*. Cancer 1997;7 9:2414–2423.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. *Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance*. Cell. 1999; 96:795–80

Brown RL, de Souza JA, Cohen EEW. *Thyroid Cancer: burden of illness and management of disease*. J Cancer 2011; 2: 193-199.

Carlomagno F, Santoro M. *A roadmap for targeted therapies*. Nat Rev Endocrinol 2011; 7: 65-67.

Carmona FJ, Villanueva A, Vidal A, Muñoz C, Puertas S, Penin RM, Gomà M, Lujambio A, Piulats JM, Mesía R, Sánchez-Céspedes M, Manós M, Condom E, Eccles SA, Esteller M. *Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis*. J Pathol. 2012; 228(2):230-40.

Choy KW, Setlur SR, Lee C, Lau TK. *The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing*. An International Journal of Obstetrics and Gynaecology 2010; 4: 391-398

Cui Y, Ying Y, van Hasselt A, Ng KM, Yu J, Zhang Q, et al. *OPCML is a broad tumour suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequent epigenetic inactivation*. PLoS one. 2008;3:e2990, 2–11.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature 2002; 417:949-954

da Silveira Mitteldorf CA, de Sousa-Canavez JM, Leite KR, Massumoto C, Camara-Lopes LH. *FNI, GALE, MET and QPCT overexpression in papillary thyroid carcinoma: molecular analysis using frozen tissue and routine fine-needle aspiration biopsy samples*. Diagn Cytopathol. 2011; 39(8):556-61.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. *Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family*. J Biol Chem 2000; 30:23227-33.

Delange F. *The disorders induced by iodine deficiency*. Thyroid 1994; 4: 107-128.

De la Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. *Molecular analysis of the Sodium/Iodide Symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology*. *Physiol Rev* 2000; 80:1083-1105.

Delys L, Detours V, Franc B, Thomas G, Bogdanova T, Tronko M, Libert F, Dumont JE, Maenhaut C. *Gene expression and the biological phenotype of the papillary thyroid carcinomas* *Oncogene* 2007; 26:7894-7903

Dennis Jr G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. *DAVID: Database for Genomic Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. *Genome Biol* 2003; 4:P3

Di Prampero PE and Arsenio Veicsteinas. *Fisiologia dell'uomo*. edi-ermes 2002; pp. 429-435.

Dhir M, Yachida S, Van Neste L, Glöckner SC, Jeschke J, Pappou EP, Montgomery EA, Herman JG, Baylin SB, Iacobuzio-Donahue C, Ahuja N. *Sessile serrated adenomas and classical adenomas: an epigenetic perspective on premalignant neoplastic lesions of the gastrointestinal tract*. *Int J Cancer*. 2011;129(8):1889-98

Dohàn O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. *The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance*. *Endocr Rev* 2003; 24: 48-77.

Downward J. *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:11-22

Du W, Wang S, Zhou Q, Li X, Chu J, Chang Z, Tao Q, Ng EK, Fang J, Sung JJ, Yu J. *ADAMTS9 is a functional tumor suppressor through inhibiting AKT/mTOR pathway and associated with poor survival in gastric cancer*. *Oncogene* 2012;doi: 10.1038/onc.2012.359

Duarte-Pereira S, Paiva F, Costa VL, Ramalho-Carvalho J, Sawa-Bordalo J, Rodrigues

A, et al. *Prognostic value of Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like promoter methylation in bladder carcinoma*. European Journal of Cancer. 2011;47:1106–14

Eizaguirre GR and Santisteban P. *A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications*. Eur J Endocrinol 2006; 155: 495-512.

Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. *Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia*. Clin Endocrinol 1999; 50, 529-535

Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EW, Carrasco N. *Thyroid Na⁺/I⁻ symporter: mechanism, stoichiometry, and specificity*. J Biol Chem 1997; 272: 27230-27238.

Fehér LZ, Pocsay G, Krenács L, Zvara A, Bagdi E, Pocsay R, Lukács G, Gyory F, Gazdag A, Tarkó E, Puskás LG. *Amplification of Thymosin Beta 10 and AKAP13 Genes in Metastatic and Aggressive Papillary Thyroid Carcinomas*. Pathol. Oncol. Res.2011 DOI 10.1007/s12253-011-9467-7

Finn S, Smyth P, O'Regan E, Cahill S, Toner M, Timon C, Flavin R, O'Leary J, Sheils O. *Low-level genomic instability is a feature of papillary thyroid carcinoma: an array comparative genomic hybridization study of laser capture microdissected papillary thyroid carcinoma tumors and clonal cell lines*. Arch Pathol Lab Med. 2007; 1:65-73.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. *Copy number variation: New insights in genome diversity*. Genome Research (2006); 16 (8): 949-961

Fryknäs M, Wickenberg-Bolin U, Göransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee JJ, Landegren U, Höög A, Larsson C, Grimelius L, Wallin G, Pettersson U, Isaksson A. *Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors*. Tumour Biol. 2006; 27(4):211-20.

Greene FL (ed) 2002 AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed. Springer-Verlag, New York
Griesmann G, Ripka S, Pralle M, Ellenrieden V, Baumgart S, Buchholz M, Pilarsky C, Aust D, Michl P. *WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer*. Neoplasia 2013;15(1):11-22

Guyton R, Hall JE, Textbook of Medical Physiology, Saunders, 2000

Haase D, Meister M, Muley T, Hess J, Teurich S, Schnabel P, Hartenstein B, Angel P. *FRMD3, a novel putative tumor suppressor in NSCLC*. Oncogene 2007;26(30):4464-8

Hagens O, Dubos A, Abidi F, Barbi G, Van Zutven L, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, van Bokhoven H, Gecz J, Dollfus H, Ropers HH, Schwartz CE, de Cassia Stocco Dos Santos R, Kalscheuer V, Hanauer A. 2005. *Disruptions of the novel KIAA1202 gene are associated with X-linked mental retardation*. Hum Genet 118(5):578–590.

Hesse E, Musholt PB, Potter E, et al: *Oncofoetal fibronectin—a tumour-specific marker in detecting minimal residual disease in differentiated thyroid carcinoma*. Br J Cancer 2005; 93:565-570.

Hosack DA, Dennis Jr G, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. *Identifying biological themes within lists of genes with EASE*. Genome Biol 2003; 4:R70.1-R70.8

Hsueh C, Lin JD, Yang CF, Chang YS, Chao TC, Sun JH, Wu IC, Tseng NM, Ueng SH. *Prognostic significance of Tiam1 expression in papillary thyroid carcinoma*. Virchows Arch 2011; 459(6):587-593

Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, Livolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. *Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(26):15044-9

Huang Y, Liao D, Pan L, Ye R, Li X, Wang S, Ye C, Chen L. *Expressions of miRNAs in*

papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAFV600E mutation. Eur J Endocrinol 2013; published online 15 February

Huang YH, Lin YH, Chi HC, Liao CH, Liao CJ, Wu SM, Chen CY, Tseng YH, Tsai CY, Lin SY, Hung YT, Wang CJ, Lin CD, Lin KH. *Thyroid hormone regulation of mR-21 enhances migration and invasion of hepatoma. Cancer Res* 2013 [Epub ahead of print]

Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Wloch J, Czarniecka A, Chmielik E, Lange D, Pawlaczek A, Szpak S, Gubala E, Swierniak A. *Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. Cancer Res.* 2005; 65(4):1587-97

Kallionemi A, Kallionemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. *Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. Science* (1992); 258 (5083): 818-21

Khan A, Smellie J, Nutting C, Harrington K, Newbold K. *Familial nonmedullary thyroid cancer: a review of the genetics. Thyroid.* 2010; 7:795-801.

Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J et al. *Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. Am J Pathol* 2000a; 156(2): 577-84

Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J et al. *Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumors. Histochem Cell Biol* 2000b; 114(3): 197-204

Kondo E, Harashima A, Takabatake T, Takahashi H, Matsuo Y, Yoshino T, Orita K, Akagi T. *NF-Atc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor. Eur J Immunol.* 2003; 33(1):1-11

Koo Bh, Coe DM, Dixon LJ, Somerville RP, Nelson CM, Wang LW, Young ME,

Lindner DJ, Apte SS. *ADAMTS9 is a cell autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells*. Am J Pathol. 2010; 176(3):1494-504

Kopp P. *Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism*. In: The Thyroid: Fundamental and Clinical Text, 9th, Braverman LE, Utiger RD. (Eds) Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia 2005, p.52

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science 2001; 294:853-858

Latil A, Chene L, Cochant-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O. *Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors*. Int J Cancer. 2003; 103:306–315.

Lee JJ, Au AYM, Foukakis T, Barbaro M, Kiss N, Clifton-Bligh R, Staaf J, Borg A, Delbridge L, Robinson BG, Wallin G, Hoog A, Larsson C. *Array-CGH identifies cyclin D1 and UBCH10 amplicons in anaplastic thyroid carcinoma*. Endocrine-Rel Cancer 2008; 15:801-815

Li L, Ying J, Li H, Zhang Y, Shu X, Fan Y, Tan J, Cao Y, Tsao SW, Srivastava G, Chan AT, Tao Q. *The human cadherin 11 is a pro-apoptotic tumor suppressor modulating cell stemness through Wnt/B-catenin signaling and silencing in common carcinomas*. Oncogene. 2012; 31(34):3901-12.

Liu W, Asa SL, Ezzat S: *1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 targets PTEN-dependent fibronectin expression to restore thyroid cancer cell adhesiveness*. Mol Endocrinol 2005; 19:2349-235.

Livak K.J., Schmittgen T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method*, 2001, Methods, 25, 402-408.

Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. *Pathological tumor-node-metastasis*

(pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:3553–3562.

Ma X, Cai Y, He D, Zou C, Zhang P, Lo CY, Xu Z, Chan FL, Yu S, Chen Y, Zhu R, Lei J, Jin J, Yao X. *Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cell. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(40):16282-7.*

Mahmoudi T, Li VS, Ng SS, Taouatas N, Vries RG, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H. *The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. EMBO J. 2009; 28(21):3329-40.*

Marchetti D, Murry B, Galjour J, Wilke-Greiter A. *Human melanoma TrkC: its association with a purine-analog-sensitive kinase activity. J Cell Biochem 2003; 88(5):865-72*

Marlow R, Strickland P, Lee JS, Wu X, Pebenito M, Binnewies M, Le EK, Moran A, Macias H, Cardiff RD, Sukumar S, Hinck L. *SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. Cancer Res. 2008; 68(19):7819-27.*

Marmé A, Zimmermann HP, Moldenhauer G, Schorpp-Kistner M, Müller C, Keberlein O, Giersch A, Kretschmer J, Seib B, Spiess E, Hunziker A, Merchán F, Möller P, Hahn U, Kurek R, Marmé F, Bastert G, Wallwiener D, Ponstingl H. *Loss of Drop1 expression already at early tumor stages in a wide range of human carcinomas. Int J Cancer. 2008;123(9):2048-56.*

Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, Makuuchi M, Aburatani H. *Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. Oncogene. 2006; 25:5581–5590.*

Midorikawa Y, Makuuchi M, Tang W, Aburatani H. *Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. World J Gastroenterol. 2007; 13:1487–1492.*

Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, Guccione E, Qu X, Chien M, Murty VV et al. *Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood 2001; 97:2098-2014

Miura D, Wada N, Chin K, Magrane GG, Wong M, Duh QY, Clark OH. *Anaplastic thyroid cancer: cytogenetic patterns by comparative genomic hybridization*. Thyroid. 2003; 3:283-90

Molinaro M, Rizzoli C, Siracusa G, Stefanini M. Istologia di V. Monesi. IV ed. Piccin 1992; 489-490

Moscato EE, Kim Hj, Vagefi MR, Sikiss RZ. *Follicular Thyroid Carcinoma with Insular Component Metastatic to the Sphenoid Wing*. J Clin Ophtalmol 2012; 3:251

Nagataki S and Yokohyama N. *Other factors regulating thyroid function. Autoregulation: effects of iodide*. *The Thyroid: a Fundamental and Clinical Text*, Braverman LE and Uttinger RD eds, Lippincott-Raven 1996; pp. 241-247.

Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. *Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers*. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:4393-4397

Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, Kaufmann AM, Schneider A, Dürst M, Mansukhani M, Pothuri B, Murty VV. *Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression*. Mol Cancer. 2006; 5:16

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. *BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or*

poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:5399-5404

Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. *Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics.* Clinical Genetics (2004), Vol. 66 (6): 488-495

Passler C, Schenba C, Prager G, Kaczirek K, Kaserer K, Zettinig G, Niederle B *Prognostic factors of papillary and follicular thyroid cancer: differences in an iodine-replete endemic goiter region.* Endocrine-Related cancer 2004; 11:131-139

Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. *Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors.* Mod Pathol 2005; 18:48-57.

Randazzo PA, Inoue H, Bharti S. *Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton.* Biol Cell. 2007; 99(10):583-600. Review

Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. *Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer.* Trends Biochem Sci 2001; Trends Biochem Sci 2001; 26(8): 490-496.

Rodrigues RF, Roque L, Rosa-Santos J, Cid O and Soares J. *Chromosomal imbalances associated with anaplastic transformation of follicular thyroid carcinomas.* British Journal of Cancer 2004; 90: 492–496.

Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, Pinto A, Dominigues R, Dinis J, Catarino A, Pereira T, Leite V. *Comparative genomic hybridization, BRAf, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas.* Oncology Reports 2007; 18:917-926

Sabag AD, Bode J, Fink D, Kigel B, Kugler W, Neufeld G. *Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in*

the cortex of the brain. PLoS One. 2012; 7(8):e42912.

Sastre-Perona A, Santisteban P. *Role of the wnt pathway in thyroid cancer.* Front Endocrinol (Lausanne). 2012; 3:31.

Scott GS, Jakeman LB, Stokes BT, Szabo C. *Peroxynitrite production and activation of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthetase in spinal cord injury.* Ann Neurol 1999; 45: 120-4

Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA, Li L, Miller EP, et al. *OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer.* Nat Genet. 2003; 34:337–43.

Sing B, Linn D, Cigudosa JC, Ghossein R, Shaha AR, Poluri A, Wreesmann VB, Tuttle M, Shah JP, Rao PH. *Screening for genetic aberrations in papillary thyroid cancer by using comparative genomic hybridization.* Surgery 2000; 128(6):888-894

Speetjens FM, Lauwen MM, Franken KL, Janssen-van Rhijn CM, van Duikeren S, Bres SA, van de Velde CJ, Melief CJ, Kuppen PJ, van der Burg SH, Morreau H, Offringa R. *Prediction of the immunogenic potential of frameshift-mutated antigens in microsatellite instable cancer.* Int J Cancer. 2008; 123(4):838-45.

Stein L, Rothschild J, Luce J, Cowell JK, Thomas G, et al. *Copy number and gene expression alterations in radiation-induced papillary thyroid carcinoma from chernobyl pediatric patients.* Thyroid. 2010; 20:475–87

Sweetser DA, Peniket AJ, Haaland C, Blomberg AA, Zhang Y, Zaidi ST, Dayyani F, Zhao Z, Heerema NA, Boulwood J, Dewald GW, Paietta E, Slovak ML, Willman CL, Wainscoat JS, Bernstein ID, Daly SB. *Delineation of the minimal commonly deleted segment and identification of candidate tumor-suppression genes in del(9q) acute myeloid leukemia.* Genes Chromosome Cancers 2005; 44(3):279-91

Taugog AM. *Thyroid hormone synthesis. The Thyroid: a Fundamental and Clinical Text*, Braverman LE and Uttinger RD eds, Lippincott-Raven 2000; pp 75-79.

Troncone G, Volante M, Iaccarino A, Zeppa P, Cozzolino I, Malapelle U, Palmieri EA, Conzo G, Papotti M, Palombini L. *Cyclin D1 and D3 overexpression predicts malignant behavior in thyroid fine-needle aspirates suspicious for Hurthle cell neoplasms*. *Cancer*. 2009; 117(6):522-9.

Tureci O, Sahun U, Vollmar E, Siemer S, Gottert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M, Sly WS. *Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95 (13): 7608-7613.

Unger K, Malisch E, Thomas G, Braselmann H, Walch A, Jackl G, Lewis P, Lengfelder E, Bogdanova T, Wienberg J, Zitzelsberger H. *Array CGH demonstrates characteristic aberration signatures in human papillary thyroid carcinomas governed by RET/PTC*. *Oncogene* 2008; 27:4592-4602

Valli R, Marletta C, Pressato B, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E. *Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as low as 8% abnormal cells*. *Molecular Cytogenetics* (2011), Vol. 4: 13

Vassart G, Dumont JE. *The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth*. *Endocr Rev* 1992; 13: 596-611.

Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, Qian KX, Duan S, Chen Z, Rao Y, Geng JG. *Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity*. *Cancer Cell*. 2003; 4:19–29.

Weiss SJ, Philip NJ, Grollman EF. *Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid*. *Endocrinology* 1984a 114: 1090-1098.

Weiss SJ, Philip NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. *Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3'-5'-monophosphate and dependent on protein synthesis*. *Endocrinology* 1984b; 114: 1099-1107.

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. *TNM residual tumor classification revisited*. *Cancer* 2002; 94:2511–2516.

Wreesman VB, Ghossein RA, Patel SG, Harris CP, Schnaser EA, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B. *Genome-Wide appraisal of thyroid cancer progression*. *Am J Pathol*. 2002; 161(5):1559-1556

Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. *Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit*. *Nature*. 1999;400:331–336.

Xing M. *BRAF mutation in thyroid cancer*. *Endocr. Relat. Cancer* 2005; 12:245-262

Yoon HY, Miura K, Cuthbert EJ, Davis KK, Ahvazi B, Casanova JE, Randazzo PA *ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP*. *J Cell Sci*. 2006; 119: 4650-66

Zhu B, Vemavarapu L, Thompson WJ, Strada SJ. *Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells*. *J Cell Biochem*. 2005; 94(2):336-50

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fisher AH, Nikiforov YE. *Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations*. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:71-77

6. 1 Siti Web

www.airc.it

http://fitweb.uchc.edu/student/selectives/Luzietti/Thyroid_malignant.htm

<http://host.uniroma3.it>

<http://www.pathologyatlas.com>

www.thyroidmanager.org

<http://upload.wikimedia.org>

7. Appendice

Elenco dei lavori pubblicati durante il corso di dottorato di ricerca

7.1 Pubblicazioni inerenti l'argomento della tesi

Puppin C, **Passon N**, Franzoni A, Russo D, Damante G. *Histone deacetylase inhibitors control the transcription and alternative splicing of prohibitin in thyroid tumor cells*. *Oncol Rep*. 2011; 25(2):393-7.

Puppin C, **Passon N**, Frasca F, Vigneri R, Tomay F, Tomaciello S, Damante G. *In thyroid cancer cell lines expression of periostin gene is controlled by p73 and is not related to epigenetic marks of active transcription* *Cellular Oncology* 2011; 34(2):131-40

Puppin C, **Passon N**, Lavarone E, Di Loreto C, Frasca F, Vella V, Vigneri R, Damante G. *Levels of histone acetylation in thyroid tumors* *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 411(4):679-83

Pianta A, Puppin C, **Passon N**, Franzoni A, Romanello M, Tell G, Di Loreto C, Bullotta S, Russo D, Damante G. *Nucleophosmin delocalization in thyroid tumour cells* *Endocr Pathol*. 2011;21(1):18-23.

Puppin C, **Passon N**, Hershman JM, Filetti S, Bulotta S, Celano M, Russo D, and Damante G. *Cooperative effects of SAHA and VPA on NIS gene expression and proliferation of thyroid cancer cells* *J Mol Endocrinol* 2012; 48: 217-227

Passon N, Puppin C, Lavarone E, Bregant E, Franzoni A, Hershman JM, Fenton MS, D'Agostino M, Durante C, Russo D, Filetti S, Damante G. *Cyclic AMP-response element modulator inhibits the promoter activity of the sodium iodide symporter gene in thyroid cancer cells* *Thyroid*. 2012; 22(5):487-93.

Lavarone E, Puppini C, **Passon N**, Filetti S, Russo D, Damante G. *The PARP inhibitor PJ34 modifies proliferation, NIS expression and epigenetic marks in thyroid cancer cell lines*. Mol Cell Endocrinol. 2013; 365(1):1-10.

7.2 Altre pubblicazioni

Passon N, Dubsky de Wittenau G, Jurman I, Radovic S, Bregant E, Molinis C, Damante G, Lonigro IR. *Quick MLPA test for quantification of SMN1 and SMN2 copy numbers*. Mol Cell Probes. 2010; 24(5):310-4.

Franzoni A, **Passon N**, Fabbro D, Tiribelli M, Damiani D, Damante G. *Histone post-translational modifications associated to BAALC expression in leukemic cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 417(2):721-5

Passon N, Gerometta A, Puppini C, Lavarone E, Puglisi F, Tell G, Di Loreto C, Damante G. *Expression of Dicer and Drosha in Triple Negative Breast Cancer*. Journal of Clinical Pathology. 2012; 65(4): 320-6

Zampieri S, Cattarossi S, Oller Ramirez AM, Rosano C, Lourenco CM, **Passon N**, Moroni I, Uziel G, Pettinari A, Stanzial F, de Kremer RD, Azar NB, Hazan F, Filocamo M, Bembi B, Dardis A. *Sequence and copy number analyses of HEXB gene in patients affected by Sandhoff disease: functional characterization of 9 novel sequence variants* PLoS One. 2012;7(7):e41516.

D'Elia AV, Grimaldi F, Pizzolitto S, De Maglio G, Bregant E, **Passon N**, Franzoni A, Verrienti A, Tamburrano G, Durante C, Filetti S, Fogolari F, Russo D, Damante G. *A new germline VHL gene mutation in three patients with apparently sporadic pheochromocytoma*. Clin Endocrinol (Oxf). 2012. doi: 10.1111/cen.12032.