



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA  
IN  
SCIENZE BIOMEDICHE

**Indirizzo Biotecnologie Endocrinologiche Molecolari e  
Rigenerative**

CICLO XXVI

COORDINATORE Chiar.mo Prof. Persio Dello Sbarba

Sviluppo e validazione di metodiche per l'analisi molecolare  
nella diagnostica dei noduli tiroidei

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

**Candidata**

Dott.ssa Irene Mancini

**Tutore**

Chiar.mo Prof. Mario Pazzagli

**Coordinatore**

Chiar.mo Prof. Persio Dello Sbarba

---

Anni 2011/2013

Non recidere, forbice, quel volto,  
solo nella memoria che si sfolla,  
non far del grande suo viso in ascolto  
la mia nebbia di sempre.

da *Le Occasioni* (1939)  
Eugenio Montale

*Al mio Professor Claudio Orlando,  
per tutto il tempo insieme che mi ha donato.*

# INDICE

## I. INTRODUZIONE (1)

### 1 IL CARCINOMA TIROIDEO (1)

- 1.1 CARCINOMA DIFFERENZIATO DELLA TIROIDE (4)
  - 1.1.1 Carcinoma Papillare Tiroideo (5)
  - 1.1.2 Carcinoma Follicolare Tiroideo (6)
- 1.2 CARCINOMA INDIFFERENZIATO DELLA TIROIDE (7)
- 1.3 CARCINOMA MIDOLLARE DELLA TIROIDE (8)

### 2 DIAGNOSI DEI NODULI TIROIDEI (9)

### 3 FNAB ( Fine-Needle Aspiration Biopsy) (14)

- 3.1 CLASSIFICAZIONE DEI RISULTATI CITOLOGICI (15)
- 3.2 LIMITI DELLA FNAB (19)

### 4 GENETICA DEI CARCINOMI TIROIDEI (20)

- 4.1 Il gene di fusione *RET/PTC* (23)
- 4.2 Mutazioni somatiche del gene *BRAF* (27)
- 4.3 Mutazioni somatiche nei geni della famiglia *RAS* (30)
- 4.4 Il gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$*  (32)
- 4.5 Altre alterazioni genetiche associate a neoplasie tiroidee (35)
- 4.6 Ruolo della biologia molecolare nella diagnostica dei noduli tiroidei (38)

### 5 RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA RICERCA DI NUOVI TARGET TERAPEUTICI (41)

- 5.1 Inibitori delle vie di segnalazione oncogeniche nel carcinoma tiroideo (42)

## II. SCOPO DELLA TESI (45)

## III. MATERIALI E METODI (48)

### 1 CAMPIONI CITOLOGICI DI AGOASPIRATO TIROIDEO (48)

- 1.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA PURIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI (49)
- 1.2 ESTRAZIONE DEL DNA (49)
- 1.3 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE (49)

### 2 CONTROLLI POSITIVI E NEGATIVI PER L'ANALISI MOLECOLARE (50)

- 2.1 ESTRAZIONE DI DNA E RNA DEI CAMPIONI DI CONTROLLO (51)
- 2.2 VALUTAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DEGLI ACIDI NUCLEICI (51)

### **3 RICERCA DI MUTAZIONI PUNTIFORMI (51)**

- 3.1 PROTOCOLLO DI PCR (51)
- 3.2 ANALISI DI PRE-SCREENING: HRMA (High Resolution Melting Analysis) (53)
- 5.3 SEQUENZIAMENTO (55)

### **4 RICERCA DI RIARRANGIAMENTI GENOMICI (56)**

- 4.1 PROTOCOLLO DI RETROTRASCRIZIONE (56)
- 4.2 REAL-TIME PCR (56)

### **4 ANALISI STATISTICA (58)**

## **IV. RISULTATI (59)**

### **1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ANALISI MOLECOLARE PER LA RICERCA DELLE VARIANTI GENETICHE COINVOLTE NEL CARCINOMA TIROIDEO (59)**

- 1.1 SCELTA DELLE LINEE CELLULARI (59)
- 1.2 ALLESTIMENTO E OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI PCR (60)
- 1.3 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' DELL' HRMA (61)
- 1.4 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ANALISI MOLECOLARE MEDIANTE HRMA E SEQUENZIAMENTO DIRETTO PER LO STUDIO DELLE MUTAZIONI PUNTIFORMI (62)
- 1.5 ALLESTIMENTO DELL'ANALISI MOLECOLARE PER LO STUDIO DEI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI (65)

### **2 STUDIO DI VALIDAZIONE: CONFRONTO TRA L'ANALISI MOLECOLARE SUL MATERIALE DA AGOASPIRATO E DA LAVAGGIO (66)**

- 2.1 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE DEL GENE *GAPDH* SUL CAMPIONE DI RNA (67)
- 2.2 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: ESPRESSIONE DEL GENE DELLA *TIREOGLOBULINA* SUL CAMPIONE DI RNA (69)

2.3 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DEL DNA E AMPLIFICAZIONE DEL GENE *BRAF* (73)

2.4 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE DELLA SOVRAPPONIBILITÀ DEI RISULTATI DELL'INDAGINE GENETICA TRA CAMPIONI DI AGOASPIRATO E LAVAGGI (75)

### **3 STUDIO DI VALIDAZIONE: RISULTATI DELL'ANALISI MOLECOLARE (76)**

3.1 RISULTATI DELL'ANALISI DELLE MUTAZIONI PUNTIFORMI NELLO STUDIO DI VALIDAZIONE (76)

3.2 RISULTATI DELL'ANALISI DEI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI NELLO STUDIO DI VALIDAZIONE (80)

### **4 STUDIO DI VALIDAZIONE: CONFRONTO PRELIMINARE TRA ANALISI CITOLOGICA E ANALISI MOLECOLARE 81**

### **5 CONFRONTO TRA DATO CITOLOGICO E RISULTATO DELL'ANALISI MOLECOLARE (84)**

### **6 CONFRONTO TRA DATO ISTOLOGICO E RISULTATO DELL'ANALISI MOLECOLARE (92)**

## **V. CONCLUSIONI (104)**

## **VI. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI (109)**

**Allegati (115)**

**Pubblicazioni (118)**

**Ringraziamenti (119)**

# I. INTRODUZIONE

## 1 IL CARCINOMA TIROIDEO

Il cancro della tiroide è la neoplasia maligna più comune del sistema endocrino. Più del 95% dei carcinomi tiroidei prende origine dalle cellule follicolari della tiroide, mentre soltanto una minoranza (~ 3%) prende origine dalle cellule C-parafollicolari, determinando la formazione dei carcinomi midollari della tiroide.

I carcinomi derivanti dall'epitelio follicolare comprendono un eterogeneo gruppo di neoplasie con caratteristiche cliniche e istopatologiche diverse.

L'incidenza di queste forme di neoplasia, aumentata significativamente nell'ultima decade, è diversa in base alla categoria di popolazione considerata (suddivisa per età, sesso, familiarità, fattori ambientali) ma si stima essere di circa 1.5 casi ogni 100.000 abitanti per gli uomini e 4.7 nuovi casi ogni 100.000 abitanti per le donne nel mondo [1]. Ha quindi un'incidenza più elevata nelle donne con un rapporto maschio:femmina di 1:3.

La categoria dei tumori tiroidei racchiude vari sottotipi istologici con epidemiologia, modalità di trattamento e prognosi distinte.

Possiamo suddividere i carcinomi tiroidei in:

### CARCINOMI DI ORIGINE EPITELIALE

- Carcinoma Papillare della Tiroide (PTC) e Carcinoma Follicolare della Tiroide (FTC) che insieme costituiscono le forme Differenziate di Carcinoma Tiroideo (DTC, rappresentano circa l'85-90% di tutti i carcinomi tiroidei e, spesso, hanno una evoluzione clinica asintomatica ed una eccellente prognosi. Nonostante la maggior parte dei PTC e degli FTC venga clinicamente gestita bene (con una sopravvivenza a 5 anni superiore al 90%), una percentuale di tali tumori si comporta in modo aggressivo.
- Carcinoma Poco Differenziato (PDTC)
- Carcinoma Tiroideo Indifferenziato (UTC), o anaplastico sin dall'esordio si presenta sempre come una forma altamente aggressiva con una prognosi infausta. La sopravvivenza a 5 anni dalla sua diagnosi è inferiore al 10%.

- Carcinoma Midollare Tiroideo (MTC)

### CARCINOMI DI ORIGINE NON-EPITELIALE

- Linfomi, Sarcomi e altre neoplasie maligne rare

La tiroide è composta istologicamente da due tipi cellulari parenchimali: le cellule follicolari che concentrano lo iodio per la produzione degli ormoni tiroidei e che possono dar origine a tumori differenziati o anaplastici; le cellule parafollicolari o cellule C che producono la calcitonina e che, in caso di trasformazione neoplastica, determinano lo sviluppo di carcinomi midollari della tiroide.

Le cellule stromali e immunitarie della tiroide possono dar origine invece a sarcomi e linfomi rispettivamente **[2]**.

La maggioranza dei tumori tiroidei si presenta sottoforma di noduli isolati all'interno della ghiandola ma solo il 5-10% di questi sono di natura maligna **[3]**. Dei nuovi casi di noduli tiroidei maligni che vengono diagnosticati ogni anno il 90% appartiene alla categoria dei carcinomi differenziati, il 5-9% sono carcinomi midollari, soltanto l'1-2% sono carcinomi anaplastici mentre l'1-3% costituiscono forme di linfoma, sarcoma e altri tumori rari **[2]**.

Il nodulo tiroideo, rilevato con palpazione o con tecniche di imaging, è la principale manifestazione clinica intorno alla quale si sviluppa l'iter diagnostico.

La diagnosi di un nodulo tiroideo è un percorso lungo e complesso che permette di comprendere la natura dell'iperplasia affinché il medico possa individuare la scelta terapeutica più adeguata. Rientrano nell'iter diagnostico esami anamnestici, ecografici e citologici che permettono di distinguere un nodulo benigno, che può essere gestito in modo conservativo, da un nodulo maligno che dovrà essere invece rimosso chirurgicamente mediante tiroidectomia.

La strategia terapeutica si basa inoltre su metodi di scoring clinico-patologico per la valutazione del livello di rischio (AMES, AGES, DAMES, MACIS) **[2]**.

La prognosi dei tumori della tiroide è globalmente favorevole. Essa è strettamente correlata a tre variabili:

- Età del paziente. Vi è un progressivo aumento della mortalità con l'età.

- Tipo istologico. La prognosi risulta migliore nel caso di carcinomi differenziati della tiroide dato il basso tasso di crescita e la ridotta invasività. Le forme indifferenziate e i carcinomi midollari hanno, invece, una prognosi più sfavorevole per la notevole aggressività e invasività che rispecchia le caratteristiche istologiche. Fortunatamente questi sottotipi tumorali hanno un'incidenza molto bassa.
- Estensione della malattia al momento della diagnosi. Una massa tumorale di notevoli dimensioni e la presenza di malattia localmente avanzata o di metastasi a distanza si associano ad un incremento della mortalità.

Le localizzazioni a distanza rappresentano la principale causa di morte correlata al carcinoma della tiroide ma, a differenza delle metastasi di altri tipi di tumore, sono compatibili con una sopravvivenza a lungo termine in gran parte dei pazienti [2]. I parametri TNM usati per i tumori differenziati della tiroide sono descritti in Figura 1.

Definizione		
T1	Diametro tumorale $\leq 2$ 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	
Stadi		
	<i>Età pazienti &lt;45 anni</i>	<i>Età pazienti <math>\geq 45</math> 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
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, N qualunque, M0
Stadio IV C		T qualunque, N qualunque, M1

**Figura 1. Sistema di classificazione TNM per il carcinoma differenziato della tiroide.** Da Linee Guida dell'American Thyroid Association sulla Gestione dei Pazienti con Noduli Tiroidei e Carcinoma Differenziato della Tiroide.



### 1.1 CARCINOMA DIFFERENZIATO DELLA TIROIDE

I carcinomi differenziati della tiroide (DTC) originano a livello delle cellule follicolari della tiroide e rappresentano la neoplasia maligna più frequente (>90%) a carico di tale ghiandola.

Nella categoria dei carcinomi differenziati rientrano 3 sottotipi istologici:

- Carcinoma papillare (80-85%)
- Carcinoma follicolare (10-15%)
- Carcinoma a cellule di Hürtle (3-5%) che ha tuttavia uno sviluppo e una prognosi molto simili a quello del carcinoma follicolare.

L'esposizione alle radiazioni ionizzanti di testa e collo è il principale fattore di rischio conosciuto che aumenta con certezza l'incidenza di questo tipo di neoplasia, soprattutto del PTC [2].

Tale esposizione può avvenire anche tramite l'interazione con radiazioni ionizzanti usate in campo medico a scopi terapeutici e diagnostici. Sono rilevanti nella patogenesi dei carcinomi tiroidei anche l'impiego di radioisotopi iodati (I131) che si concentrano nella tiroide in seguito a somministrazione a scopo diagnostico o terapeutico. Il rischio di sviluppare questa neoplasia va relazionato alla dose di radiazioni a cui il paziente è stato esposto e alla sua età al momento dell'esposizione. Studi clinici dimostrano che il rischio aumenta più la dose è stata alta e più il paziente era giovane al momento dell'esposizione [2].

Lo sviluppo di carcinomi tiroidei differenziati può essere associato a una dieta povera o troppo ricca di iodio, consumo di ormoni steroidei, fattori genetici predisponenti (ad esempio la poliposi familiare del colon o la malattia di Cowden aumentano il rischio di sviluppare cancro della tiroide), fattori ormonali nella donna (aumento del rischio in gravidanza), preesistente malattia benigna della tiroide (gozzo, nodulo), obesità [2;4].

Generalmente i carcinomi tiroidei ben differenziati hanno un tasso di sopravvivenza relativamente alto: la sopravvivenza a 10 anni dei pazienti con carcinoma papillare oscilla tra l'80 e il 95% contro il 70-95% dei pazienti con carcinoma follicolare [5;6].

Il DTC è prevalentemente sporadico ma sono state descritte anche delle forme familiari [5]. Nei carcinomi differenziati la terapia consiste generalmente nella tiroidectomia parziale o totale a seconda dell'estensione della massa tumorale

seguita dal trattamento con radioiodio per la completa ablazione del tessuto tiroideo restante.

### 1.1.1 Carcinoma Papillare Tiroideo

Il carcinoma papillare rappresenta l'80-85% dei tumori maligni epiteliali della tiroide nei paesi con apporto di iodio sufficiente e si riscontra maggiormente in pazienti tra i 30 e i 40 anni [5].

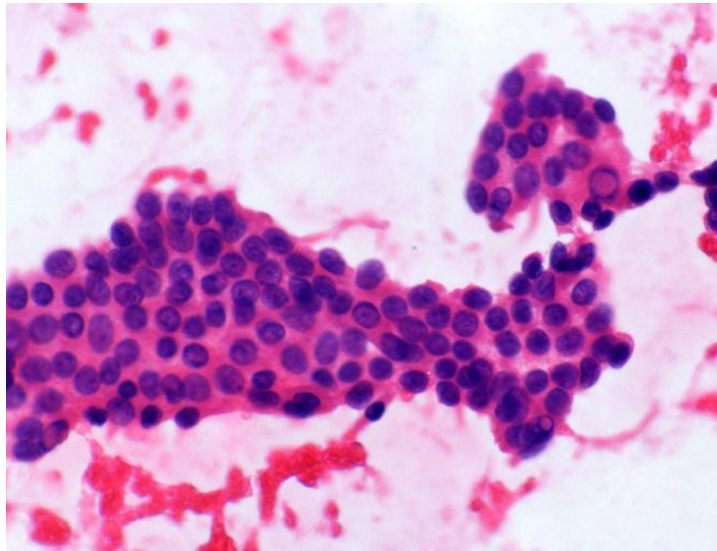
È un tumore solido che si manifesta generalmente a livello intratiroidale e può mostrare un parziale incapsulamento o bordi infiltrati in modo diffuso. La superficie di taglio è biancastra, qualche volta mostra calcificazioni, lacune cistiche, aree emorragiche e/o necrotiche.

Istologicamente questo carcinoma è caratterizzato dalla presenza di papille, costituite da cellule epiteliali disposte intorno ad uno stelo fibrovascolare. Alcune varianti del papillare non contengono queste strutture e presentano un pattern totalmente follicolare e per questo sono denominate varianti follicolari. Nel tessuto tumorale inoltre non sono infrequenti zone di agglomerati a struttura follicolare e accumuli linfocitari.

Citologicamente questa neoplasia presenta caratteristiche del nucleo distintive: il nucleo della cellula tumorale è allargato e ovoidale con membrana nucleare irregolare; è chiaro "a vetro smerigliato" talora con corpi di inclusione e profonde incisure nucleari. La presenza di corpi psammomatosi caratterizza la diagnosi di carcinoma papillare. Il nucleolo è singolo, spesso piccolo e localizzato alla periferia nucleare.

Il PTC può essere multifocale e possiede la tendenza a metastatizzare preferibilmente a livello dei linfonodi regionali. Le metastasi linfonodali sono gli unici elementi visibili di tale patologia nel caso di un tumore primario della dimensione di pochi millimetri [2].

Da un punto di vista molecolare la traslocazione che coinvolge l'oncogene *RET* e mutazioni puntiformi a carico del gene *BRAF* e dei geni *RAS* sono le alterazioni individuate in più del 70% dei carcinomi papillari tiroidei e la loro comparsa rappresenta un aspetto peculiare della patogenesi della malattia [7]. Generalmente la prognosi di questa neoplasia è ottima ma esistono comunque varianti più aggressive che fortunatamente si presentano soltanto in una minoranza dei casi. Ne sono esempio la variante a cellule alte, la variante a cellule chiare e la variante sclerosante diffusa che colpisce più frequentemente i pazienti giovani. Queste varianti ad alto rischio presentano una mortalità significativa a 5 anni, tra il 25 e il 90% [2].



**Figura 2. Carcinoma papillare tiroideo**

### **1.1.2 Carcinoma Follicolare Tiroideo**

Il carcinoma follicolare è un tumore raro, rappresenta il 10-20% delle neoplasie maligne tiroidee. È più comune nei paesi con un apporto insufficiente di iodio e si manifesta generalmente in pazienti tra i 50 e i 60 anni [5].

Un tessuto tumorale che presenta un pattern del 50% e più di tipo follicolare non deve essere per forza identificato come carcinoma follicolare; esiste anche la variante follicolare dal carcinoma papillare che presenta identiche caratteristiche biologiche, storia naturale e prognosi.

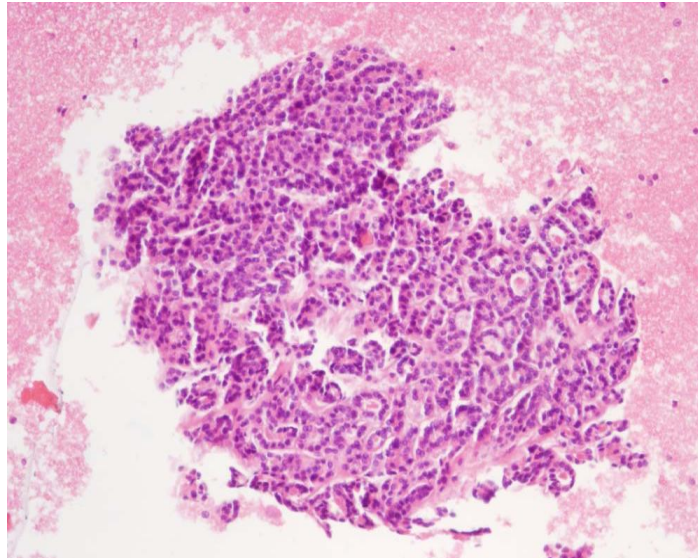
Il carcinoma follicolare è unifocale, può essere incapsulato e mostrare invasione vascolare, capsulare o del parenchima tiroideo adiacente. I carcinomi definiti incapsulati generalmente presentano solo invasione capsulare o vascolare (minimamente invasivi) mentre i non incapsulati rappresentano la forma maggiormente invasiva [2].

Queste neoplasie hanno la tendenza ad invadere principalmente i vasi venosi piuttosto che il sistema linfatico: le metastasi linfonodali, a differenza di quanto avviene nel carcinoma papillare, sono quindi rare [2].

Tale tumore presenta tre possibili pattern strutturali (follicoli ben differenziati, trabecolare o solido) che possono presentarsi singolarmente o in combinazione nel tessuto neoplastico.

Studi di biologia molecolare hanno dimostrato che l'80% degli FTC presenta alterazioni caratteristiche come mutazioni puntiformi a carico dei geni *RAS* e la formazione del gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$* , eventi mutuamente esclusivi del processo carcinogenico strettamente connessi alla trasformazione in senso neoplastico della cellula follicolare [7].

La prognosi per il carcinoma follicolare è favorevole con una sopravvivenza del 70-95% a 10 anni di follow-up [5].



**Figura 3. Carcinoma follicolare tiroideo**

### **1.2 CARCINOMA INDIFFERENZIATO DELLA TIROIDE**

Il carcinoma indifferenziato della tiroide (UTC) è uno dei tumori umani più aggressivi e difficili da trattare. In contrasto con l'ottima prognosi dei carcinomi tiroidei differenziati, l'UTC presenta una sopravvivenza di 4/5 mesi dal momento della diagnosi ed è quindi associato ad un'alta mortalità.

La sua incidenza è diminuita nell'ultimo decennio e questo andamento può essere ricondotto alla profilassi iodica; ad oggi rappresenta infatti solo l'1-2% dei casi di carcinoma della tiroide [2].

L'età dei pazienti al momento della diagnosi di UTC è tra i 63 e i 74 anni.

Le manifestazioni cliniche e l'evoluzione di questo carcinoma riflettono la biologia della neoplasia caratterizzata da cellule indifferenziate e alti tassi di crescita e invasività. Il carcinoma anaplastico può svilupparsi *de novo* o da un carcinoma differenziato preesistente.

I pazienti presentano noduli palpabili che aumentano di dimensioni durante il periodo di osservazione e l'invasione di trachea, laringe ed esofago che si manifestano con raucedine e disfagia. Al momento della diagnosi il 25-50% dei pazienti presentano spesso metastasi a livello polmonare. La morte è quindi generalmente conseguente o ad ostruzione delle vie respiratorie per invasione locale o a insufficienza respiratoria per le metastasi polmonari a distanza [2].

Il trattamento di questa neoplasia coinvolge tiroidectomia con eventuale asportazione di tessuti localmente invasivi, chemioterapia con doxorubicina e radioterapia. Il tasso di sopravvivenza risulta comunque estremamente basso [2].

### 1.3 CARCINOMA MIDOLLARE DELLA TIROIDE

Il carcinoma tiroideo midollare è una neoplasia maligna delle cellule parafollicolari della tiroide e rappresenta il 5-9% di tutti i tumori tiroidei. È una neoplasia solida che determina metastasi linfonodali che favoriscono la diffusione a livello di fegato, polmoni e ossa. Può essere anche localmente aggressivo ed invadere le strutture vicine: trachea, vene giugulari, muscoli e nervi cervicali [8].

Essendo le cellule parafollicolari deputate alla produzione di calcitonina, i pazienti affetti da MTC presentano alti livelli sierici di questo ormone che è quindi un marcatore molto specifico nell'ambito di questa neoplasia.

L'MTC non sembra essere associato alla pregressa esposizione a radiazioni ionizzanti che non determinano quindi un fattore di rischio per lo sviluppo di questa neoplasia.

Le cellule tumorali presentano un nucleo che ricorda quello dei tumori neuroendocrini, sferico e con cromatina finemente dispersa. Le cellule neoplastiche possono inoltre produrre peptidi non tiroidei come ACTH, serotonina e melanina sviluppando sindromi secondarie che rendono complessa la diagnosi [2].

Il carcinoma midollare si presenta in forma sporadica nel 60-70% dei pazienti e nei restanti in forma familiare come carcinoma midollare familiare (FMTC) oppure associato a specifiche sindromi ereditarie. Le sindromi familiari nelle quali si può ritrovare sono la MEN IIA e la MEN IIB che sono neoplasie endocrine multiple. Gli MTC associati alla MEN IIB sono generalmente più aggressivi di quelli associati alla MEN IIA e dell'FMTC [8].

Da più di 10 anni è stato identificato il gene responsabile delle forme familiari di MTC: il gene *RET* localizzato sul cromosoma 10. L'analisi molecolare ha identificato nei pazienti con MTC mutazioni puntiformi a carico di *RET* che modificano la funzionalità recettoriale della proteina codificata dal gene. Individuare pazienti con tale alterazione permette quindi di porre diagnosi ed effettuare un trattamento terapeutico precocemente e in maniera più efficiente [8].

Alcuni studi riportano una prognosi più favorevole per le forme familiari rispetto a quelle sporadiche. Questo sembrerebbe dipendere non tanto dalle

caratteristiche biologiche della neoplasia ma dalla tempestività della diagnosi che si realizza nel caso della forma familiare [5].

Per l'MTC l'unico trattamento definitivo è la chirurgia essendo radioterapia e chemioterapia generalmente inefficaci [2].

## 2 DIAGNOSI DEI NODULI TIROIDEI

Il nodulo tiroideo è una manifestazione clinica molto frequente e la sua incidenza varia tra il 4 e il 76% in base al metodo di screening usato e alla tipologia di popolazione valutata [4].

La frequenza nella popolazione varia dipendentemente dalla fascia d'età considerata, dal sesso, dall'apporto di sodio nella dieta e dall'eventuale esposizione a radiazioni ionizzanti [2]. Con l'avanzare dell'età c'è una tendenza all'aumento della nodularità e del volume tiroideo: uno studio epidemiologico afferma che il 90% delle donne sopra i 70 anni e il 60% degli uomini sopra gli 80 anni ha un gozzo nodulare mentre i soggetti tra i 30 e i 59 anni che presentano noduli tiroidei evidenti non superano il 6% [9].

Generalmente nel sesso femminile esiste una tendenza superiore a sviluppare noduli più rispetto agli uomini [2].

L'incidenza dipendentemente dal metodo di screening utilizzato oscilla tra un 4% di noduli individuati alla palpazione e un 67% di noduli diagnosticati grazie all'indagine agli ultrasuoni ad alta risoluzione [4].

E' del tutto evidente che, accanto a fattori eziologici oggettivamente non trascurabili, quali il peggioramento del sistema ambientale (maggior esposizione a radiazioni, inquinamento, stato nutrizionale...), l'aumentato riscontro di noduli e, conseguentemente, di tumori tiroidei debba essere attribuito in parte alle nuove procedure diagnostiche per immagine (US, FDG-PET, TAC, RMN). Il nodulo della tiroide è infatti la forma in cui si manifesta clinicamente un carcinoma ma solo una bassa percentuale di essi (5-10%) risulta essere realmente una neoplasia maligna [10;11].

Più frequentemente questa lesione di dimostra manifestazione o sede di patologie benigne quali gozzo multinodulare, tiroidite acute e cronica, cisti benigne, adenoma follicolare [12]. Sarà quindi compito dell'endocrinologo seguire l'iter diagnostico più appropriato per accertare l'eventuale benignità o malignità di un nodulo.

Quando il nodulo viene palpato o se ne sospetta la presenza su basi cliniche l'approccio più indicato consiste nell'utilizzo della UltraSonografia (US).

La US ad alta risoluzione è il metodo di indagine disponibile maggiormente sensibile per la individuazione e prima caratterizzazione di noduli tiroidei, consente di misurarne le dimensioni e identificarne la struttura e l'aspetto. Offre immagini ottimali a costi molto contenuti senza la necessità di iniettare mezzo di contrasto iodato (come nella scintigrafia) o di sottoporre il paziente a radiazioni ionizzanti. Ci si avvale di apparecchiature ad elevata risoluzione che possono svelare noduli del diametro di pochi mm, usando segnali acustici con frequenza elevata che penetrano nei tessuti ad una profondità sufficiente per l'esplorazione della ghiandola tiroidea [3]. Se il nodulo non è palpabile la tecnica ne permette l'identificazione, se invece è già palpabile l'indagine avrà lo scopo di approfondirne le caratteristiche o eventualmente localizzare altri noduli: il 20-48% dei pazienti con un nodulo palpabile svelano la presenza di noduli ulteriori alla US [12].

Generalmente i noduli di natura maligna sono di consistenza dura e all'ecografia appaiono solidi (non cistici) e ipoecogeni. Inoltre possono presentare margini irregolari infiltrati e microcalcificazioni.

Per quanto riguarda le dimensioni, solo i noduli sopra il cm sono generalmente considerati a rischio; quelli sotto tale diametro devono essere approfonditi solo in pazienti con storia di irradiazione o con casi di tumore tiroideo in famiglia [13].

L'ecocolordoppler associato alla US permette di stabilire l'entità della vascolarizzazione nel contesto della tiroide e dei noduli [Figura 4]; generalmente il nodulo di natura maligna presenta una vascolarizzazione intranodulare con vasi spessi e irregolari. US e colordoppler possono quindi aiutare a predire l'eventuale rischio di malignità.



**Figura 4. Ecocolordoppler di noduli tiroidei.**

A questi esami strumentali deve aggiungersi un esame obiettivo ed anamnestico che approfondisca la storia clinica del paziente che può dare un valido aiuto nella diagnosi differenziale di un nodulo. Vari sono i fattori che aumentano il rischio di malignità:

- Pregressa esposizione a radiazioni a livello di testa e collo (aumenta il rischio di PTC)
- Il sesso maschile; pur essendo il sesso femminile più soggetto a tale patologia, a parità di condizioni sospette un nodulo ha più probabilità di essere di natura maligna nel maschio.
- Età < 14 anni o > 70 anni
- La nodularità singola
- La presenza di noduli durante l'infanzia
- Raucedine, dispnea e disfagia che riflettono invasione locale del nervo laringeo, trachea ed esofago rispettivamente.
- Condizioni di familiarità per malattie a base prevalentemente genetica (carcinoma midollare, sindromi MEN)
- Alto tasso di crescita del nodulo (aumenta il rischio di anaplastico)

### **[12;13]**

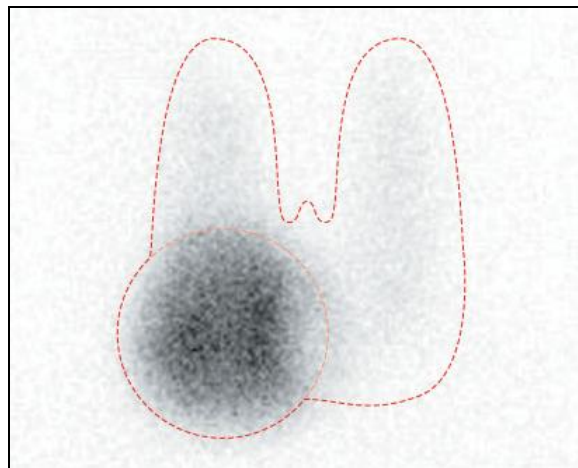
Un altro esame di approfondimento che permette di valutare la funzionalità tiroidea è la scintigrafia tiroidea **[Figura 5]**.

Questa metodica consiste nel somministrare al paziente per via endovenosa un radiofarmaco con tecnezio 99 o iodio 123 che vengono elettivamente captati dalle cellule tiroidee poiché si comportano in maniera analoga allo iodio fisiologico. La scintigrafia permette la valutazione della sede, delle dimensioni e della morfologia della tiroide oltre all'entità della captazione del radiofarmaco nelle alterazioni funzionali della ghiandola.

Questa metodica può, quindi, essere applicata allo studio della patologia dei noduli tiroidei per la valutazione delle caratteristiche funzionali degli stessi.

Sulla base dell'uptake del radionuclide i noduli possono essere classificati in iperfunzionanti o caldi, normofunzionanti e ipofunzionanti o freddi. La maggioranza dei noduli tiroidei indipendentemente dalla malignità sono freddi se confrontati col tessuto tiroideo normale. Generalmente i noduli freddi o normofunzionanti, al contrario di quelli caldi che sono funzionalmente autonomi, hanno una maggiore probabilità di essere maligni; tale probabilità oscilla tra l'8 e il 25% **[14]**. In conclusione la scintigrafia aiuta a determinare noduli a funzionalità autonoma che generalmente risultano benigni in un'altissima percentuale di casi.



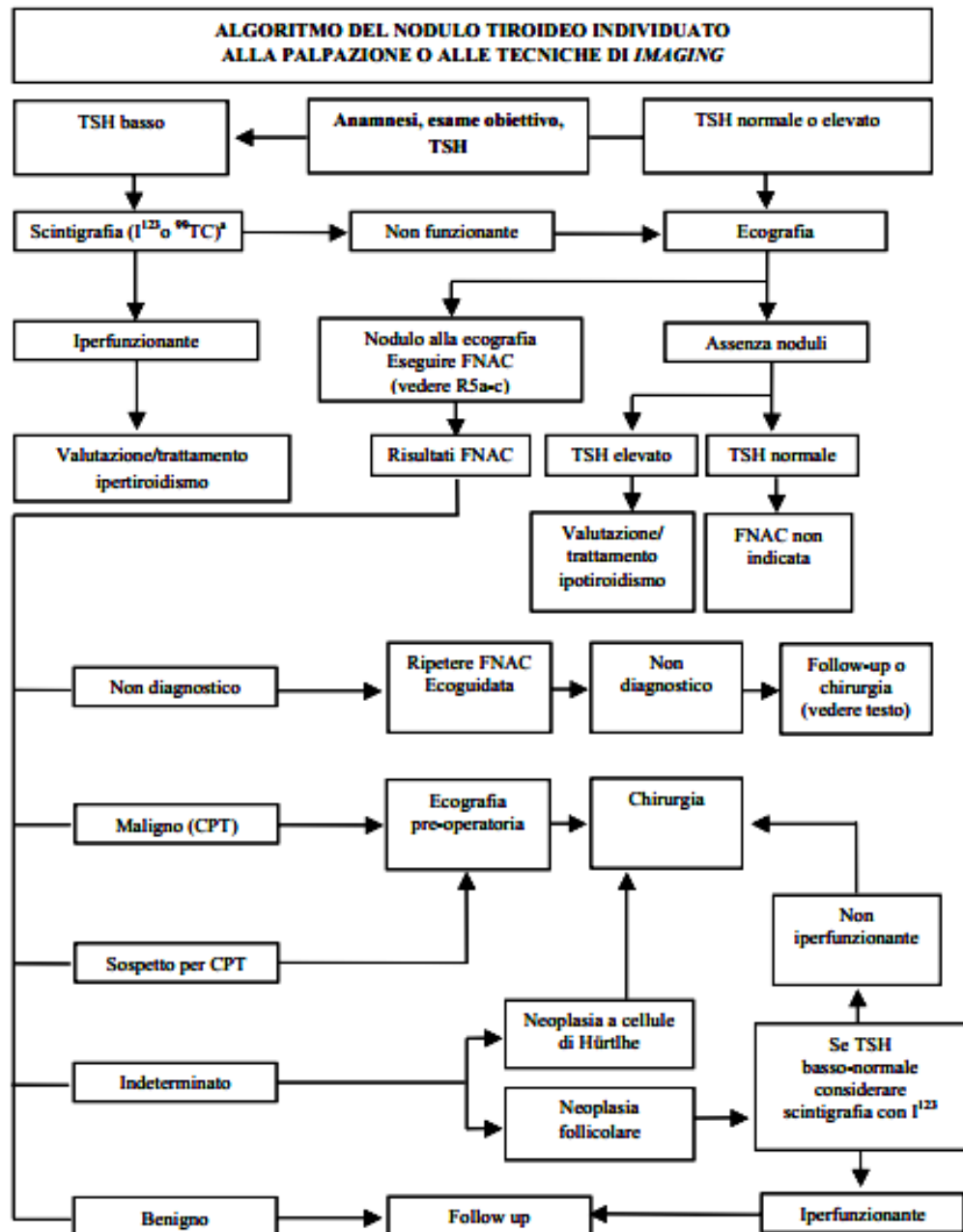


**Figura 5. Scintigrafia di un nodulo tiroideo "hot" localizzato nel lobo destro della ghiandola [15].**

Esami di laboratorio che possono aiutare la diagnosi differenziale sono i dosaggi sierici di TSH e degli ormoni tiroidei liberi (FT3,FT4) che informano sulla funzionalità tiroidea. Un alto livello di ormoni tiroidei nel siero (ipertiroidismo) e un basso dosaggio del TSH suggerisce che il nodulo è autonomo ed il rischio di malignità è notevolmente basso. Al contrario il rischio aumenta in associazione ad alti livelli di TSH sierico.

Il dosaggio degli autoanticorpi anti tireoglobulina e anti tireoperossidasi (AbTg e AbTPO) aiuta invece l'identificazione di tiroidite autoimmune e quello della calcitonina (CT) circolante è espressione del carcinoma midollare della tiroide [12]. Tuttavia non sempre i dosaggi tiroidei risultano essere alterati o specifici e quindi sono spesso non utili per la diagnosi differenziale.

Il percorso diagnostico che, in seguito al riscontro o al sospetto di patologia nodulare della tiroide, deve essere seguito dai clinici per una diagnosi corretta e affidabile può essere facilmente schematizzato tramite l'algoritmo raccomandato dalle principali associazioni di specialisti e riassunto nel seguente diagramma di flusso [Figura 6].



**Figura 6. Diagramma di flusso che riassume l’algoritmo diagnostico raccomandato nella gestione dei noduli tiroidei [12].** Da Linee Guida dell’American Thyroid Association sulla Gestione dei Pazienti con Noduli Tiroidei e Carcinoma Differenziato della Tiroide.

Generalmente le prime indagini che devono sempre essere effettuate di fronte ad un nodulo palpabile o sospetto sono il dosaggio del TSH e l’ultrasonografia. Il primo permette di determinare un’ eventuale autonomia funzionale del nodulo che sarà poi confermato con la scintigrafia; la seconda approfondisce la localizzazione, gli aspetti morfologici e le dimensioni del nodulo.

Le lesioni tiroidee che si dimostreranno sospette sulla base di questi test preliminari saranno indirizzate verso l’analisi citologica dell’agoaspirato tiroideo (FNAB).

### 3 FNAB ( Fine-Needle Aspiration Biopsy)

Il test determinante nella clinica dei noduli tiroidei è l'analisi citologica del materiale agoaspirato con ago sottile (fine-needle aspiration biopsy). L'impatto che questa tecnica ha avuto sulla pratica clinica si è manifestato con un incremento delle lesioni maligne diagnosticate, una diminuzione del numero totale di interventi chirurgici effettuati di circa il 50% e dei costi della gestione dei pazienti con noduli del 25% [15] e con un evidente aumento dell'accuratezza diagnostica.

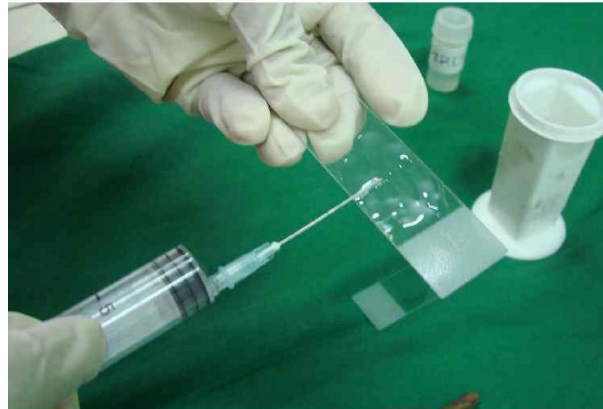
L'esame citologico dell'agoaspirato è attualmente il metodo di indagine più adeguato per la diagnosi differenziale tra noduli maligni e benigni dando informazioni citomorfologiche dirette e notevolmente affidabili.

Data la sua elevata affidabilità e i costi contenuti è la tecnica di screenig preoperatorio maggiormente utilizzata in ambito clinico per selezionare i soggetti a più alto rischio da indirizzare verso la chirurgia distinguendoli da coloro che possono essere gestiti conservativamente.

Le linee guida stilate da AACE (American Association of Clinical Endocrinologist) e ATA (American Thyroid Association) raccomandano di effettuare sempre l'esame citologico su noduli con caratteristiche morfologiche e funzionali fortemente sospette alla scintigrafia e alla US essendo l'unico esame di approfondimento che permette di diagnosticare una lesione tiroidea in modo definitivo [12;13;16].

La tecnica consiste nell'inserire nella massa nodulare un ago sottile e cavo capace di aspirare una certa quantità di cellule che vengono trasferite su un vetrino, trattate e osservate al microscopio per determinarne gli aspetti citologici [Figura 7]. La tecnica è sicura e praticamente priva di complicazioni. Se il patologo è in grado di porre diagnosi certa sulla sola base citologica si può evitare di sottoporre il paziente a lobectomia tramite intervento chirurgico per l'indagine istologica. In caso di multinodularità la FNA è supportata dall'ultrasonografia e dalla scintigrafia per selezionare i noduli da agoaspirare. I candidati ottimali sono i noduli ipo o normofunzionanti e con caratteristiche ultrasonografiche sospette [13].

Generalmente l'aspirazione viene effettuata nel punto in cui il nodulo viene palpato ma offre spesso biopsie inadeguate o falsamente negative. Per aumentare l'accuratezza della tecnica e ridurre il tasso di citologie insoddisfacenti si procede quindi alla agoaspirazione guidata da sonda ultrasonografica.



**Figura 7. Trasferimento del materiale tiroideo agoaspirato sul vetrino per l'indagine citologica.**

### 3.1 CLASSIFICAZIONE DEI RISULTATI CITOLOGICI

Varie classificazioni dei risultati citologici sono state proposte sulla base dell'esperienza di diverse associazioni professionali e non c'è ancora accordo a riguardo. Tali associazioni hanno cercato di definire utilizzo, terminologia e criteri diagnostici della citologia dell'agoaspirato col tentativo di standardizzare il più possibile la tecnica in esame.

Sono stati proposti diversi sistemi di suddivisione per la classificazione dei risultati citologici. In figura 8 sono riportati a confronto il sistema proposto dal National Cancer Institute, la British Association\_Royal College of Physicians e Società Italiana di Patologia e Citopatologia.

**Thyroid Classification Schemes**

National Cancer Institute	British Association–Royal College of Physicians	Italian Society of Pathology and Cytopathology–Italian Section of the International Academy of Pathology
Nondiagnostic	Thy1	Nondiagnostic
Benign	Thy2	Tir1 Nondiagnostic
Atypia/follicular lesion of undetermined significance	Thy3	Tir2 Negative for malignant cells
Follicular neoplasm or suspicious for follicular neoplasm		Tir3 Indeterminate (follicular proliferation)
Suspicious for malignancy	Thy4	Tir4 Suspicious for malignancy
Malignant	Thy5	Tir5 Malignancy

**Figura 8. Sistemi di classificazione dei campioni citologici tiroidei.**

Da Crippa S et al. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens. Am J Clin Pathol. 2010 Aug;134(2):343-4; author reply 345.

La classificazione fino ad oggi utilizzata per la casistica utilizzata nel presente studio consiste nella suddivisione dei risultati citologici in 5 categorie (intervalli delle frequenze generalmente riportate in letteratura per categoria):

- **Tir1** NON DIAGNOSTICO (10-15%)
- **Tir2** BENIGNO (60-80%)

- **Tir3** LESIONI FOLLICOLARI DI SIGNIFICATO INDETERMINATO (10-20%)
- **Tir4** SOSPETTO (2.5-10%)
- **Tir5** MALIGNO (3.5-10%)

**Tir1.** I campioni citologici sono definiti non diagnostici se il materiale agoaspirato è inadeguato o insufficiente [12]. Alle biopsie appartenenti a questa categoria, pur essendo state processate ed esaminate, non può corrispondere uno specifico responso diagnostico a causa di limitata cellularità, mancata presenza di cellule follicolari o scarsa fissazione e conservazione del materiale citologico [17].

Un campione inadeguato può inoltre essere dovuto a lesioni sclerotiche o calcificate oppure alla presenza di ampie aree cistiche degenerate o necrotiche [16].

Nel caso in cui il campione risulti non diagnostico si raccomanda la ripetizione dell'agoaspirato con l'aiuto della ultrasonografia, operazione che generalmente determina l'ottenimento di una biopsia adeguata nel 60% dei casi [13]. Nel caso di noduli che portano a citologie inadeguate ripetutamente la biopsia con ago "core"(CNB) può offrire informazioni addizionali alla biopsia con ago "sottile". È stato dimostrato che la CNB è più efficace nell'ottenere materiale adeguato da noduli difficili da aspirare e che permette di apprezzare al meglio alterazioni nucleari e strutturali delle cellule follicolari. Nonostante tutti questi vantaggi, la biopsia con ago "core" non è utilizzata come procedura sostitutiva della FNAB per l'elevato rischio di complicazioni e la difficoltà di attuazione della tecnica. Deve quindi essere utilizzata come strumento complementare e non sostitutivo alla FNA per la diagnosi dei noduli tiroidei [18].

**Tir2.** Nella categoria più frequentemente riscontrata delle citologie benigne rientrano noduli follicolari di natura benigna o gozzi multinodulari, noduli con infiltrato linfocitario associati a tiroidite di Hashimoto, noduli colloidali, iperplastici o adenomatosi [12]. A questo responso citologico si associa un rischio di malignità estremamente basso tra lo 0 e il 5% [13]. I noduli con questa diagnosi vengono quindi trattati in maniera conservativa e i pazienti vengono generalmente sottoposti a test ultrasonografici e clinici periodici per monitorare eventuali modificazioni morfologiche e dimensionali. Se il nodulo si modifica durante il periodo di follow-up viene consigliata la ripetizione dell'agoaspirato [17].

Studi clinici mostrano che la FNA effettuata con la guida dell'US presenta una percentuale più bassa di falsi-negativi (oltre che inadeguati come già visto)

rispetto alla FNA effettuata sulla base della palpazione; infatti il tasso di falsi negativi della FNA con palpazione è dell'1-3% contro lo 0.6% ad oggi raggiunto con l'implementazione della tecnica [13].

**Tir3.** La categoria delle citologie indeterminate è di gran lunga la più eterogenea e questo si riflette sulla difficoltà di effettuare una diagnosi differenziale nell'ambito delle lesioni follicolari sulla sola base citomorfologica. In questa classe possono, infatti, ricadere sia carcinomi che adenomi follicolare, neoplasie a cellule di Hürtle e la variante follicolare dei carcinomi papillari [12]. Il rischio di malignità è del 20-30%.

Vari sono gli elementi che impediscono di dare una diagnosi più precisa: il campione bioptico può presentare poche cellule atipiche, architettura atipica incerta oppure fattori compromettenti come una limitata cellularità, scarsa fissazione o presenza di sangue oscurante [19]. Tuttavia il motivo principale dell'esistenza di questa categoria è che gli aspetti citologici delle lesioni con pattern follicolare non sono sufficienti a distinguere i campioni maligni dai benigni. Infatti la diagnosi differenziale spesso può essere effettuata sulla base della presenza o meno di invasione capsulare e/o vascolare riscontrabile solo all'esame istologico.

I pazienti con citologia indeterminata vengono talvolta nuovamente sottoposti ad agoaspirazione e se la diagnosi si mantiene indeterminata sono invitati a sottoporsi a lobectomia diagnostica per escludere la eventuale malignità del nodulo. Solo nel 20% dei casi però è diagnosticata la presenza di un carcinoma, evento che determina la necessità di sottoporre il paziente ad un successivo intervento di tiroidectomia totale [20].

In centri con molta esperienza in citologia la classe degli indeterminati può essere suddivisa in due ulteriori categorie che presentano diversi livelli di rischio e per può essere scelto un diverso tipo di management [12]:

- Atipia di significato indeterminato/Lesione follicolare di significato indeterminato (AUS/FLUS); rischio di malignità del 5-15%; si consiglia inizialmente di ripetere FNAB.
- Neoplasia follicolare/ neoplasia follicolare sospetta (FN/SFN); rischio di malignità 15-30%; si consiglia immediatamente una lobectomia a scopo diagnostico [17].

**Tir4.** Le biopsie sospette sono generalmente campioni citologici fortemente suggestivi di malignità ma che non permettono comunque di fare una diagnosi definitiva a causa della presenza di non tutte le caratteristiche tipiche del carcinoma tiroideo [13]. Possono rientrare in questa categoria anche

campioni a bassa cellularità o mal conservati con aspetto chiaramente maligno. Il rischio di malignità è del 50-75% [12].

La categoria è suddivisa in campioni sospetti per varie malignità tiroidee: carcinoma papillare, carcinoma midollare, linfoma, metastasi tiroidee secondarie, carcinoma anaplastico. In caso di biopsie sospette viene effettuata una lobectomia diagnostica mentre il follow-up dipenderà dal risultato dell'istologia [17].

**Tir5.** In caso di citologia maligna PTC, MTC e UTC vengono diagnosticati in modo definitivo dato l'aspetto chiaramente di natura maligna del campione bioptico facilmente riconoscibile. Il rischio di malignità è del 95-100% e quindi la strategia terapeutica consiste nella tiroidectomia totale.

In figura 9 sono riportati i valori raggiunti di accuratezza della FNAB riportati in letteratura.

Feature, %	Mean	Range	Definition
Sensitivity	83	65-98	Likelihood that patient with disease has positive test results
Specificity	92	72-100	Likelihood that patient without disease has negative test results
Positive predictive value	75	50-96	Fraction of patients with positive test results who have disease
False-negative rate	5	1-11	Fine-needle aspiration negative; histology positive for cancer
False-positive rate	5	0-7	Fine-needle aspiration positive; histology negative for cancer

**Figura 9. Valori di sensibilità, specificità e valore predittivo positivo della FNAB riportati in letteratura [12].**

Questi valori derivano da diversi studi di correlazione tra risultati citologici e istologici effettuati in diversi gruppi di studio [16;21;22;23].

Dalla tabella riassuntiva si deduce che l'analisi citologica degli agoaspirati tiroidei è più specifica che sensibile nel diagnosticare un carcinoma tiroideo e che il tasso di falsi negativi e falsi positivi, generalmente dovuto a errori interpretativi, è sufficientemente basso.

L'alta variabilità di sensibilità e specificità è da ricondursi alla classificazione citologica non unitaria e soprattutto al ruolo svolto dai risultati sospetti e indeterminati nell'analisi statistica; diversi gruppi di studio classificano, infatti, in maniera diversa le diverse categorie diagnostiche considerandole in maniera alternativa positive, negative o addirittura, spesso, le escludono dai calcoli statistici [24].

### 3.2 LIMITI DELLA FNAB

L'analisi citologica si è ormai imposta come test di riferimento per la corretta diagnosi dei noduli tiroidei. I vantaggi di questa tecnica sono rappresentati dalla capacità di offrire una diagnosi rapida, sensibile e specifica, la mancanza di disagio per il paziente, la semplicità e i bassi costi di attuazione. Tuttavia, pur essendo il metodo più sensibile e accurato per la diagnosi differenziale delle lesioni tiroidee, l'indagine citologica risulta inconcludente nel 30% delle biopsie. Questa infatti può portare a risultati indeterminati o sospetti oppure essere incapace di offrire una diagnosi per materiale insufficiente e inadeguato [20].

Alcuni noduli hanno una consistenza che impedisce di ricavare un aspirato adeguato oppure essendo di piccole dimensioni non forniscono un numero sufficiente di cellule follicolari per l'analisi citologica. Questi rappresentano le principali limitazioni della metodica, in parte superati grazie all'impiego di sussidi tecnologici come l'ultrasonografia [10].

Resta comunque chiaro che il grado di accuratezza della tecnica è elevato nella diagnosi di forme tumorali dalle caratteristiche citologiche ben distinguibili (PTC, UTC, MTC) ma lo stesso non vale per alcune lesioni a pattern follicolare per le quali è spesso difficile definire l'eventuale malignità sulla base della sola citologia. Per questo la maggior parte delle lesioni follicolari ricadono nella categoria delle forme indeterminate/atipiche per le quali una diagnosi certa viene posta esclusivamente mediante l'istologia [25]. Sono inoltre da considerare, per quanto estremamente bassi, il tasso di campioni che risultano falsamente negativi o positivi in seguito all'esame citologico.

L'efficacia e l'accuratezza diagnostica della tecnica sono infatti estremamente dipendenti non soltanto dal tipo di nodulo ma anche dalla qualità della conservazione del campione bioptico, dalla esperienza di chi effettua l'aspirazione e dalle capacità interpretative del citopatologo [16].

Sicuramente anche i risultati clinici ed ecografici aumentano l'accuratezza diagnostica in pazienti con citologia indeterminata o sospetta [13], tuttavia si sente sempre di più la necessità di nuovi parametri che supportino in modo valido l'esame citologico del materiale agoaspirato.

La ricerca al momento è indirizzata verso lo studio del significato diagnostico di marker molecolari per la diagnosi differenziale dei noduli tiroidei tra i quali ricadono come candidati più promettenti le alterazioni somatiche a livello del DNA, descritte ormai da diversi anni, le quali sono note per il ruolo centrale nella patogenesi del carcinoma tiroideo [20;21].



## 4 GENETICA DEI CARCINOMI TIROIDEI

È ormai noto e pienamente dimostrato che la trasformazione neoplastica di una cellula è da ricondursi all'accumulo di mutazioni somatiche genetiche ed epigenetiche nel tempo.

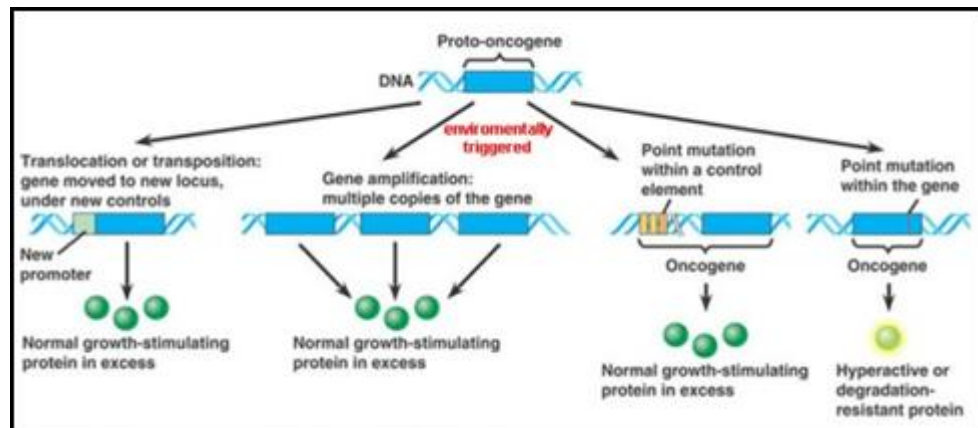
Generalmente nel nostro organismo si crea un equilibrio tra la produzione di nuove cellule e l'eliminazione delle cellule "invecchiate" che viene completamente sovvertito nel tessuto tumorale interessato da una crescita cellulare incontrollata ed eccessiva. Le cellule tumorali acquisiscono una serie di proprietà in un processo multifasico che le rende inizialmente svincolate dai normali meccanismi di controllo del differenziamento e della proliferazione cellulare e che, nelle fasi più avanzate, portano all'invasione di tessuti a distanza determinando la formazione di metastasi.

Le diverse tappe del processo di trasformazione neoplastica sono legate alla comparsa e accumulo di alterazioni a carico di geni implicati nei meccanismi di controllo della crescita, del differenziamento e della morte cellulare.

Le alterazioni coinvolte nella patogenesi del cancro possono essere genetiche se consistono in aberrazioni cromosomiche o mutazioni puntiformi oppure epigenetiche se interessano lo stato di metilazione o altri meccanismi di controllo del processo trascrizionale del DNA.

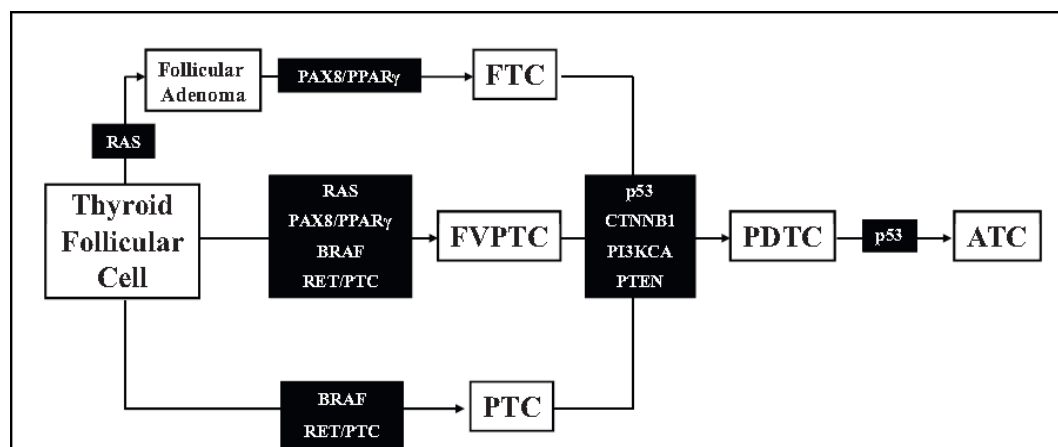
I geni che in seguito a mutazione somatica vengono "attivati" promuovendo così la progressione neoplastica sono detti ONCOGENI **[Figura 10]**, mentre quelli che favoriscono lo sviluppo del cancro se "inattivati" da mutazione sono notoriamente chiamati ONCOSOPPRESSORI.

Mutazioni a carico di oncogeni determinano un guadagno di funzione (*gain of function*) anomala rispetto a quella della proteina normale e agiscono con meccanismo autosomico dominante nel senso che è sufficiente la comparsa di una mutazione in eterozigosi per avere l'effetto trasformante sulla cellula; gli oncosoppressori invece promuovono la cancerogenesi se la loro funzione protettiva normale viene persa (*loss of function*) e agiscono con meccanismo autosomico recessivo ovvero risulta necessaria la perdita di funzione di le copie del gene perché si manifesti la trasformazione fenotipica della cellula **[26]**.



**Figura 10. Possibili meccanismi di formazione di un oncogene.**

La patogenesi del carcinoma tiroideo, come quella di altre neoplasie, si basa quindi sull'accumulo progressivo di alterazioni somatiche a livello di geni coinvolti nel controllo della crescita e del differenziamento cellulare **[Figura 11]**.



**Figura 11. Rappresentazione del modello multi-“hit” coinvolto nella carcinogenesi tiroidea che mostra le principali alterazioni genetiche associate ad ognuno dei sottotipi istologici di carcinoma tiroideo [27].**

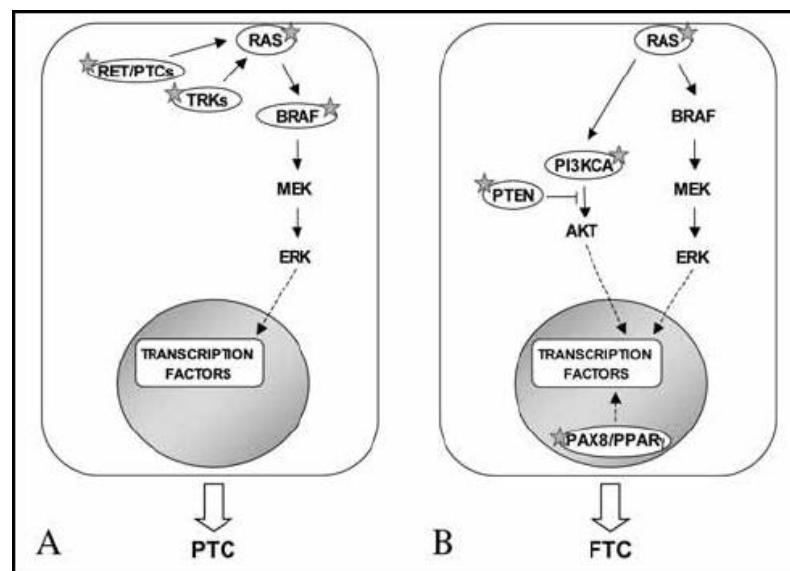
Vari gruppi di ricerca si sono occupati in passato di individuare i geni e le corrispettive alterazioni coinvolte nella trasformazione neoplastica del tessuto tiroideo.

I primi stadi della carcinogenesi tiroidea potrebbero dipendere, infatti, dall'attivazione di protooncogeni. Circa il 75% dei PTC sono portatori di alterazioni genetiche a carico degli oncogeni *BRAF*, *RAS* o *RET* i quali provocano l'attivazione di varie vie di segnalazione tra cui quella delle MAP chinasi **[27]**. Spesso sono state ritrovate in condizioni di mutua esclusività suggerendo che è sufficiente un'alterazione a carico di un singolo elemento

della via per provocare l'attivazione della cascata di segnalazione e guidare supportare il processo della carcinogenesi [28;29].

Circa l'80% degli FTC sono invece portatori di mutazioni dell'oncogene *RAS* o di riarrangiamenti cromosomici che provocano la formazione di geni di fusione, quali *PAX8/PPAR $\gamma$* , [27] eventi mutazionali che raramente si ritrovano contemporaneamente nello stesso clone tumorale [30;31]. Gli FTC originano quindi dall'alterazione di vie di segnalazione differenti che innescano meccanismi patogenetici e determinano aspetti clinici tumorali diversi [25;32].

PTC e FTC, pur avendo un'origine cellulare comune, si sviluppano pertanto attraverso vie oncogeniche diverse [33; Figura12]. All'interno dello stesso sottotipo tumorale esistono inoltre differenze biologiche in base all'alterazione genetica coinvolta e al suo potenziale oncogenico [29].



**Figura 12. Principali vie oncogeniche coinvolte nella patogenesi dei PTC (A) e degli FTC (B) [30].**

Altre mutazioni sono state comunque descritte ma risultano più rare (*TP53*, *CTNNB1*, *PI3KCA*, *PTEN*) [Figura13] e spesso tendono a comparire in stadi più tardivi favorendo la progressione della neoplasia verso forme dedifferenziate o l'acquisizione di un fenotipo più aggressivo e invasivo.

<i>Tumor type</i>	<i>Prevalence (%)</i>
Papillary carcinoma	
<i>BRAF</i>	45
<i>RET/PTC</i>	20
<i>RAS</i>	10
<i>TRK</i>	<5
Follicular carcinoma	
<i>RAS</i>	45
<i>PAX8-PPAR<math>\gamma</math></i>	35
<i>PIK3CA</i>	<10
<i>PTEN</i>	<10
Poorly differentiated carcinoma	
<i>RAS</i>	35
$\beta$ -Catenin ( <i>CTNNB1</i> )	20
<i>TP53</i>	20
<i>BRAF</i>	20
<i>AKT1</i>	15
Anaplastic carcinoma	
<i>TP53</i>	70
$\beta$ -Catenin ( <i>CTNNB1</i> )	60
<i>RAS</i>	50
<i>BRAF</i>	20
<i>PIK3CA</i>	20
<i>PTEN</i>	>10
Medullary carcinoma	
Familial forms <i>RET</i>	>95
Sporadic <i>RET</i>	50

**Figura 13. Prevalenza delle principali alterazioni genetiche nei vari sottotipi di carcinoma tiroideo [32].**

#### 4.1 Il gene di fusione *RET/PTC*

Il proto-oncogene *RET* è un gene di 21 esoni localizzato nella regione pericentromerica del braccio lungo del cromosoma 10 in posizione 10q11.2. Codifica per un recettore di membrana tirosin-chinasico. Il gene è espresso a livello delle cellule neuroendocrine (incluse le cellule C della tiroide e le cellule midollari del surrene), delle cellule neurali (inclusi gangli simpatici e parasimpatici), delle cellule del tratto urogenitale e delle cellule germinali del testicolo.

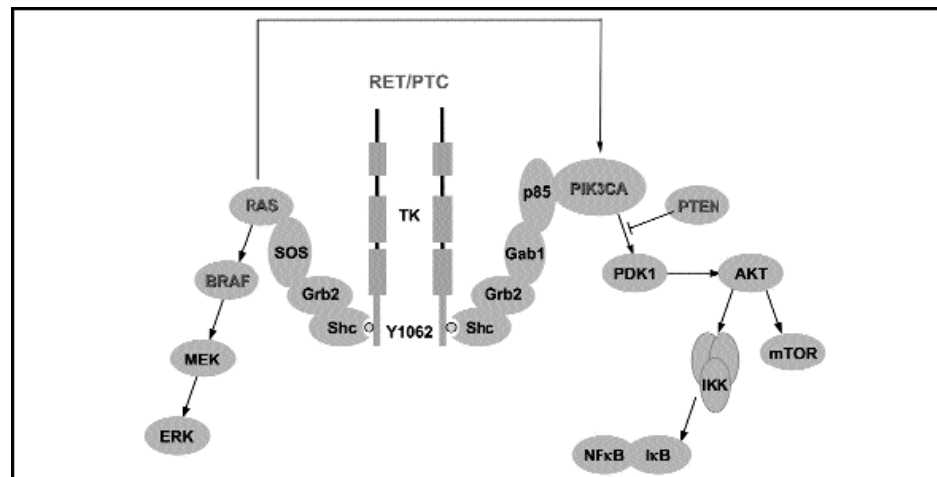
La proteina RET strutturalmente consta di una porzione extracellulare che interagisce col ligando, una transmembrana e una intracellulare che contiene due domini tirosinchinasici (TK1 e TK2) che sono coinvolti nel dialogo con i trasduttori delle vie di segnalazione.

La stimolazione di questo recettore coinvolge la famiglia dei ligandi GDNF (Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor) che per poter svolgere la propria funzione attivatoria devono formare un complesso con il corecettore GFR $\alpha$ . Esistono 4 sottotipi di tale corecettore che esibiscono uno specifico sito di legame per ognuno dei 4 membri della famiglia dei ligandi GDNF (GLF).

Il complesso ligando-GFR $\alpha$  interagendo con la porzione extracellulare del recettore RET ne determina la dimerizzazione e la conseguente autofosforilazione dei residui tirosinici del dominio intracellulare. La

fosforilazione innesca la modificazione conformazionale indispensabile per la trasduzione del segnale.

Tra le varie vie di segnalazione stimulate da RET rientrano la via Ras/ERK (MAPKinase), PI3K/AKT e NFκB [30;34;Figura14].



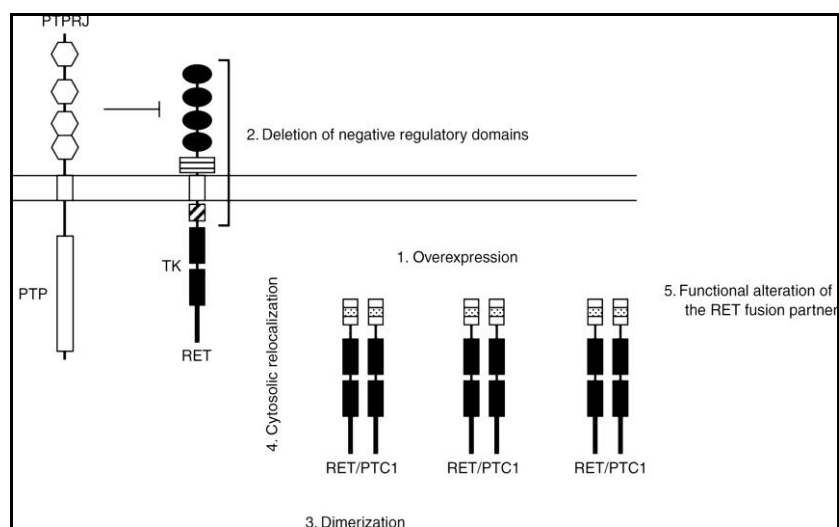
**Figura 14. Le principali vie di segnalazione innescate dal recettore RET (RAS/ERK e PI3K/AKT).**

*RET/PTC* è un oncogene chimerico generato dalla giustapposizione del dominio tirosin chinasi C-terminale del recettore RET alle sequenze N-terminali di specifici geni costitutivamente espressi nelle cellule follicolari. Questo gene di fusione è stata la prima lesione molecolare identificata nel carcinoma papillare della tiroide oltre 20 anni fa [30;34]. Le forme più frequenti di questo oncogene di fusione, entrambe originate da un'inversione del cromosoma 10 [Figura 15], sono *RET/PTC1* e *RET/PTC3* che insieme rappresentano il 90% di tutti i riarrangiamenti coinvolgenti *RET*. I partner di fusione del dominio TK nei riarrangiamenti tipo 1 e 3 sono i geni *H4* e *ELE1* rispettivamente [27].

Oncogene	Donor gene	Chromosome location
RET/PTC1	CCDC6 (coiled-coil domain containing 6)/H4/D10S170	10q21
RET/PTC2	PRKAR1A (protein kinase; cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha)	17q23
RET/PTC3	NCOA4 (Nuclear coactivator 4)/RFG/ELE1/ARA70	10q11.2
RET/PTC4	NCOA4 (Nuclear coactivator 4)/RFG/ELE1/ARA70	10q11.2
RET/PTC5	GOLGA5 (golgin subfamily a, 5)/RFG5/RET-II	14q
RET/PTC6	TRIM24 (tripartite motif-containing 24)/TIF1/TIF1A	7q32-34
RET/PTC7	TRIM33 (tripartite motif-containing 33)/RFG7/TIF1G	1p13
RET/PTC8	KTNI (Kinectin 1)/CG1	14q22.1
RET/PTC9	RFG9	18q21-22
ELKS-RET	ELKS/ RAB6IP2/KIAA1081	12p13.3
PCM1-RET	PCM1 (pericentriolar material 1)	8p21-22
RFP-RET	TRIM27 (tripartite motif-containing 27)/RFP	6p21
HOOK3-RET	HOOK3 (Homo sapiens hook homolog 3)/HK3	8p11.21

**Figura 15. I riarrangiamenti del recettore tirosin-chinasico RET e i rispettivi partner di fusione [30].**

La fusione dei due geni provoca un'espressione inappropriata del dominio TK di *RET* sotto forma di proteina chimerica favorendo la trasformazione neoplastica della cellula tiroidea. La sequenza attivante conferisce all'oncoproteina caratteristiche protumorali quali l'espressione ectopica nei tireociti, la localizzazione citoplasmatica e la dimerizzazione costitutiva risultante in una attività chinasica costitutiva [30; Figura16]. Il riarrangiamento oltre a privare il recettore del dominio regolatorio (dominio extracellulare di interazione col ligando) provoca anche un'alterazione funzionale del partner di fusione di *RET*.



**Figura 16. Conseguenze carcinogeniche del gene di fusione *RET/PTC*.**

*RET*, oltre che nei riarrangiamenti cromosomici, può essere soggetto a mutazioni puntiformi germinali attivanti che sono però causa delle forme ereditarie di carcinoma midollare tiroideo e della sindrome MEN2A/B.

La ricerca del riarrangiamento cromosomico *RET/PTC* in campioni di agoaspirato tiroideo è già stata descritta in letteratura e sembra essere uno strumento utile nella diagnosi preoperatoria di PTC, la forma tumorale tiroidea nella quale il riarrangiamento è maggiormente frequente. La sua frequenza oscilla tra il 15 e il 40% [27] essendo influenzata da vari parametri tra cui l'esposizione a radiazioni, l'età e l'area geografica di appartenenza del paziente [21]. *RET/PTC1* è l'inversione più frequente con una frequenza del 60-70%, seguono *RET/PTC3* con il 20-30% e *RET/PTC2* con meno del 5% [7].

Tuttavia la funzionalità diagnostica di *RET/PTC* presenta dei limiti poiché il riarrangiamento è stato descritto, oltre che nel carcinoma papillare, anche in

lesioni benigne come la tiroidite di Hashimoto e in adenomi tiroidei con una frequenza del 13.3% [21].

Carcinoma tiroidei positivi per questi riarrangiamenti cromosomici si ritrovano generalmente in soggetti giovani, nella forma papillare classica e spesso sono associati ad un'alta probabilità di metastatizzazione a livello linfonodale [30] ma una bassa probabilità di progressione verso la forma poco differenziata [27].

Non solo la presenza ma anche la tipologia di riarrangiamento sembra essere associato a diversi aspetti biologici del PTC: *RET/PTC1* si presenta più frequentemente nei carcinomi papillari classici e con decorso clinico favorevole [35], mentre *RET/PTC3* ha un potenziale mitogeno più alto e si associa a varianti istologiche di PTC più aggressive (solide o a cellule alte) [36].

Molti studi sono concordi nell'affermare che i riarrangiamenti *RET/PTC* si trovano con una frequenza più alta del 50-80% nei carcinomi papillari associati all'esposizione a radiazioni [7;34;37].

Il meccanismo coinvolto nella generazione del riarrangiamento *RET/PTC* non è ancora chiaro ma è stato proposto e parzialmente dimostrato che la vicinanza dei loci genici coinvolti e l'esposizione a radiazioni lo favoriscono. Per esempio è stata rilevata durante l'interfase una vicinanza tra il gene *RET* e *H4* suggerendo che la topologia spaziale del genoma possa essere un fattore favorente la formazione di specifici traslocazioni cromosomiche in seguito a rotture della doppia elica causate dall'esposizione a radiazioni ionizzanti [37;38].

Tuttavia riarrangiamenti *RET/PTC* si ritrovano anche in carcinomi papillari non radio-indotti dove la rottura della doppia elica è da ricondursi principalmente all'induzione di siti fragili nel DNA da parte di specifici fattori di stress molecolare (alcol, tabacco, ipossia) [39].

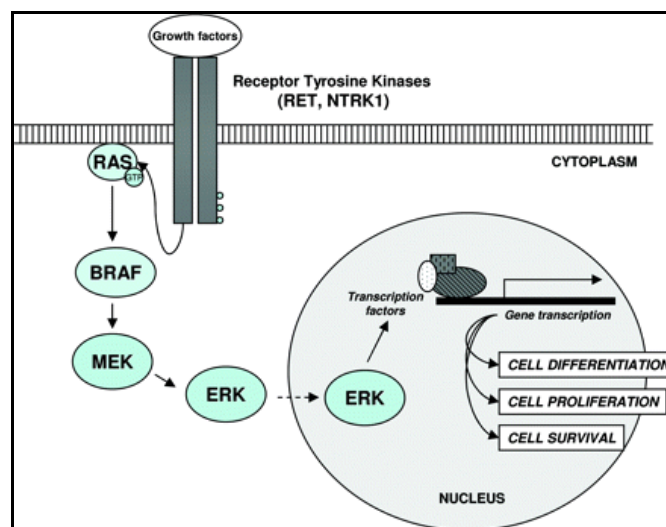
L'analisi FISH su cellule di carcinoma papillare radio-indotto ha mostrato un'eterogeneità genetica all'interno del tessuto neoplastico essendo il riarrangiamento *RET/PTC* presente solo in una parte di esse. È inoltre emerso un raggruppamento delle cellule aberranti nella massa tumorale che solleva molte domande riguardo lo sviluppo clonale di PTC.

Il fatto che il tessuto tumorale non sia omogeneo geneticamente suggerisce un'evoluzione policlonale delle cellule neoplastiche tramite lo sviluppo divergente di cloni differenti all'interno dello stesso nodulo [40].

#### 4.2 Mutazioni somatiche del gene *BRAF*

La via di segnalazione delle MAP chinasi ha un ruolo centrale nella proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare [Figura 17]. La serina/treonina chinasi RAF è un trasduttore/effettore di questa via e strutturalmente si suddivide nei domini regolatori N-terminali CR1 e CR2 e nel dominio chinamico C-terminale CR3. Nello stato inattivo la conformazione di RAF consta di una struttura chiusa con i domini regolatorio e chinamico che interagiscono fra loro. La proteina RAS attivata interagisce col suo sito di legame nella regione CR1 di RAF e recluta la chinasi sulla membrana cellulare dove subirà la fosforilazione attivante della serina 602 e della treonina 599 nel dominio CR3. In seguito all'attivazione mediata da RAS la segnalazione procede con l'eterodimerizzazione di RAF e la successiva fosforilazione di MEK [41].

Nelle cellule di mammifero RAF esiste in tre isoforme con diversa distribuzione ed espressione tissutale: ARAF, BRAF, CRAF. Delle tre è BRAF l'isoforma a maggiore affinità per MEK e con l'attività catalitica più efficiente [37].



**Figura 17.** La via di segnalazione delle MAP chinasi: effettori e ruolo nella biologia della cellula.

Le alterazioni molecolari del gene *BRAF*, localizzato sul cromosoma 7, sono la causa principale di attivazione aberrante della via delle MAP chinasi nei tumori umani. Si ritrovano nel 66% dei melanomi e in meno del 15% dei tumori colon-rettali e ovarici [37].

Sono state trovate più di 40 mutazioni attivanti a carico degli esoni 11 e 15 di *BRAF* e tra queste la più frequente (>90%) è la mutazione puntiforme T>A del nucleotide 1799 (T1799A) che provoca la sostituzione di una valina con un glutammato al codone 600 (p.V600E) nella sequenza amminoacidica della proteina [7;28].



La mutazione p.V600E provoca l'attivazione costitutiva di BRAF e della via di segnalazione nella quale si inserisce poiché l'inserzione di un residuo acido vicino al sito regolatorio di fosforilazione (Ser599) mima l'attivazione della proteina [29;42]. Studi in vitro hanno rilevato un'elevata attività chinasica basale della proteina BRAF mutata e una ridotta responsività alla stimolazione da parte dell'effettore a monte nella via di signaling (RAS) [37].

BRAF p.V600E è l'anomalia genetica più frequente nel carcinoma papillare della tiroide con una prevalenza variabile secondo la fonte considerata: 40-45% [7;20;28], 29-83% [42], 29-69% [30] o 48% [43].

Inoltre nel carcinoma papillare sono stati riscontrati altri rari meccanismi di attivazione di BRAF come la mutazione p.K601E, piccole delezioni ed inserzioni *in frame* vicini al codone 600 e il riarrangiamento *AKAP9/BRAF* associato al PTC radio-indotto [7;28;30].

La mutazione al codone 600 di *BRAF* ha un ruolo fondamentale nell'iniziazione tumorale essendo stata riscontrata nei microcarcinomi papillari che rappresentano una fase neoplastica notevolmente precoce [29;30;41;42].

BRAF p.V600E si ritrova anche nei carcinomi poco differenziati o anaplastici originati da un PTC ben differenziato preesistente con una frequenza del 25% [43]. Infatti studi istologici hanno rilevato che carcinomi anaplastici e poco differenziati con *BRAF* mutato contengono aree di PTC preesistente con cellule portatrici della mutazione. Questo indica che la p.V600E è specifica per PTC e che i carcinomi dedifferenziati che la presentano non si sviluppano *de novo* ma da un PTC preesistente [29].

La variante molecolare p.V600E non è stata riscontrata in altri tipi istologici come adenoma follicolare, carcinoma follicolare, carcinoma midollare o noduli iperplastici benigni [29].

È da sottolineare che non sono state riscontrate mutazioni germinali di *BRAF* che possano associarsi alle forme familiari di carcinoma tiroideo [28].

BRAF p.V600E ha una diversa distribuzione nei diversi sottotipi di PTC: ha una frequenza del 77% nelle varianti a cellule alte, del 60% nel PTC ad istologia classica e del 12% nelle varianti follicolari [42].

Esistono inoltre numerosi studi che identificano la presenza di una mutazione in *BRAF* oltre che come marker diagnostico altamente specifico per PTC anche come fattore predittivo prognostico; è stata infatti dimostrata una correlazione di BRAF p.V600E con aspetti clinico-patologici ad alto rischio nei carcinomi papillari come metastasi linfonodali, invasione extratiroidale e stadio avanzato della malattia (III-IV) alla diagnosi. *BRAF* mutato è quindi associato ad un comportamento tumorale aggressivo promuovendo l'invasività e la metastatizzazione [28;30;44].

La presenza della mutazione BRAF p.V600E è associata con la ricorrenza di PTC anche in sottogruppi di pazienti con stadi clinico-patologici di basso grado (I-II) che generalmente sono associati con basso rischio di recidiva **[45]**.

Rimane poco chiaro perché mutazioni a carico di *BRAF* siano associate ad un incremento dell'aggressività, della ricorrenza e dell'evoluzione verso forme dedifferenziate di PTC al contrario di altri effettori mutati della via MAPK, come *RET/PTC* che è la seconda alterazione più comune **[28;29]**.

Mutazioni in *BRAF*, per esempio, al contrario di *RET/PTC*, inducono instabilità genica favorendo l'insorgenza di alterazioni genetiche secondarie che determinano invasione e dedifferenziazione tumorale. Inoltre la presenza della proteina *BRAF* mutata si associa ad alterazioni epigenetiche e a differenti profili di espressione nel carcinoma papillare tiroideo.

Recenti studi hanno dimostrato l'associazione fra la presenza di BRAF mutata e la metilazione aberrante di importanti oncosoppressori inclusi *TIMP3*, *DAPK* e *RARβ2*. L'ipermetilazione delle regioni geniche regolatorie favorisce il silenziamento di tali geni oncosoppressori risultante in una elevata aggressività e invasività tumorale.

*TIMP3* sopprime crescita tumorale, angiogenesi, invasione e metastatizzazione impedendo la distruzione della matrice interstiziale promossa dalla metalloproteinasi MMP3 e bloccando il legame del VEGF al suo recettore. VEGF è una molecola angiogenica che svolge un ruolo critico nella progressione e invasione tumorale e la cui overespressione si associa alla mutazione di *BRAF*. Gli effetti angiogenici di BRAF attraverso la promozione della metilazione di *TIMP3* e l'overespressione di VEGF favoriscono la progressione e l'invasività tissutale di PTC.

*BRAF* provoca anche l'overespressione di varie MMP che favoriscono l'invasione locale e a distanza tramite meccanismi angiogenici e distruzione della matrice.

La mutazione di BRAF p.V600E è associata, inoltre, a una ridotta espressione di geni importanti per il metabolismo dello iodio e per la biosintesi degli ormoni tiroidei come TPO, NIS e Tg nei PTC primari o recidivanti **[28;30]**.

La bassa espressione della pompa iodio-sodio predispone ad una ridotta captazione del radioiodio che rappresenta la strategia terapeutica post-chirurgica ottimale per la completa risoluzione. PTC portatori della mutazione in *BRAF* si associano quindi spesso ad un fallimento della terapia con radioiodio e ad una progressione precoce della malattia verso forme dedifferenziate e ricorrenti. I pazienti necessitano quindi di terapie più aggressive per eliminare efficacemente il tumore ed evitare recidivazione

come dosi più alte di radioiodio, chirurgia più estesa o irradiazione esterna **[4;7;28]**.

Per concludere *BRAF* oltre ad essere un marcatore molecolare diagnostico molto specifico per PTC è anche un marcatore prognostico capace di influenzare la gestione del follow-up e del monitoraggio del paziente e la scelta della terapia più opportuna.

### **4.3 Mutazioni somatiche nei geni della famiglia RAS**

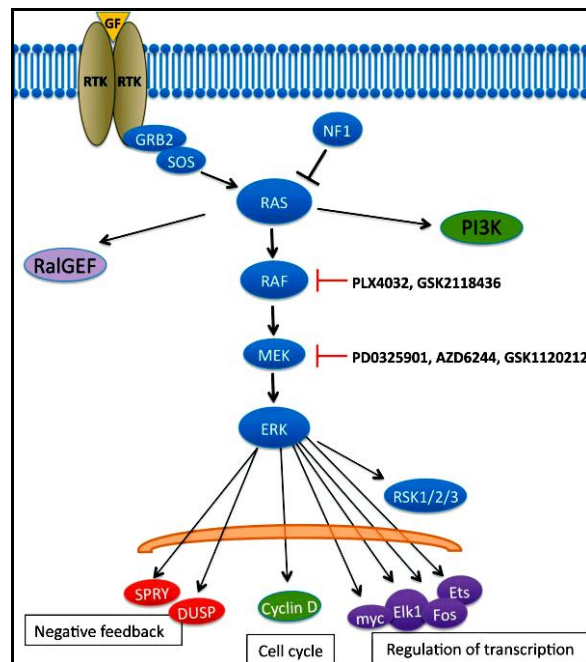
I geni *RAS* codificano proteine G localizzate sulla superficie interna della membrana cellulare e aventi un ruolo centrale nella trasduzione del segnale intracellulare originato da recettori tirosin-chinasici o accoppiati a proteine G **[30;32]**.

Nelle cellule umane esistono tre isoforme di proteine RAS (H-RAS, K-RAS e N-RAS) che alternano uno stato attivo di legame col GTP con uno stato inattivo di legame col GDP.

Il legame di fattori di crescita ai rispettivi recettori favorisce l'interazione di quest'ultimi con molecole adaptor (ad esempio Grb2) che reclutano e attivano il fattore di scambio di nucleotide della guanina (GEF), membro della famiglia delle proteine SOS. GEF favorisce l'attivazione di RAS promuovendo la sostituzione del GDP col GTP sul sito di legame specifico della proteina.

L'inattivazione di RAS è invece regolata dalle proteine di attivazione delle GTPasi (GAPs) che stimolano l'attività GTPasica intrinseca di RAS ristabilendo il legame della proteina col GDP. Nelle cellule di mammifero le due GAPs chiave sono p120GAP e NF1; la seconda è un oncosoppressore che si ritrova mutato a livello germinale nella neurofibromatosi e a livello somatico nel glioblastoma e in altri sottotipi tumorali **[41]**.

La proteina RAS attivata dal legame col GTP regola vari processi cellulari inclusi proliferazione, sopravvivenza e differenziazione interagendo con effettori coinvolti in vie di segnalazione differenti. Tra queste vie le più rilevanti sono quella della MAP chinasi e la PI3K-AKT **[41; Figura18]**.



**Figura 18. Principali vie di segnalazione stimulate dalla proteina G RAS [41].**

Gli oncogeni *HRAS*, *NRAS* e *KRAS* sono soggetti a mutazioni missenso attivanti che si localizzano prevalentemente ai codoni 12, 13 e 61 nel 35% dei tumori umani [46; Figura19]. Queste varianti geniche somatiche determinano l'attivazione costitutiva delle proteine da essi codificate e una stimolazione cronica dei rispettivi target molecolari [27;30].

Tali mutazioni attivano la proteina RAS con meccanismi diversi che ne alterano l'attività idrolitica intrinseca: ai codoni 12 e 13 si ha la sostituzione della glicina con un amminoacido con catena laterale che crea ingombro sterico mentre al codone 61 si ha l'eliminazione dell'interazione tra la glutammina di RAS e l'arginina 789 della proteina p120GAP [41].

Tumour type	KRAS (%)	HRAS (%)	NRAS (%)
Biliary tree	31	0	11
Bladder	4	11	2
Breast	4	1	2
Cervix	7	9	2
Colon	33	0	3
Endometrial	14	1	0
Liver	6	0	4
Lung	17	0	1
Melanoma	2	6	18
Ovary	14	0	3
Pancreas	58	0	2
Thyroid	3	3	7

**Figura 19. Prevalenza delle alterazioni dei geni RAS nei principali tumori umani [41].**

Le mutazioni attivanti dei geni *RAS* sono state riscontrate anche nei carcinomi tiroidei con frequenze diverse in base al sottotipo istologico.

Le alterazioni prevalenti si localizzano al codone 61 dei geni *NRAS* e *HRAS* [27] mentre risultano poco rappresentate le mutazioni ai codone 12,13 e 61 di *KRAS*. Queste varianti geniche si riscontrano prevalentemente negli FTC (50%), negli adenomi follicolari (40%), nei carcinomi a cellule di Hürtle (25%), nei PTC (10-20%) [30] e nei carcinomi poco differenziati [47].

I PTC che presentano mutazioni somatiche a carico di uno dei geni *RAS* appartengono generalmente alla variante istologica follicolare [48] e presentano aberrazioni nucleari poco evidenti, frequente incapsulamento e basso tasso di metastasi linfonodali [32].

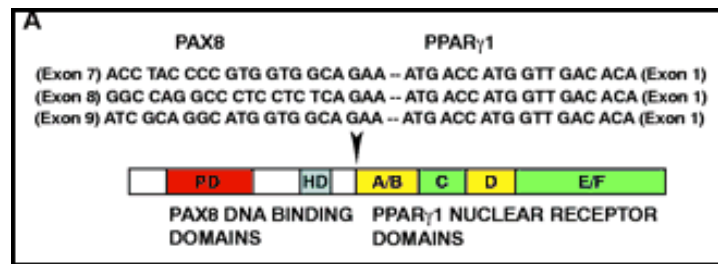
Gli FTC positivi per le alterazioni di *RAS* si associano invece a dedifferenziazione tumorale e prognosi più infausta. Questo aspetto è confermato dal fatto che anche i carcinomi anaplastici sono mutati su *RAS* e che il gene induce destabilizzazione cromosomica se alterato in vitro predisponendo la cellula all'acquisizione di ulteriori alterazioni genetiche ed epigenetiche e quindi alla dedifferenziazione [30;32]. Le alterazioni di *RAS* sono quindi correlate con un comportamento aggressivo dei carcinomi follicolari ma si ritrovano tuttavia anche in tumori indolenti [27;32].

Mutazioni di *RAS* sono state rilevate in adenomi microfollicolari suggerendo che sono un evento precoce nella tumorigenesi tiroidea [46].

In conclusione mutazioni a carico dei geni *RAS* sono un'alterazione genetica ricorrente del carcinoma tiroideo ma la sua utilità nella diagnosi differenziale di noduli tiroidei indeterminati è limitata dalla sua presenza rilevante negli adenomi benigni.

#### **4.4 Il gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$***

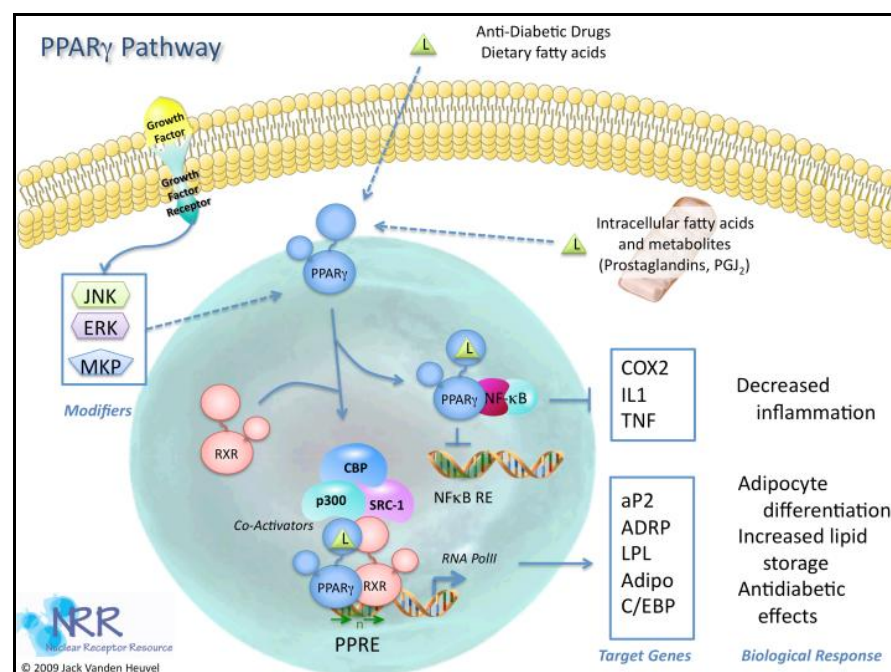
Il riarrangiamento *PAX8/PPAR $\gamma$*  risulta dalla traslocazione t(2;3)(q13;p25) che provoca la fusione in frame del dominio di DNA-binding di *PAX8* (Paired Box 8) con l'esone 1 del recettore *PPAR $\gamma$*  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) [Figura 20]. Nella proteina di fusione viene perso il dominio di transattivazione di *PAX8* mentre vengono mantenuti i domini di legame del DNA, di interazione col ligando, di dimerizzazione e di transattivazione di *PPAR $\gamma$*  [49]. Nella traslocazione il punto di rottura può localizzarsi all'esone 7 o all'esone 9 di *PAX8* [25] ed in entrambi i casi si genera una proteina di fusione la cui espressione è controllata dal promotore di *PAX8* [30].



**Figura 20. Il gene di fusione PAX8/PPAR $\gamma$ .**

PAX8 è un fattore di trascrizione altamente espresso e specifico per la tiroide necessario per il corretto sviuppo dell'organo e coinvolto nel mantenimento della corretta funzionalità dei tireociti differenziati.

PPAR $\gamma$  è invece un recettore ormonale nucleare ubiquitariamente espresso e coinvolto nella differenziazione del tessuto adiposo e nel metabolismo di acidi grassi e glucosio. Regola la trascrizione di numerosi geni target in seguito all'eterodimerizzazione col recettore dell'acido retinoico (RXR) che permette l'interazione con il DNA in prossimità della regione del promotore stimolando l'espressione genica. PPAR $\gamma$  è espresso a bassi livelli nel tessuto tiroideo normale e non ha funzioni note in quest'organo. Questo recettore ha inoltre un effetto anti-neoplastico rilevante sia nei tumori solidi che nella leucemia che si realizza attraverso inibizione della proliferazione cellulare, induzione dell'apoptosi e della differenziazione terminale, inibizione dell'angiogenesi [30; Figura21].



**Figura 21. Pathway associati a PPAR $\gamma$  e relativi effetti biologici.**

Nei carcinomi tiroidei l'incidenza più alta di *PAX8/PPAR $\gamma$*  è stata riscontrata negli FTC (fino al 60%), mentre negli adenomi follicolari e nei carcinomi a cellule Hürtle si presenta con una frequenza inferiore **[30]**. I carcinomi follicolari portatori di questo riarrangiamento tendono ad avere un'istologia solida, si presentano in giovane età e sono frequentemente associati a invasione vascolare **[27;32]**. Gli adenomi follicolari positivi per *PAX8/PPAR $\gamma$*  sono invece generalmente incapsulati e mostrano un profilo immunohistochimico caratteristico del carcinoma. Questo sembra suggerire che il riarrangiamento rappresenti un marker di carcinoma follicolare preinvasivo o di un tumore maligno la cui invasione è stata trascurata durante l'esame istologico **[7]**.

*PAX8/PPAR $\gamma$*  è stato trovato occasionalmente anche nelle varianti follicolari di PTC **[7;31]** ma non nei carcinomi poco differenziati e anaplastici **[4]**.

*PPAR $\gamma$*  si trova in una regione genica "hot spot" e risulta riarrangiato in modo ricorrente nelle iperplasie tiroidee ad origine follicolare con o senza il coinvolgimento di *PAX8*. È stato riscontrato infatti il riarrangiamento CREB3L2/*PPAR $\gamma$*  t(3;7)(q34;p25) in <3% dei FTC **[30]**.

Il riarrangiamento cromosomico è l'unico meccanismo di attivazione di *PPAR $\gamma$*  nei carcinomi tiroidei non essendo state riscontrate mutazioni puntiformi o altri tipi di aberrazioni **[25]**.

L'impatto di *PAX8/PPAR $\gamma$*  sulla prognosi dell'FTC è controverso non essendoci particolari evidenze a riguardo **[30;50]**.

Studi in vitro hanno dimostrato che il riarrangiamento *PAX8/PPAR $\gamma$*  stimola la proliferazione delle cellule tiroidee ma il meccanismo molecolare col quale agisce è ancora poco chiaro **[30]**.

La proteina di fusione sembra non attivare la trascrizione dei geni target del recettore non riarrangiato ed essendo espressa ad alti livelli potrebbe quindi agire come dominante negativo inibendo la trasattivazione di *PPAR $\gamma$*  wild-type **[32;33;49;50]**. L'ipotesi è quindi che *PAX8/PPAR $\gamma$*  in vitro promuova crescita e trasformazione cellulare interferendo con la funzione anti-tumorale del recettore non alterato.

Il fatto che la down regolazione o l'inibizione di *PPAR $\gamma$*  costituisca un evento chiave nella carcinogenesi è dimostrato da un'espressione notevolmente ridotta del recettore nei carcinomi papillari e follicolari negativi per la traslocazione e quando questa riduzione è particolarmente marcata si associa anche a dedifferenziazione negli stadi tardivi di progressione tumorale **[30]**.

Il meccanismo di trasformazione cellulare sembra essere legato alla perdita della normale regolazione trascrizionale dei geni target oltre che di *PPAR $\gamma$*  anche di *PAX8* **[32;50]**.

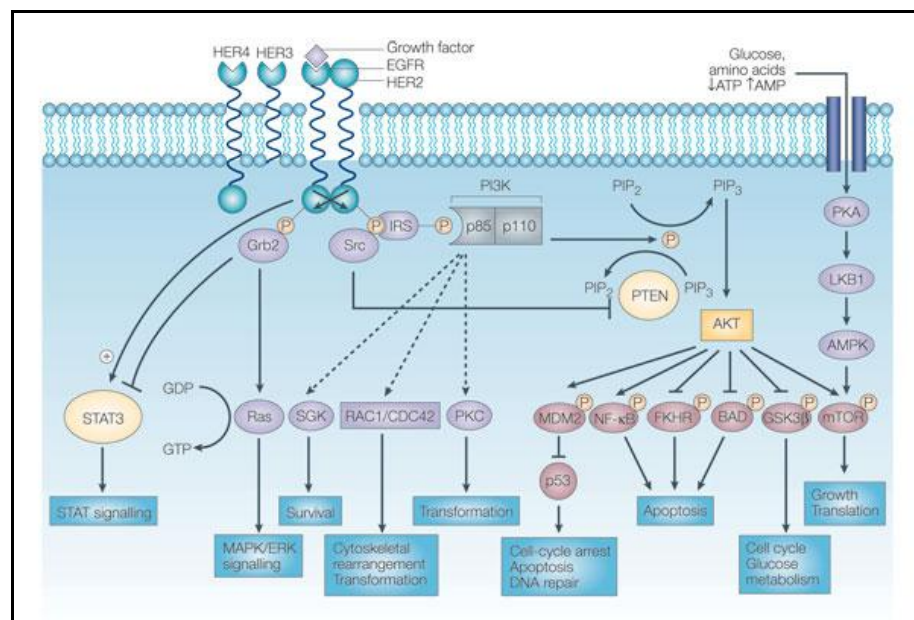
Inoltre è da tenere in considerazione il fatto che la proteina di fusione PAX8/PPAR $\gamma$  potrebbe dar origine a vie di signaling anomale coinvolte nella carcinogenesi [49].

#### 4.5 Altre alterazioni genetiche associate a neoplasie tiroidee

Le alterazioni genetiche fino a qui descritte sono le più frequentemente coinvolte nella patogenesi dei carcinomi tiroidei e costituiscono generalmente un evento precoce nell'evoluzione tumorale.

Oltre a queste ne sono state descritte altre, più rare, che alterano comunque meccanismi cellulari quali differenziazione, proliferazione e apoptosi.

La via PI3K/AKT per esempio gioca un ruolo centrale in tali meccanismi e la sua attivazione è un'aspetto comune a molti tumori incluso quello tiroideo [30; Figura 22].



**Figura 22. Pathway di PI3K/AKT.**

PI3K appartiene a una famiglia di chinasi costituite da una subunità regolatoria (p85) e una catalitica (p110) e attivate da recettori tirosin-chinasici e altri trasduttori di segnale che regolano un'ampia varietà di funzioni cellulari. L'attivazione di PI3K provoca la conversione di PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub> che innesca la trasduzione del segnale attraverso vari effettori contenenti il dominio PH.

Tra questi la serina-treonina chinasi AKT è il più importante e interagisce con vari trasduttori citosolici e nucleari che regolano proliferazione cellulare, apoptosi, metabolismo, adesione e motilità.



PTEN è una fosfatasi che si oppone all'attività chinasi di PI3K convertendo il PIP3 in PIP2 e prevenendo quindi l'attivazione di AKT **[50;51]**.

Le anomalie genetiche a carico degli effettori della via PI3K/AKT nel carcinoma tiroideo sono state riscontrate più frequentemente nei sottotipi follicolare e anaplastico rispetto al papillare e determinano un'incremento della segnalazione della via stessa **[51]**.

Tale incremento di segnalazione può realizzarsi attraverso vari meccanismi quali mutazioni attivanti o amplificazione del gene *PI3KCA* che codifica la subunità catalitica di PI3K (p110), diminuzione dell'espressione o inattivazione di PTEN, attivazione costitutiva dei geni *RAS* e *AKT* o overespressione dei recettori tirosin-chinasi associati alla via di PI3K/AKT (*RET*, *cMET*, *FGF*, *IGF-1*, *VEGF*) **[30;51]**.

Di questi meccanismi la riduzione di espressione di *PTEN* attraverso meccanismi epigenetici o perdita di eterozigosi (LOH) e l'amplificazione di *PI3KCA* sono stati rilevati in una frazione significativa di FTC e UTC al contrario delle loro mutazioni che risultano più rare **[51]**.

Mutazioni inattivanti di *PTEN* sono invece coinvolte nella sindrome di Cowden che si associa al carcinoma follicolare tiroideo nel 10% dei pazienti **[51]**.

Il fatto che le alterazioni della via PI3K/AKT siano state trovate oltre che nei carcinomi differenziati anche negli adenomi follicolari suggerisce che questa via di segnalazione giochi un ruolo centrale negli stadi precoci della tumorigenesi tiroidea. Le alterazioni della PI3K/AKT sono inoltre mutualmente esclusive tra loro e non si sovrappongono ad altre aberrazioni oncogeniche nei carcinomi tiroidei differenziati dimostrando che ognuna di loro è sufficiente da sola a indurre la trasformazione neoplastica **[51]**.

Tuttavia la mutua esclusività non è valida per gli UTC quindi questa via di segnalazione ha un ruolo importante anche nella progressione di FTC a UTC **[30;50;51]**.

L'oncogene *TRK- fused gene* origina dal riarrangiamento del gene *NTRK1* (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor1) sul cromosoma 1. Questo gene codifica un recettore tirosin-chinasi ad alta affinità per NGF (Nerve Growth Factor) che è coinvolto nello sviluppo e nella maturazione del sistema nervoso centrale e periferico e che stimola la proliferazione di un gran numero di cellule come linfociti, cheratinociti e cellule prostatiche **[30]**. Il legame del fattore di crescita al recettore provoca la stimolazione di numerosi pathway di segnalazione inclusi PI3K/AKT, PLC $\gamma$  e RAS/ERK MAP chinasi **[52]**.

Nel carcinoma tiroideo sono stati isolati vari oncogeni *TRK* nei quali il dominio chinasi del gene *NTRK1* si giustappone a regioni geniche attivanti diverse. Il più frequente è quello originariamente identificato nel carcinoma del colon che

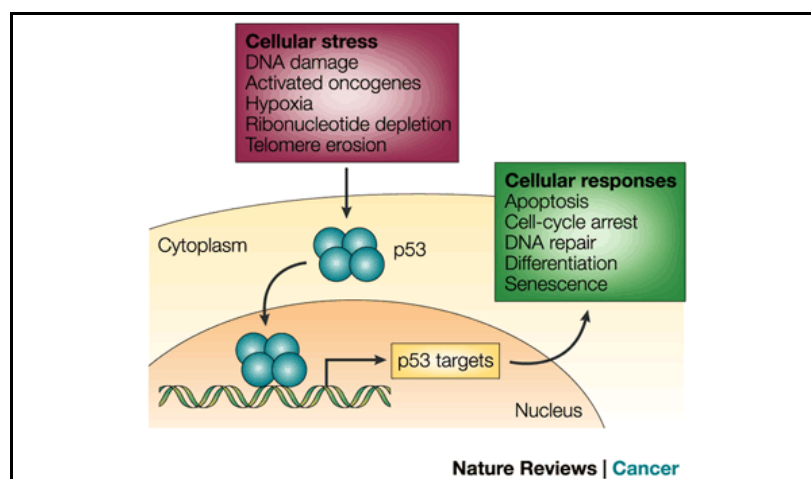
contiene la sequenza di *TPM3* sul cromosoma 1q22-23; sono stati inoltre identificati gli oncogeni *TRK-T1/2* e *TRK-T3* che riarrangiano rispettivamente con *TPR* e *TFG*. Tutte le oncoproteine TRK mantengono i cinque residui tirosinici cruciali per l'attività chinastica intracellulare del recettore NTRK1.

Questi riarrangiamenti hanno un'incidenza nel carcinoma papillare inferiore a quella di *RET/PTC* non superando il 12% [30].

Come abbiamo già visto per *RET/PTC*, anche in questo caso la prossimità durante l'interfase dei loci genici coinvolti sembra essere il meccanismo responsabile del riarrangiamento [38]. Inoltre come nel caso di *RET/PTC*, la proteina riarrangiata assume caratteristiche del tutto nuove come espressione ectopica nei tireociti, localizzazione citoplasmatica, dimerizzazione e attività chinastica costitutive [30]. I carcinomi poco differenziati e anaplastici sono portatori oltre che delle mutazioni di *RAS* e *BRAF*, che si sviluppano negli stadi di iniziazione tumorale, anche di mutazioni a carico di *TP53*, *CTNNB1*, *PTEN* e *PI3KCA* [25;27]. Questo è riconducibile all'induzione di instabilità genetica da parte di *BRAF* e *RAS* mutati che predispone la cellula all'acquisizione di aberrazioni genetiche successive e quindi alla progressione tumorale verso forme dedifferenziate.

L'oncosoppressore *TP53* codifica una proteina nucleare che induce nella cellula arresto del ciclo cellulare, senescenza e apoptosi in risposta a stimoli dannosi [50; Figura23].

Mutazioni puntiformi inattivanti di p53 portano all'innesco di una replicazione cellulare incontrollata e quindi allo sviluppo tumorale [27].



**Figura 23. Effetti biologici della proteina p53.**

*CTNNB1* codifica invece la  $\beta$ -catenina, una proteina citoplasmatica coinvolta nell'adesione cellulare e nella trasduzione del segnale della via Wnt che influenza differenziazione cellulare, proliferazione e migrazione [27].

Le mutazioni di *CTNNB1* e *TP53* sono state associate a carcinomi tiroidei poco differenziati e UTC ma sono praticamente inesistenti nei carcinomi differenziati suggerendo che tali aberrazioni geniche rappresentano un evento tardivo nella carcinogenesi tiroidea [50].

#### **4.6 Ruolo della biologia molecolare nella diagnostica dei noduli tiroidei**

L'indagine citologia del materiale agoaspirato attualmente rappresenta il metodo più sensibile e accurato per la diagnosi differenziale dei noduli tiroidei. Tuttavia questa metodica può risultare inconcludente nel 30% delle biopsie offrendo risultati indeterminati o con sospetto di malignità o essere incapace di dare fornire una diagnosi per materiale insufficiente o inadeguato.

Questi limiti della FNAB rendono sempre più necessaria l'introduzione di nuovi parametri che supportino la diagnosi e la conseguente scelta terapeutica alla specifica risposta.

Al momento la letteratura scientifica è indirizzata verso l'utilizzo della biologia molecolare come approccio ideale per incrementare l'accuratezza della citologia dell'agoaspirato specialmente nel contesto dei tumori tiroidei di origine follicolare che presentano spesso alterazioni genetiche chiaramente descritte [20].

Recenti studi dimostrano come l'analisi molecolare del pannello di geni maggiormente coinvolti nella patogenesi tumorale tiroidea (*BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPAR $\gamma$* ) sia un valido supporto alla diagnosi differenziale di noduli sospetti o indeterminati [11;13;20;53]. L'analisi delle singole alterazioni molecolari sembra, infatti, possedere un'utilità limitata a seguito della bassa sensibilità dato la distribuzione estremamente varia delle alterazioni caratterizzanti le varie forme di carcinoma differenziato della tiroide [21].

L'individuazione di una mutazione a carico di un marker genetico rappresenta spesso un potente indicatore di malignità e permette di indirizzare la diagnosi preoperatoria verso un determinato sottotipo tumorale in caso di mutazioni specifiche per una determinata varietà.

*BRAF*, *RET/PTC* e *PAX8/PPAR $\gamma$*  sono strettamente associati alla tumorigenesi mentre le mutazioni di *RAS* si ritrovano in una frazione decisamente alta di adenomi benigni e quindi la loro individuazione ha una specificità diagnostica

generalmente più bassa. Tuttavia poiché gli adenomi *RAS* positivi potrebbero essere precursori di FTC si suggerisce il monitoraggio attento del nodulo nel tempo [11].

Per pazienti con citologia indeterminata/sospetta e portatori di mutazione è stato proposto un livello di intervento diverso che non prevede una semplice lobectomia a scopo diagnostico ma l'eventuale rimozione totale fin dal primo intervento al fine di ridurre una successiva chirurgia [10].

L'individuazione di lesioni tiroidee benigne alla citologia che però presentano varianti molecolari a carico dei geni coinvolti nella carcinogenesi potrebbero essere determinate da foci con cellule pre-cancerose microscopici non rilevabili alla sola citologia, è pertanto opportuno anche per questi pazienti individuare un percorso per il monitoraggio della patologia più appropriato e attento [21].

Mentre l'individuazione di una mutazione è significativa da un punto di vista diagnostico, non si può dire lo stesso di un risultato negativo [21]. L'assenza di aberrazioni a livello dei geni principalmente coinvolti nella cancerogenesi non esclude con certezza la presenza di una neoplasia che può sfuggire all'analisi molecolare per motivi intrinseci della analisi molecolare. È necessario, infatti, considerare che anche per l'analisi molecolare il materiale analizzato non sia sufficientemente rappresentativo della composizione cellulare del nodulo. Allo stesso modo è possibile che alcuni carcinomi presentino mutazioni su oncogeni o oncosoppressori non diversi da quelli sottoposti ad indagine [10]. Inoltre, il materiale citologico è un mosaico di cellule interessanti dal punto di vista diagnostico e cellule normali. Il rapporto tra cellule normali e rappresentative della patologia del campione può dipendere strettamente dal punto in cui viene effettuato l'agoaspirato. Quindi è possibile che i metodi di screening molecolare utilizzati non siano abbastanza sensibili da rilevare la presenza delle poche molecole di DNA mutate in un eccesso di DNA wild-type derivante dalle cellule normali [10].

Sono stati effettuati vari studi retrospettivi che hanno calcolato l'accuratezza e le caratteristiche tecniche dell'analisi molecolare dei geni *BRAF*, *RET*, *H-N-K-RAS* e *PAX8/PPAR $\gamma$*  su campioni di agoaspirato tiroideo confrontando il risultato molecolare con quello istologico [Figura 24]. Alcuni studi prendono in esame singoli geni ma lo studio di un pannello complesso sembra possedere un impatto diagnostico maggiore.

Author	Mutations analyzed	Material studied	Methodologies used
Bentz et al. (2009)	BRAF	DNA from cytologic slides	LightCycler PCR/fluorescent probe melting curve analysis
Cheung et al. (2001) Chung et al. (2006)	RET/PTC1, -2, -3 BRAF	RNA from FNAB DNA from post-surgical aspirated nodules	RT-PCR/Southern hybridization PCR/sequencing, PCR-RFLP
Cohen et al. (2004)	BRAF	DNA from cytologic slides	PCR/sequencing, Mutector assay
French et al. (2008) Jin et al. (2006)	PAX8/PPAR $\gamma$ BRAF	Cells from FNAB DNA from cytologic slides	FISH PCR/sequencing, Mutector assay, LightCycler PCR with FRET probes, allele-specific LightCycler PCR with CYBR Green
Jo et al. (2009) Nikiforov et al. (2009)	BRAF BRAF, RAS, RET/PTC, PAX8/PPAR $\gamma$	DNA from FNAB DNA/RNA from FNAB	PCR/pyrosequencing, PCR/dideoxy sequencing LightCycler PCR/fluorescent probe melting curve analysis, RT-PCR for rearrangements, PCR/sequencing
Pizzolanti et al. (2007)	BRAF, RET/PTC	DNA from FNAB, RNA from ex vivo nodules	Allele-specific LightCycler PCR with CYBR Green, Mutector assay, RT-PCR for rearrangements
Rowe et al. (2006)	BRAF	DNA from cytologic slides	LightCycler PCR/fluorescent probe melting curve analysis, PCR/sequencing
Sapio et al. (2007a) Sapio et al. (2007b)	BRAF (+galectin-3 expression) RET/PTC, TRK, BRAF	DNA from FNAB DNA/RNA from FNAB	Mutant allele-specific PCR amplification (MASA), ICC Mutant allele-specific PCR amplification (MASA), RT-PCR
Xing et al. (2004) Xing et al. (2009)	BRAF BRAF	DNA from FNAB DNA from FNAB	PCR/sequencing, Mutector assay Mutector assay

**Figura 24. Studi di ricerca sulle principali mutazioni somatiche coinvolte nella carcinogenesi tiroidea per la valutazione della sua applicabilità nella pratica clinica [4].**

Moses *et al.* hanno riscontrato valori di sensibilità, specificità, PPV e NPV del test molecolare sul pannello di geni in esame del 38%, 65%, 42% e 65% rispettivamente. Secondo questo studio il vantaggio in termini di accuratezza dell'analisi molecolare non è sufficientemente alto da poter risparmiare ai pazienti con citologia indeterminata una tiroidectomia diagnostica [20].

Nikiforov *et al.* Mostrano, invece, risultati più incoraggianti e promettenti grazie all'utilizzo di tecniche di screening molecolare più sensibili. Mentre l'analisi citologica presenta dei valori di sensibilità e specificità del 44% e 100% nell'individuare una lesione maligna, l'analisi molecolare pur avendo una specificità leggermente inferiore presenta una sensibilità intorno al 60%. Questo suggerisce che l'analisi molecolare sia in grado di identificare lesioni maligne che sfuggono alla FNAB date le sue limitazioni tecniche. Test molecolare e citologico effettuati in parallelo riescono a fornire una sensibilità dell'80% e raggiungono un livello di accuratezza molto vicino al 100% [11; 53].

Concludendo l'analisi molecolare, data la sua alta sensibilità e specificità, è riportata in letteratura come un valido supporto all'analisi citologica indipendentemente dalla categoria diagnostica anche se i suoi vantaggi sono particolarmente apprezzati specialmente nel contesto delle proliferazioni follicolari di incerto significato o in casi di diagnosi sospetta o di campioni inadeguati.

## 5 RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA RICERCA DI NUOVI TARGET TERAPEUTICI

I pazienti il cui iter diagnostico abbia accertato la presenza di un carcinoma tiroideo differenziato vengono generalmente sottoposti a tiroidectomia e successiva ablazione con radioiodio ( $^{131}\text{I}$ ). Questo trattamento adiuvante è finalizzato a rimuovere eventuali residui di tessuto tiroideo post-operatori [2]. Chirurgia e ablazione, pur essendo trattamenti sufficienti nella maggioranza dei pazienti con carcinomi ben differenziati, risultano inefficaci in una minoranza di pazienti refrattari al radioiodio (10-15%) che mostra progressione tumorale e metastatizzazione [13].

Forme avanzate di carcinoma tiroideo manifestano, talvolta, perdita di differenziazione cellulare e forte carica invasiva e resistenza al radioiodio e alla chemioterapia [27;54].

Le recenti conquiste riguardo la conoscenza delle basi molecolari e cellulari della tumorigenesi tiroidea hanno permesso lo sviluppo di terapie mirate innovative a target molecolare per le quali i tumori avanzati sono i candidati ideali.

Tali terapie possono essere suddivise in specifiche categorie:

- Inibitori delle vie di segnalazione oncogeniche. Hanno come target molecolari recettori tirosin-chinasici ed effettori della via di segnalazione delle MAP chinasi attivati nelle cellule tumorali. Sono in fase di valutazione clinica inibitori di RET, RAS, RAF e MEK.
- Modulatori di crescita e apoptosi. Componenti chiave dei processi di crescita e apoptosi sono target di attivatori di PPAR $\gamma$ , inibitori di COX2, inibitori del proteasoma (Bortezomib) e delle heat shock protein.
- Inibitori dell'angiogenesi. Hanno come target il recettore del VEGF e altri membri delle vie di signaling stimolanti la neoangiogenesi con lo scopo di limitare la crescita tumorale agendo sul sistema vascolare.
- Immunomodulatori. Stimolano la risposta immunitaria al cancro favorendo l'attività delle cellule presentanti l'antigene (APC).
- Terapia genica. Consiste nell'introdurre geni tossici per la cellula sotto il controllo di specifici promotori tiroide-specifici o nel ripristinare l'attività di oncosoppressori spenti nella cellula tumorale. Questo approccio purtroppo presenta molti limiti soprattutto di *gene delivery* [13].

### **5.1 Inibitori delle vie di segnalazione oncogeniche nel carcinoma tiroideo**

È ormai noto che le vie di segnalazione coinvolte in processi cellulari quali proliferazione, apoptosi e differenziazione, se espresse in maniera anomala a causa della comparsa di mutazioni sono in grado di indurre e sostenere la progressione tumorale. Nei carcinomi tiroidei le mutazioni attivanti a carico degli effettori della via delle MAP chinasi e di altre pathway sono molto frequenti e si distribuiscono diversamente nei vari sottotipi istologici.

Il ruolo centrale di questi effettori nello sviluppo tumorale li rende target ideali di terapie molecolari mirate. Lo sviluppo di farmaci che inibiscano l'attività enzimatica di recettori tirosin-chinasici e dei rispettivi trasduttori del segnale potrebbe costituire la strategia terapeutica ottimale per la cura di carcinomi tiroidei insensibili alle terapie tradizionali.

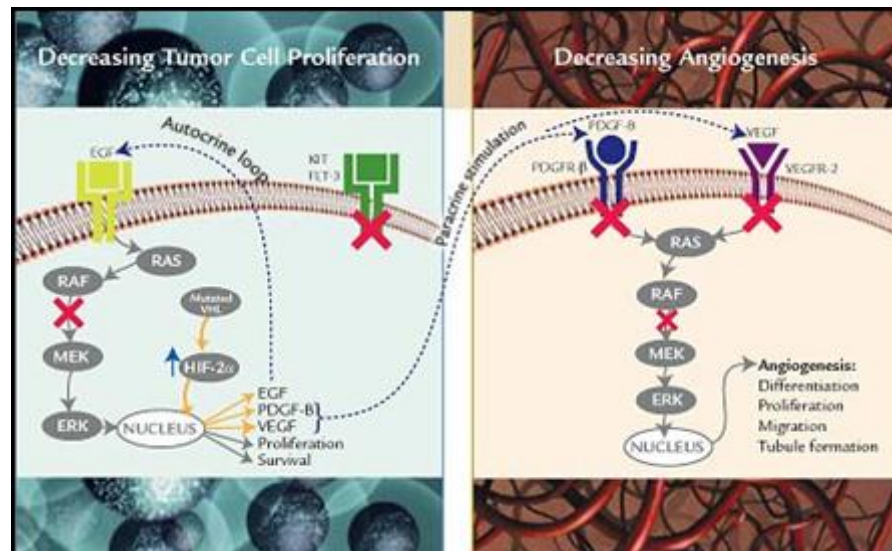
Risulta efficace in questo senso non solo bloccare l'azione dell'effettore mutato ma anche di eventuali trasduttori che agiscono a valle nella stessa via di segnalazione.

Questi farmaci sono generalmente piccole molecole che agiscono a livello intracellulare inibendo l'attività chinasi di effettori cellulari e possono avere target singoli come multipli per ovviare ai metodi di "escape" tumorale [55].

Tra questi inibitori rivestono un'importanza notevole quelli che possiedono BRAF mutato come target vista la sua elevata frequenza nei tumori tiroidei e la sua associazione con dedifferenziazione e resistenza al radioiodio. Inoltre dal momento che nella via delle MAP chinasi BRAF è a valle di RET e RAS, i suoi inibitori potrebbero essere efficaci anche nel rallentare la crescita tumorale in caso di mutazioni a livello di questi altri due effettori [27;32;54].

L'uso di questi farmaci promuove il recupero dell'espressione dei geni per il metabolismo dello iodio la espressione alterata dei quali appare in concomitanza all'acquisizione di mutazioni *BRAF* nel genoma della cellula [27].

Il Sorafenib (BAY 43-9006) è stato accettato dalla FDA per il trattamento del carcinoma renale avanzato e del carcinoma epatocellulare [27] ed è il primo inibitore di RAF ad essere entrato nella pratica clinica [41]. Il farmaco si lega al dominio chinasi di RAF inducendone l'inattivazione e provocando inibizione della crescita cellulare e induzione dell'apoptosi [42; Figura 25].



**Figura 25. Azioni terapeutiche del Sorafenib e relativi target molecolari.**

Sono stati successivamente sviluppati inibitori di RAF di seconda generazione con alta selettività per BRAF mutato. PLX4032 (R7204) ha un alto indice terapeutico e inibisce tutte e tre le isoforme RAF a concentrazioni nanomolari. Mentre è efficace nell'inibire la via delle MAP chinasi nelle cellule che presentano la mutazione BRAF p.V600E, il farmaco nelle cellule sane o con mutazioni a carico di RAS, oltre a fallire nell'inibire la segnalazione intracellulare, causa una paradossale stimolazione della fosforilazione di ERK. Quindi PLX4032 è indicato solo per il trattamento di tumori con BRAF mutato. È proprio la attivazione paradossale di ERK nelle cellule con BRAF wild-type a spiegare il suo principale effetto collaterale che consiste nello sviluppo di carcinomi cutanei [41].

Non esistono al momento inibitori specifici per le isoforme RAS che mostrino un'efficacia terapeutica significativa [41]. Ogni sforzo di sviluppare piccole molecole che impediscano l'interazione ad alta affinità tra la proteina e il GTP è risultato inutile [41]. Tuttavia l'utilizzo di inibitori multichinasici che colpiscano effettori a valle di esso risultano comunque efficaci nel bloccare la crescita dei tumori RAS mutati.

Un altro target terapeutico importante è MEK la cui inibizione risulta tollerabile ed efficace nei tumori portatori di mutazioni su BRAF e RAS [28].

CI-1040 agisce legandosi al sito di interazione con l'ATP e mantenendo quindi MEK non fosforilato in una conformazione inattiva. Sono sensibili al farmaco solo le cellule tumorali con la via delle MAP chinasi attivate [28] che mostrano inoltre un recupero dell'espressione della tireoglobulina e della pompa NIS [41;42;54].



AZD6244 è invece un inibitore allosterico di MEK ATP-non competitivo, è stato testato sul melanoma ma la sua efficacia non si è dimostrata maggiore a quella dei chemioterapici convenzionali **[41]**.

ZD6474 (Vandetanib) è un potente inibitore di vari recettori tirosin-chinasici tra cui VEGFR, EGFR e RET con tossicità minima e indice terapeutico notevole nei pazienti con MTC ereditario localmente invasivo o metastatico e con PTC alterato a livello di RET **[32;56]**. I pazienti hanno manifestato in risposta al farmaco stabilizzazione della malattia e parziale remissione oltre a una riduzione della calcitonina **[56]**. L'efficacia del farmaco è sicuramente legata non solo all'azione su RET ma anche al blocco dell'angiogenesi associata all'azione sugli altri target recettoriali. È stato inoltre dimostrato che alcune mutazioni di RET (p.V804L e p.V804M) conferiscono resistenza al farmaco **[32]**.

Motesanib difosfato e Sunitinib (SU11248) hanno target multipli tra cui VEGF, PDGFR, c-KIT e RET **[55]** e quindi oltre a bloccare la via delle MAP chinasi agiscono sull'angiogenesi anch'essi.

In futuro, l'identificazione di nuove alterazioni molecolari coinvolte nella carcinogenesi tiroidea e lo sviluppo di terapie mirate più specifiche ed efficaci permetteranno di trattare i pazienti in modo più appropriato e individualizzato **[27]**. Sarà fondamentale costruire nuovi inibitori con alto indice terapeutico che potranno essere somministrati in combinazione tra loro in modo da raggiungere la massima efficacia anti-tumorale **[32]**.

## II. SCOPO DELLA TESI

L'iter diagnostico per la diagnosi differenziale tra noduli tiroidei di natura maligna o benigna coinvolge esami anamnestici, ecografici e di medicina nucleare che tuttavia permettono soltanto di effettuare una valutazione della classe di rischio. L'esame determinante per la classificazione dei noduli tiroidei è rappresentato dall'analisi citologica del materiale agoaspirato (FNAB) che consente di ricavare dal campione bioptico informazioni citomorfologiche dirette e, pertanto, notevolmente affidabili. Nella maggior parte dei pazienti questa tecnica permette la diagnosi definitiva del tipo di patologia nodulare presente e consente di indirizzare il paziente verso la strategia terapeutica ottimale.

Tuttavia, pur essendo un metodo molto sensibile e accurato, l'indagine citologica risulta inconcludente in circa il 30% delle biopsie. Questa, infatti, può portare a risultati indeterminati oppure essere incapace di offrire un risultato a causa di materiale insufficiente o inadeguato. Mentre il grado di accuratezza della tecnica è elevato nella diagnosi di forme tumorali dalle caratteristiche citologiche ben distinguibili (PTC, UTC, MTC), altrettanto non si può affermare per le proliferazioni con pattern cellulare di tipo follicolare per le quali spesso risulta impossibile definire con certezza la natura del nodulo in base all'esame citologico. Questo limite, intrinseco della FNAB, determina la riunione di tutte le lesioni follicolari in una singola categoria estremamente eterogenea per il rischio di presenza di neoplasia. Infatti, la diagnosi definitiva per questa classe di noduli può essere spesso raggiunta solo in seguito all'esame istologico del materiale asportato chirurgicamente. L'efficacia e l'accuratezza diagnostica della tecnica dipendono, inoltre, non soltanto dal tipo di nodulo ma anche dalla qualità della conservazione del campione bioptico, dalla esperienza e capacità del medico che effettua l'aspirazione e dalla capacità del citopatologo nella interpretazione del preparato biologico.

L'identificazione e la introduzione di nuovi parametri in grado di coadiuvare la caratterizzazione del nodulo è, pertanto, fortemente auspicata.

Negli ultimi dieci anni la letteratura scientifica ha rivolto la sua attenzione verso l'utilizzo della biologia molecolare come metodo di analisi da affiancare alla citologia con lo scopo di incrementare l'accuratezza del risultato diagnostico fornito dal prelievo di materiale citologico del nodulo. Per i carcinomi della tiroide, come per molte altre forme tumorali, sono state ormai ampiamente descritte alterazioni genetiche che ricorrono frequentemente

durante il processo di trasformazione neoplastica e che rappresentano potenziali marcatori molecolari per la classificazione di noduli per i quali esiste un sospetto di malignità.

Il risultato di molti studi, su casistiche provenienti da diverse aree geografiche, dimostra come l'analisi molecolare di un pannello di alterazioni genetiche rappresenti un valido supporto per la diagnosi differenziale di noduli sospetti o indeterminati. L'individuazione di una mutazione a carico di un marcatore genetico rappresenta, infatti, un potente indicatore di malignità e la sua caratterizzazione può fornire un'informazione aggiuntiva in grado di supportare la scelta della terapia più appropriata.

Obiettivo principale del presente studio è stata l'ottimizzazione di un protocollo per l'analisi molecolare dei marcatori tumorali descritti in letteratura nel contesto dei carcinomi differenziati della tiroide. Il lavoro, che ha previsto l'allestimento di saggi molecolari per marcatori noti in letteratura, risponde alla necessità di introdurre tale indagine nel percorso assistenziale dei pazienti afferenti all'ambulatorio dell'Unità di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera Careggi. Secondo la revisione del 2009 delle Linee Guida della American Thyroid Association per la gestione dei noduli tiroidei e dei carcinomi differenziati della tiroide, infatti, *"l'uso di markers molecolari (BRAF, Ras, RET/PTC, Pax8-PPRgamma o galectina-3)"* è considerato un parametro che può essere preso in considerazione *"nel tentativo di migliorare la gestione clinica in pazienti con citologia indeterminata alla FNAC"*.

I principali aspetti considerati per la selezione dell'approccio metodologico da impiegare, al fine di fornire un sussidio diagnostico adeguato ed efficiente, sono stati: l'impiego di tecniche già consolidate presso il laboratorio dell'Unità di Biochimica Clinica del Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche; l'allestimento di saggi molecolari da eseguire in parallelo e con tempi di esecuzione e risposta sufficientemente rapidi oltre che sensibili e specifici; l'impiego di un campione biologico di semplice reperibilità la preparazione del quale, inoltre, non comportasse alcun aumento di invasività per i pazienti. La fattibilità dello studio molecolare sul materiale residuo dell'agoaspirato destinato alla citologia è stato, quindi, il principale obiettivo da raggiungere.

Il presente studio si è sviluppato nella ricerca delle mutazioni a carico dei geni *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* e dei riarrangiamenti *RET/PTC1*, *RET/PTC3* e *PAX8/PPARγ* (considerando entrambi i punti di rottura sull'esone 7 e 9 del gene *PAX8*) che rappresentano le alterazioni, secondo la letteratura, più frequenti nella carcinogenesi delle cellule follicolari tiroidee.

L'identificazione di una di queste alterazioni potrebbe, infatti, rappresentare un supporto per la valutazione e la gestione di pazienti affetti da patologie

nodulari tiroidee. Al fine di esplorare il significato della indagine molecolare i risultati ottenuti sono stati raffrontati con il dato dell'analisi citologica e, quando disponibile, con il risultato di riferimento fornito dall'esito dell'esame istologico.

### III. MATERIALI E METODI

#### 1 CAMPIONI CITOLOGICI DI AGOASPIRATO TIROIDEO

Il presente studio riporta l'analisi molecolare di una casistica complessiva di 430 campioni di materiale citologico prelevato da noduli tiroidei di pazienti in cura presso l'Unità di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera di Careggi. Da ogni paziente reclutato è stata raccolta la *Dichiarazione di consenso informato all'esecuzione di analisi molecolare su agoaspirato di noduli tiroidei* [Allegato 1] distribuita assieme all'*Informativa sull'esecuzione di analisi molecolare su agoaspirato di noduli tiroidei* [Allegato 2] e conservata insieme al *Consenso alla conservazione di materiale biologico per studi e ricerche* [Allegato 3].

Le biopsie dei noduli sono state ottenute da pazienti (346 femmine e 84 maschi, rapporto 4,1:1; età compresa tra 18 e 87 anni, media $\pm$ SD: 54,6 $\pm$ 13,3) sottoposti a agoaspirazione con ago sottile (FNAB) per sospetto di patologia neoplastica. La FNAB è stata eseguita su noduli con diametro superiore a 5mm (diametro maggiore dei noduli compreso tra 5-75mm, media $\pm$ SD: 22,7 $\pm$ 11,0) mediante l'uso di aghi di 21-23 gauge effettuando 5-6 passaggi e grazie all'ausilio della visualizzazione del nodulo ecoguidata. Ogni campione è stato classificato secondo la tecnica della citologia su strato sottile secondo le procedure impiegate presso l'ambulatorio e riportate in letteratura [57].

La raccolta dei campioni è iniziata nell'anno 2011 e si è consolidata nel corso dell'ultimo triennio. Il materiale agoaspirato è stato raccolto in 300 $\mu$ L di RNA $later^{\circledR}$  (Qiagen, Hilden, Germany), un preservante degli acidi nucleici, e mantenuto per 24h a 4°C, poi conservato a -80°C fino al momento dell'estrazione.

Inizialmente sono stati inviati presso il Laboratorio di Biochimica Clinica Ormonale e Molecolare 100 prelievi non selezionati, derivanti da sedute ambulatoriali consecutive, per svolgere un primo studio pilota. Questa iniziale casistica comprendeva 55 campioni di lavaggio e 45 coppie di campioni costituite da agoaspirati veri e propri, provenienti da un secondo prelievo effettuato a livello del nodulo del paziente, e il materiale residuo di lavaggio relativo al primo prelievo citologico, prelevato per essere inviato all'analisi citologica. L'analisi di questa iniziale casistica ha permesso di valutare la fattibilità dello studio sul materiale residuo di lavaggio e l'idoneità delle metodologie impiegate per l'analisi molecolare.

Per ogni campione di agoaspirato è stato in seguito raccolto il dato della analisi citologica e classificato in base alle 5 categorie diagnostiche (non diagnostico Tir-1, benigno Tir-2, lesione follicolare di significato indeterminato Tir-3, sospetto Tir-4 e maligno Tir-5). Quando disponibile, in caso di asportazione chirurgica del nodulo, è stato raccolto anche il dato istologico. Le frequenze della distribuzione dei campioni nelle diverse categorie sono riportate nella capitolo successivo dei *Risultati*.

### **3.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA PURIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI**

I campioni conservati in *RNAlater*<sup>®</sup> sono stati equilibrati a temperatura ambiente per circa 30 minuti. In seguito, sono stati sottoposti ad una centrifugazione alla massima velocità (13000 rpm) per 15 minuti in modo da separare il pellet contenente il materiale cellulare dal preservante degli acidi nucleici.

Dopo aver rimosso il surnatante, al pellet sono stati aggiunti 700µL del Buffer RLT del kit *RNeasy*<sup>®</sup> Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) per risospendere il materiale cellulare. Il preparato nel tampone di lisi è stato poi vortexato vigorosamente per favorirne l'omogenizzazione. Del lisato ottenuto 350µL sono stati utilizzati per la estrazione dell' RNA e l'altra parte per la purificazione del DNA seguendo i passaggi previsti nei due distinti protocolli.

#### **1.2 ESTRAZIONE DEL DNA**

L'estrazione del DNA da agoaspirati e lavaggi è stata effettuata con *QIAamp*<sup>®</sup> DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). È stato seguito il protocollo per l'estrazione da tessuto (Isolation of Genomic DNA from Tissues). Al lisato precedentemente ottenuto sono stati aggiunti i diversi buffer di lisi come previsto nel protocollo. L'incubazione prevista a 37°C è stata effettuata per 2h. L'eluizione finale è avvenuta in 40µl di Buffer AE. L'eluato finale è stato conservato a -20°.

#### **1.3 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE**

L'estrazione dell'RNA totale da agoaspirati e lavaggi è stata effettuata con *RNeasy*<sup>®</sup> Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). È stato seguito il protocollo per l'estrazione da tessuto (Purification of Total RNA from Animal and Human Tissues). L'eluizione finale è stata effettuata in 18µl di RNase-free water. L'eluato finale è stato conservato a -20° fino alla reazione di retrotrascrizione.

## 2 CONTROLLI POSITIVI E NEGATIVI PER L'ANALISI MOLECOLARE

Come controlli per l'analisi molecolare del DNA sono state impiegate linee cellulari a genotipo noto [Tabella 1].

**Tabella 1. Caratteristiche delle linee cellulari impiegate come campioni di controllo per l'analisi molecolare del DNA.**

LINEE CELLULARI	Tessuto d'origine	Gene mutato	Variante proteica	Variante nucleotidica
CCRF-CEM	Tessuto Linfoide	<i>KRAS</i>	p.G12D	c.35G>A
CCRF-CEM	Tessuto Linfoide	<i>HRAS</i>	p.A59A	c.177C>T
HT 1197	Tratto Urinario	<i>NRAS</i>	p.Q61R	c.182A>G
SK-MEL28	Cute	<i>BRAF</i>	p.V600E	c.1799T>A(omoz.)
MCF 7	Mammella		Controllo Wild-Type	

Per l'allestimento dei saggi in Real-Time PCR al fine di valutare la adeguatezza del campione biologico e per la ricerca dei riarrangiamenti cromosomici sono stati impiegati campioni di riferimento di diversa tipologia [Tabella 2].

**Tabella 2. Caratteristiche dei campioni di controllo per l'analisi molecolare dell'RNA.**

CAMPIONE	Tipologia	Caratteristica
TPC1	Linea cellulare di tessuto tiroideo	-Presenza del riarrangiamento <i>RET/PTC1</i> - Espressione del gene <i>GAPDH</i> -Espressione del gene della <i>Tireoglobulina</i>
PC3	Linea cellulare di tessuto prostatico	- Espressione del gene <i>GAPDH</i> -Assenza di espressione del gene della <i>Tireoglobulina</i>
Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies)	Pool di RNA proveniente da diverse linee cellulari	-Espressione del gene <i>GAPDH</i> -Espressione del gene della <i>Tireoglobulina</i>
Campioni linfocitari	RNA purificato da sangue periferico	- Espressione del gene <i>GAPDH</i> - Bassa espressione del gene della <i>Tireoglobulina</i>

## 2.1 ESTRAZIONE DI DNA E RNA DEI CAMPIONI DI CONTROLLO

L'estrazione del DNA dalle linee cellulari CCRF-CEM, HT 1197, SK-MEL 28 ed MCF 7 è stata effettuata mediante il QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo il protocollo dedicato (Protocol for Cultured Cells) .

Dalla linea cellulare TPC1, portatrice del riarrangiamento *RET/PTC1*, è stato invece estratto l'RNA totale mediante il RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). È stato seguito il protocollo per la purificazione da cellule umane (Purification of Total RNA from Animal and Human Cells) preceduto da una fase iniziale di lavaggio in PBS e centrifugazione a massima velocità. Mediante lo stesso protocollo sono stati purificati 8 campioni di RNA da linfociti di campioni di controllo per valutare la espressione della tireoglobulina nella componente ematica che rappresenta uno dei principali contaminanti dei campioni biotici da nodulo tiroideo.

## 2.2 VALUTAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il dosaggio della quantità di DNA ed RNA estratto è stato effettuato con lo spettrofotometro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo Scientific, Italia) in grado di dosare la concentrazione di acido nucleico in maniera accurata a partire da un ridotto volume di campione (1µl).

## 3 RICERCA DI MUTAZIONI PUNTIFORMI

Sul DNA estratto dal materiale agoaspirato è stata effettuata l'analisi molecolare per la ricerca di mutazioni somatiche. Le regioni investigate sono state *BRAF* codoni 600-601, *NRAS* e *HRAS* codone 61 e *KRAS* codoni 12-13 e 61.

### 3.1 PROTOCOLLO DI PCR

La reazione di PCR è stata effettuata in 20µl finali con le concentrazioni di reagenti Ampli Taq Gold<sup>®</sup> (Applied Biosystem, Monza, Italy) descritta in Tabella 3. La reazione di amplificazione è stata allestita in duplicato per ogni campione impiegando 2µL di purificato di DNA intero o, se necessario, alla concentrazione di 10ng/µL e su una diluizione (1:3) dello stesso campione in modo da ridurre il potenziale effetto di interferenti della reazione di PCR.



**Tabella 3.**

REAGENTI	Conc finale
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
dNTPs	500μM
Primer F	500nM
Primer R	500nM
TaqGold®	1U
Syto 9	1μM

In Tabella 4 sono riportati i set di primers utilizzati per l'amplificazione delle porzioni geniche contenenti i codoni di interesse di ognuno dei geni investigati.

**Tabella 4.**

GENE	PRIMER
<b><i>BRAF</i></b> codoni 600-601	F: 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3' R: 5'-CCACAAAATGGATCCAGACA-3'
<b><i>HRAS</i></b> codone 61	F: 5'-ATGGCAAACACACACAGGAA-3' R: 5'-GATTCCTACCGGAAGCAGGT-3'
<b><i>NRAS</i></b> codone 61	F: 5'-CCCCTTACCCTCCACACC-3' R: 5'-TGGCAAATACACAGAGGAAGC-3'
<b><i>KRAS</i></b> codoni 12-13	F: 5'-GTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGG-3' R: 5'-TTTACCTCTATTGTTGGATCATATTC-3'
<b><i>KRAS</i></b> codone 61	F: 5'-ACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG-3' R: 5'-ATGGCAAATACACAAAGAAAGC-3'

Il termociclature utilizzato per la reazione di PCR è stato il 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Monza, Italy) impostato sul profilo termico di seguito riportato, fatta eccezione per il gene *BRAF* utilizzato come riferimento per la valutazione della qualità dei campioni che è stato amplificato sullo strumento StepOne Plus fine di valutare le cinetiche di amplificazione grazie alla presenza dell'intercalante Syto9.

40 icli	95°	10 min
	95°	15 sec
	58°	15 sec
	72°	30 sec
	72°	20 min
	4°	∞

### 3.2 ANALISI DI PRE-SCREENING: HRMA (High Resolution Melting Analysis)

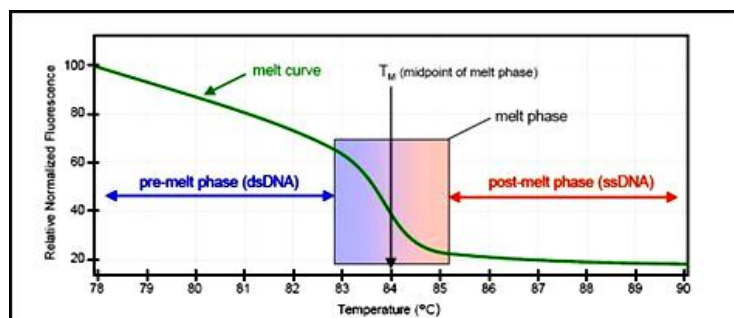
Il prodotto finale della reazione di PCR è stato sottoposto ad analisi del profilo di dissociazione mediante lo strumento Rotor Gene 6000 (Diatech, Jesi, Italy) impostato sul seguente profilo termico: 95° per 3 min, 40° per 3 min, innalzamento di temperatura graduale a step di 0.08°.

L'High resolution Melting (HRM) è una tecnica semplice e molto sensibile, utile per la rapida individuazione di variazioni nella sequenza del DNA, la quale sfrutta il processo di denaturazione del DNA indotto dall'innalzamento di temperatura.

L'amplicone durante la reazione di PCR viene incubato con un intercalante fluorescente del DNAd che emette solo se incorporato nella molecola di DNA a doppio filamento. Successivamente, senza subire nessun tipo di trattamento, l'amplicone viene sottoposto a un innalzamento della temperatura graduale favorendo il passaggio della molecola dallo stato double-strand allo stato single-strand. La denaturazione provoca la liberazione dell'intercalante con conseguente diminuzione dell'emissione di fluorescenza in relazione all'aumento della temperatura.

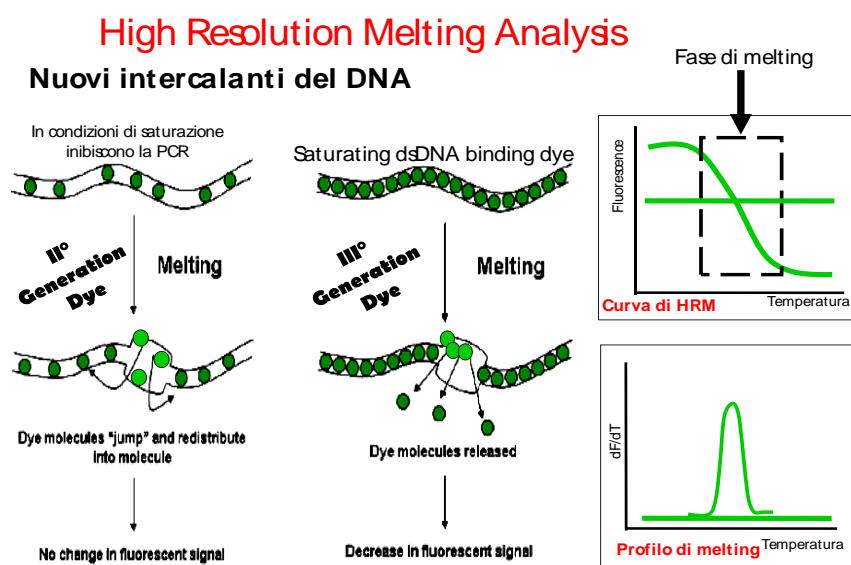
Questa metodica permette di analizzare il profilo di dissociazione (o di melting) dell'amplicone che è strettamente dipendente dalle caratteristiche della molecola di DNA in termini di lunghezza della sequenza, contenuto in GC, complementarietà intrasequenza.

Il software della macchina permette di ricavare la curva di melting specifica per l'amplicone mettendo in relazione l'intensità di fluorescenza emessa dal campione in funzione della temperatura. La curva consisterà in una sigmoide il cui punto di flesso corrisponderà alla  $T_M$  della molecola di DNA (temperatura alla quale il 50% delle molecole si trova nello stato denaturato) [Figura 26]. Il software è inoltre permette la visualizzazione del grafico della derivata che spesso consente una più facile visualizzazione della presenza di varianti all'interno della sequenza in esame.



**Figura 26. Caratteristiche della curva di melting elaborata tramite HRMA.**

Oggi viene utilizzata una nuova tipologia di intercalanti del DNA, chiamati di terza generazione (Syto<sup>®</sup>9, LC Green<sup>®</sup>), che hanno il vantaggio rispetto ai precedenti (Sybr<sup>®</sup> Green) di avere una bassa "tossicità" nei confronti della reazione di amplificazione e pertanto possono essere utilizzati in condizione di saturazione. L'utilizzo di quantità saturanti di intercalante ha il vantaggio di impedire il riposizionamento dell'intercalante nelle regioni non denaturate durante la fase di acquisizione del segnale che pertanto può essere considerato ad "alta fedeltà" [Figura 27]. Questo fenomeno potrebbe infatti nascondere le piccole differenze di profilo di melting di ampliconi che differiscono di 1 o poche basi limitando sensibilità e specificità della tecnica.



**Figura 27. Vantaggi degli intercalanti fluorescenti di terza generazione.**

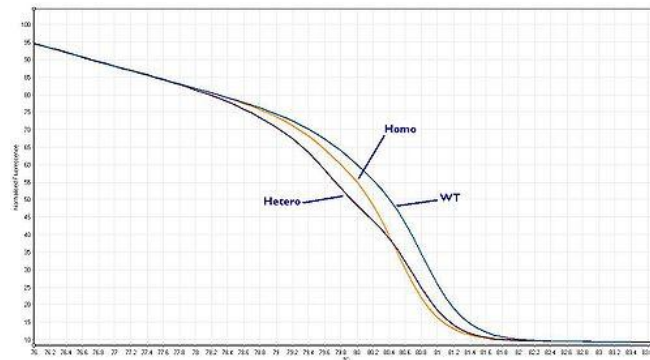
L'High Resolution Melting Analysis consente di individuare ampliconi che presentano variazioni nella sequenza nucleotidica anche di una sola base e grazie alla sua sensibilità riesce a rilevare la presenza di basse percentuali di DNA mutato che spesso possono essere di difficile interpretazione mediante il solo impiego del sequenziamento diretto.

Due ampliconi che differiscono nella sequenza presenteranno curve di melting differenti all'analisi HRM avendo un comportamento diverso di fronte all'innalzamento graduale di temperatura.

In caso di variante in omozigosi la curva di melting risulterà spostata rispetto a quella del DNA wild-type di riferimento, verso destra o verso sinistra a seconda che la mutazione aumenti o diminuisca il contenuto in GC e quindi la temperatura di melting.

La metodica risulta più appropriata per la ricerca di mutazioni in eterozigosi che provocano un cambiamento nella forma della curva di melting

conseguente alla formazione anche di eteroduplex, molecole di DNA costituite da un filamento wild-type e uno mutato. L'eteroduplex ha infatti la caratteristica di dissociarsi prima dell'omoduplex perché meno stabile e quindi la curva presenterà due diversi punti di flesso [Figura 28].



**Figura 28.** Esempio di curve di melting prodotte dalla analisi di campioni con genotipo omozigote wild-type, omozigote mutato ed eterozigote.

### 5.3 SEQUENZIAMENTO

Il prodotto di PCR è stato purificato mediante QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e successivamente sottoposto alla reazione di marcatura con BigDye® Terminator (Applied Biosystem, Monza, Italy) in 20µl finali seguendo il protocollo in **Tabella 5**.

**Tabella 5.**

REAGENTI	Volume (µl)
Buffer 5X	3,5
BigDye®	1
Primer 1µM	3,2
Purificato	2-3

Il prodotto di marcatura è stato purificato con DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Un volume di 5µl di purificato del prodotto di marcatura è stato preparato con 10µl di Formammide e sottoposto a sequenziamento diretto mediante lo strumento ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Monza, Italy).

## 4 RICERCA DI RIARRANGIAMENTI GENOMICI

L'analisi molecolare per la ricerca dei riarrangiamenti *RET/PTC1*, *RET/PTC3* e *PAX8(ex7)/PPAR $\gamma$* , *PAX8(ex9)/PPAR $\gamma$*  è stata effettuata su cDNA, retrotrascritto a partire da RNA purificato dal materiale agoaspirato.

### 4.1 PROTOCOLLO DI RETROTRASCRIZIONE

L'RNA estratto è stato sottoposto a retrotrascrizione con le concentrazioni di reagenti TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem, Monza, Italy) descritte in Tabella 6. Per la reazione è stato utilizzato l'intero volume di eluito durante l'estrazione (14 $\mu$ l) in un volume finale di 40 $\mu$ l.

**Tabella 6.**

REAGENTI	Conc finale
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	5,5mM
dNTPs	2mM
Esameri Random	1,25 $\mu$ M
RNase Inhibitor	16U
Multi Scribe <sup>™</sup>	50U

Il termociclatore utilizzato per la reazione di retrotrascrizione è stato il 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Monza, Italy) impostato sul seguente profilo termico: 25°C per 10 min; 48°C per 30 min; 93°C per 3 min.

### 4.2 REAL-TIME PCR

Per la PCR Real-Time sono state utilizzate sonde TaqMan MGB Probe (Applied Biosystem, Monza, Italy) specifiche per ogni riarrangiamento [Tabella 7] e primers [Tabella 8] in grado di generare un amplificato solo in presenza del riarrangiamento.

**Tabella 7.**

GENE di FUSIONE	FLUOROCROMO	SEQUENZA SONDA
<i>RET/PTC1</i>	FAM	5'-AACCGCGACCTGCGCAAAGC-3'
<i>RET/PTC3</i>	FAM	5'-ACCCAGCACCGACCCCCAGG-3'
<i>PAX8/PPAR<math>\gamma</math></i>	FAM	5'-CATGGTTGACACAGAGAT-3'

**Tabella 8.**

GENE di FUSIONE	PRIMER FORWARD
<i>RET/PTC1</i>	F: 5'-GGAGACCTACAAACTGAAGTGCAA-3' R: 5'-CCCTTCTCCTAGAGTTTTTCCAAGA-3'
<i>RET/PTC3</i>	F: 5'-CCAGTGGTTATCAAGCTCCTTACA-3' R: 5'-GGGAATTCCCACCTTTGGATCCTC-3'
<i>PAX8(ex7)/PPAR<math>\gamma</math></i>	F: 5'-AACCTCTCGACTCACCAGACCTA-3' R: 5'-GTTGGTGGGCCAGAATGG-3'
<i>PAX8(ex9)/PPAR<math>\gamma</math></i>	F: 5'-CGGACAGGGCAGCTATGC-3' R: 5'-GTTGGTGGGCCAGAATGG-3'

Come gene per la valutazione della presenza di RNA è stato utilizzato il gene housekeeping *GAPDH* amplificato con TaqMan<sup>®</sup> GAPDH Control Reagents – Human (Applied Biosystem, Monza, Italy). L'amplificato riconosciuto dal kit è di 122 bp e la sonda è marcata col fluorocromo VIC.

È stata, inoltre, valutata la espressione del gene della Tireoglobulina, gene tessuto-specifico, come ulteriore controllo per determinare la appropriatezza del materiale biologico raccolto, ossia la presenza di materiale tiroideo nel campione di partenza.

Per la miscela di amplificazione sono stati utilizzati 2,5 $\mu$ l di cDNA con le concentrazioni di reagenti (Applied Biosystem, Monza, Italy) in un volume finale di 12,5 $\mu$ l descritte in Tabella 9 e Tabella 10. Ogni reazione è stata effettuata in duplicato.

**Tabella 9.**

REAZIONE per GAPDH e TG	Volume ( $\mu$ l)
QuantiTect <sup>®</sup> Probe PCR Master Mix 2X	6,25
TaqMan <sup>®</sup> GAPDH Control Reagents	0,625
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays, Hs00794359_m1, NM_003235.4	0,625

**Tabella 10.**

REAZIONE per RIARRANGIAMENTI	Volume ( $\mu$ l)
QuantiTect <sup>®</sup> Probe PCR Master Mix 2X	6,25
Primer F 10X	0,5
Primer R 10X	0,5
Probe 10X	0.25

La reazione di Real-Time PCR è stata effettuata mediante lo strumento 7900HT Fast Real Time PCR System impostato sul seguente profilo termico:

	50°	2 min
	95°	15 min
	95°	15 sec
45 cicli	60°	1 min

A seguito della individuazione di campioni di controllo le sonde sequenza specifiche per la rilevazione della presenza di riarrangiamenti cromosomici sono state sostituite dall'impiego dello stesso intercalante fluorescente (Syto9) utilizzato per l'analisi HRMA. Al termine della reazione di amplificazione la specificità delle curve di amplificazione è stata determinata mediante l'analisi di melting dei prodotti di amplificazione in una finestra di temperatura tra 65 e 95°C.

## 5 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il programma IBM SPSS Statistic 20. I test statistici impiegati sono stati: il t-test per il confronto tra medie; il test del  $X^2$  di Pearson e il test esatto di Fisher per valutare la significatività delle distribuzioni. La significatività statistica è stata definita quando  $p < 0,05$ .

## IV. RISULTATI

### 1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ANALISI MOLECOLARE PER LA RICERCA DELLE VARIANTI GENETICHE COINVOLTE NEL CARCINOMA TIROIDEO

La fase iniziale del nostro lavoro è consistita nell'ottimizzazione di un protocollo di screening molecolare specifico e sensibile che potesse affiancarsi all'analisi citologica aumentandone l'accuratezza diagnostica.

#### 6.1 SCELTA DELLE LINEE CELLULARI

Sono state selezionate linee cellulari portatrici di alterazioni a carico dei geni oggetto della nostra indagine molecolare che potessero essere impiegate come campioni di riferimento per le fasi di ottimizzazione dei protocolli e come campioni di controllo durante lo screening genetico della casistica raccolta.

In particolare sono state selezionate la linea CCRF-CEM portatrice della mutazione missenso p.G12D in *KRAS* e della silente p.A59A nel gene *HRAS*, la linea HT1197 per la presenza della sostituzione p.Q61R in *NRAS* e, infine, la linea SK-MEL28 caratterizzata dalla presenza della mutazione p.V600E in *BRAF*.

Per tutte le linee cellulari impiegate nello studio è stata verificata la presenza della sostituzione riportata in letteratura (COSMIC Cancer Cell Lines Project: [http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell\\_lines/](http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/)). Tutte le linee sono risultate mutate in eterozigosi ad eccezione delle SK-MEL28 che sono, infatti, portatrici della mutazione p.V600E nel gene *BRAF* in omozigosi. Un campione eterozigote è stato ricostituito in maniera artificiale mescolando il DNA mutato in rapporto noto con quello estratto dalla linea MCF-7, linea wild-type per ogni gene del nostro pannello e impiegata come controllo negativo.

Per quanto riguarda l'analisi dei riarrangiamenti cromosomici sono stati utilizzati come controllo di qualità delle fasi di retrotrascrizione e amplificazione un campione di RNA estratto da PC3 (positivo per l'espressione di *GAPDH* ma non per la Tireoglobulina) e come controlli positivi un campione estratto dalla linea cellulare TPC1, portatrice del gene di fusione *RET/PTC1* e un campione della casistica risultato subito positivo per *RET/PTC3*. Per il gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$*  non erano disponibili campioni di riferimento e sono, quindi, state impiegate le condizioni di reazione già riportate nel lavoro di Nikiforov *et al.* [11].



## 6.2 ALLESTIMENTO E OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI PCR

I primers per l'amplificazione delle regioni di interesse nei geni inseriti nel pannello di marcatori molecolari da analizzare sono stati disegnati tramite il programma Primer3 (v. 0.4.0) impostando come condizioni generali la dimensione dell'amplicone tra 150 e 200bp e una temperatura di annealing dei primers tra 58 e 60°C. La dimensione dell'amplicato è, infatti, un parametro in grado di influenzare l'efficienza della reazione di PCR e, in particolare, la risoluzione e la sensibilità della successiva analisi HRM. Inoltre la necessità di ottimizzare set di primers con temperature di annealing omogenee ha permesso di utilizzare condizioni di amplificazione che valessero per i saggi di tutti i marcatori in modo da poter allestire le reazioni di amplificazione in parallelo. La posizione del codone di interesse è stata inoltre mantenuta il più possibile centralmente all'interno della sequenza amplificata al fine di ottimizzare la capacità di rilevamento da parte della tecnica di screening HRM.

La specificità dei primers è stata testata mediante l'uso del software In-Silico PCR (USCS Genome Bioinformatics) che calcola le regioni del genoma riconosciute dal set di primers o, in caso di oligonucleotidi specifici, permette la visualizzazione solo del frammento di interesse, la sua dimensione e localizzazione [Figura 32].

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links: Home, Genomes, Blat, Tables, Gene Sorter, Session, FAQ, Help. Below this, the title "UCSC In-Silico PCR" is displayed. The main content area shows a sequence alignment for a 162bp region on chromosome 1 (chr1:115256461-115256622). The sequence is: CCCCTTACCCTCCACACC TGGCAAATACACAGGGAAGC. Below the sequence, the primer melting temperatures are listed: Forward: 60.2 C ccccttaccctccacacc and Reverse: 60.3 C tggcaaatacacagaggaagc. A note states: "The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3."

**Figura 32. Analisi della specificità della coppia di primer per la porzione genica di interesse di NRAS con il software In-Silico PCR. Il software identifica come regione amplificata dai primers solo la porzione genica di interesse dimostrando la specificità dei primers selezionati dal programma Primer3.**

La sequenza di ogni frammento è stata, inoltre, analizzata mediante il programma BLAT Search Genome per valutare la presenza di eventuali sequenze omologhe nel genoma [Figura 33] che, in caso di alta omologia, avrebbero potuto interferire con l'indagine molecolare.

Human BLAT Results											
BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	162	1	162	162	100.0%	1	-	115256461	115256622	162
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	23	1	25	162	96.0%	X	+	5850177	5850201	25
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	23	80	103	162	100.0%	20	+	56918834	56918858	25
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	21	80	100	162	100.0%	4	-	46726238	46726258	21
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	21	80	100	162	100.0%	7	+	6431615	6431635	21
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	20	28	47	162	100.0%	7	+	82570873	82570892	20

**Figura 33. Ricerca di sequenze omologhe alla porzione genica di interesse di NRAS mediante il programma BLAT Search Genome. Secondo il programma esistono nel genoma alcune sequenze con un'omologia solo parziale alla porzione genica di NRAS fornita che non dovrebbero interferire durante la reazione di PCR generando aspecifici.**

L'assenza di polimorfismi (SNPs) interni alla regione dei primer è stata verificata mediante l'uso del software SNP Check3 (<https://ngl.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm>) e una valutazione in silico delle caratteristiche di melting degli ampliconi disegnati è stata effettuata mediante l'impiego del software Melting Curve Predictions Software uMelt (<https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>) al fine di escludere la presenza di più di un dominio di melting nella sequenza in esame.

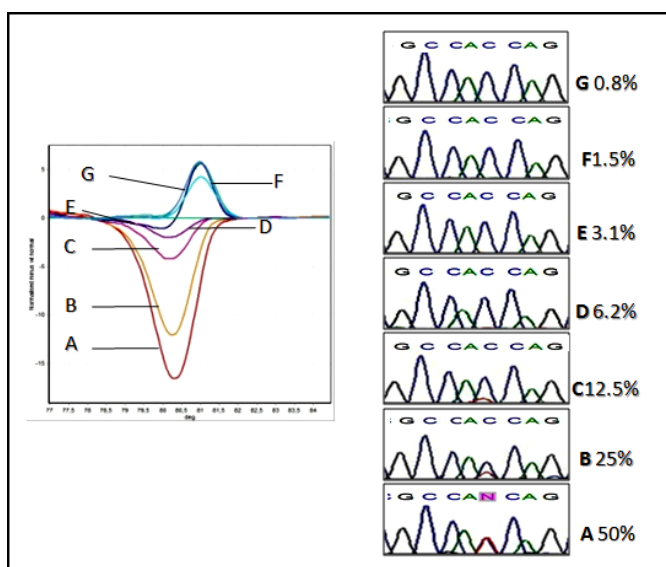
Le condizioni ottimali di PCR per ogni coppia di primers sono state comunque valutate empiricamente mediante saggi di amplificazione del DNA delle linee cellulari selezionate valutando diverse temperature di annealing (da 57 a 60°C) ed effettuando una curva con diverse concentrazioni di MgCl<sub>2</sub> per ogni gene studiato.

### 1.3 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' DELL' HRMA

Come metodo di screening per la ricerca di mutazioni somatiche a carico dei geni oggetti di studio è stata scelta l'HRMA High Resolution Melting Analysis (HRMA) per la sua elevata sensibilità che si associa a tempi di analisi rapidi, bassi costi e affidabilità. La sensibilità della tecnica è stata valutata mediante l'impiego di campioni ottenuti dalla diluizione seriale del DNA mutato, estratto dalle linee cellulari scelte per il nostro studio, in DNA wild-type.

In Figura 34 è riportato il grafico differenziale rispetto ad un campione wild-type dell'analisi HRM del test di diluizione effettuato per la linea CCRF-CEM. Il grafico mostra chiaramente come l'HRMA permetta di individuare la presenza di DNA mutato anche in bassa percentuale rispetto al DNA wild-type; in questo caso il limite di detection è del 3.1%. Diversamente tecniche come il sequenziamento, che comunque resta il metodo di riferimento per l'individuazione e la caratterizzazione di mutazioni, presentano un limite di

detection per la variante meno rappresentata nel campione più alto e quindi una minore sensibilità.



**Figura 34. A sinistra è rappresentato il grafico differenziale dell'analisi HRM del DNA della linea cellulare CCRF-CEM sottoposto a diluizioni seriali in DNA wild-type. A destra sono presenti i risultati del sequenziamento diretto dei campioni del test di diluizione per la regione dei codoni 12-13 del gene *KRAS*, in particolare per la variante p.G12D.**

L'High Resolution Melting Analysis, considerato il possibile effetto di diluizione a cui può essere soggetto il DNA mutato da parte del DNA wild-type in campioni citologici, rappresenta per la sua sensibilità una metodica indicata per l'individuazione di mutazioni somatiche e per questo adeguata al tipo di analisi previste nello studio. L'analisi HRM è stata, inoltre, selezionata come test di pre-screening poiché rappresenta un metodo omogeneo che non prevede la manipolazione del campione a seguito della amplificazione prima della analisi, riducendo così eventuali rischi di contaminazione.

#### **1.4 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ANALISI MOLECOLARE MEDIANTE HRMA E SEQUENZIAMENTO DIRETTO PER LO STUDIO DELLE MUTAZIONI PUNTIFORMI**

Il DNA estratto dalle linee cellulari è stato sottoposto ad amplificazione in PCR e a successiva analisi HRM rendendo possibile l'individuazione del profilo termico ottimale per i test molecolari da allestire sui campioni di materiale agoaspirato dai noduli tiroidei.

Gli ampliconi sono stati sottoposti a una fase di denaturazione e successiva rinaturazione per favorire la formazione di molecole eteroduplici. Successivamente sono stati sottoposti ad un'innalzamento graduale di temperatura ad ampio spettro (70°-95°) per individuare il range di

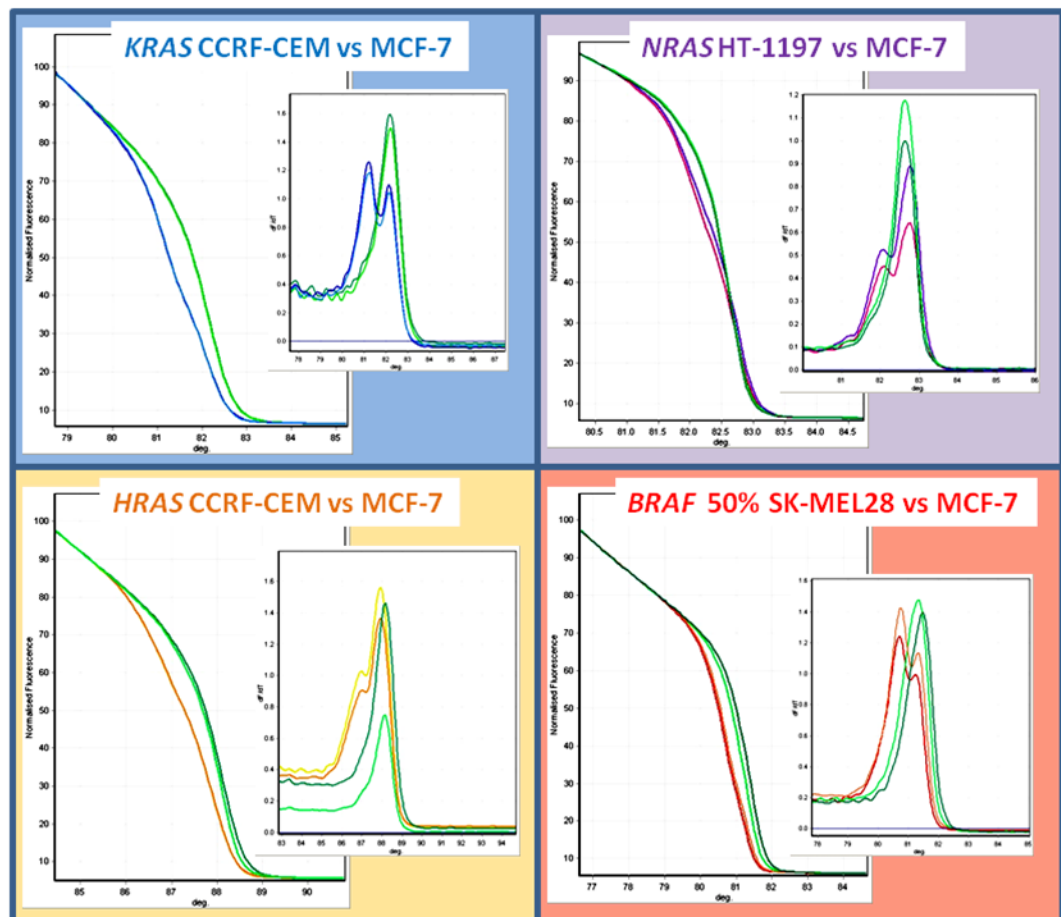
temperatura attorno al quale cadesse la  $T_M$  (corrispondente al punto di flesso della curva di melting sigmoidale).

Questo ha permesso di identificare un intervallo ristretto di temperatura da poter utilizzare durante lo screening molecolare dei campioni riducendo il tempo di attesa dei risultati. È stata, inoltre, definita la migliore risoluzione degli eterozigoti in base alla frequenza di acquisizione dei segnali di fluorescenza durante la fase di salita della temperatura.

Le finestre di melting selezionate per l'analisi dei diversi geni sono state le seguenti:

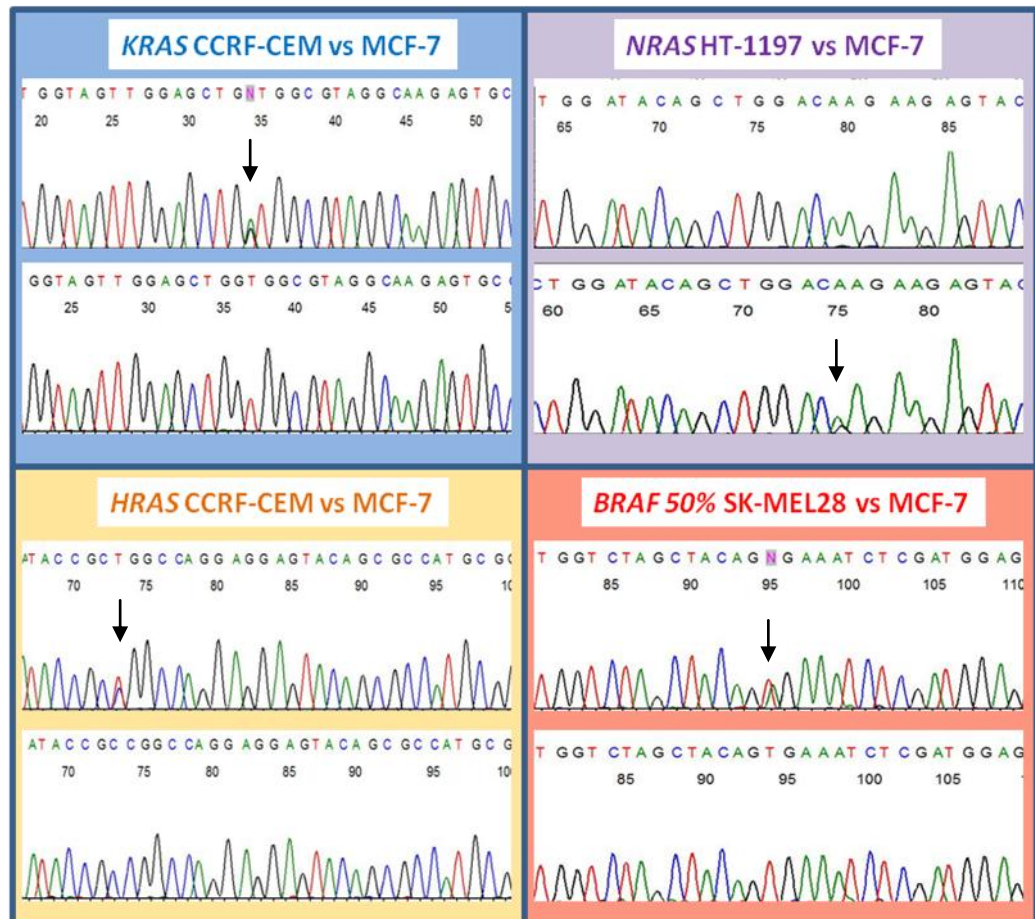
<i>BRAF</i> cod600/1	75-86°
<i>HRAS</i> cod61	79-95°
<i>NRAS</i> cod61	77-88°
<i>KRAS</i> cod61	77-88°
<i>KRAS</i> cod12/13	75-86°

L'analisi HRM delle linee cellulari ha permesso, inoltre, di confermare la presenza delle specifiche modificazioni di sequenza di cui esse erano portatrici oltre che l'individuazione del profilo atteso per un campione portatore di una mutazione a carico dello specifico gene [Figura 35]. Il profilo di melting ha, infine, dimostrato che i saggi disegnati per la reazione di PCR sono in grado di amplificare i campioni in modo efficiente e specifico. Infatti, nonostante la metodica non sia assolutamente quantitativa, è corretto affermare che il segnale di fluorescenza è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR e direttamente influenzato da aspetti quali la qualità del campione di partenza e l'efficienza della reazione. L'analisi di melt è inoltre uno strumento validissimo per la visualizzazione di eventuali aspecifici di reazione.



**Figura 35. Confronto delle curve di melt delle linee cellulari selezionate per il nostro studio con quella della linea wild-type di riferimento, MCF7. Le linee CCRF-CEM, HT-1197 e SK-MEL28 presentano un doppio picco associato alla presenza di una alterazione in eterozigosi nella sequenza mentre MCF7 presenta un unico picco associato al genotipo wild-type.**

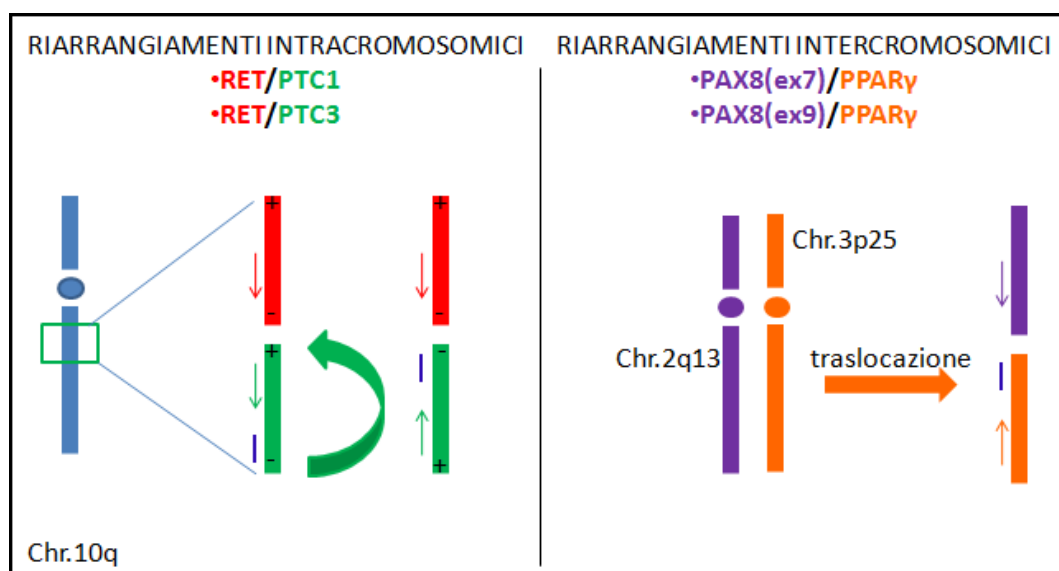
Dopo aver analizzato le curve di melting, il DNA delle linee cellulari è stato sottoposto a marcatura e sequenziamento per accertare la presenza delle relative mutazioni individuate all'HRM e ottimizzare il protocollo di marcatura per l'analisi mediante sequenziamento diretto dei campioni [Figura 36].



**Figura 36.** Caratterizzazione delle mutazioni delle linee cellulari selezionate per il nostro studio mediante sequenziamento diretto. Tali alterazioni sono assenti nella sequenza della linea MCF7 wild-type.

### 1.5 ALLESTIMENTO DELL'ANALISI MOLECOLARE PER LO STUDIO DEI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI

Per lo studio dei riarrangiamenti genomici è stato impiegato l'approccio metodologico e le condizioni riportate nel lavoro di Nikiforov *et al.* del 2009 [11]. La valutazione è stata condotta mediante l'utilizzo di primer e sonde specifici per le porzioni geniche coinvolte nei riarrangiamenti *RET/PTC1*, *RET/PTC3* e *PAX8/PPAR $\gamma$* . I primer selezionati sono capaci di dare amplificazione solo nel caso in cui il gene di fusione è presente: solo in presenza del riarrangiamento (inversione o traslocazione) infatti la reazione di amplificazione viene innescata [Figura 37].



**Figura 37. Rappresentazione grafica del funzionamento dei primer utilizzati nel lavoro di Nikiforov *et al.* capaci di generare un amplicone solo in presenza dei riarrangiamenti *RET/PTC* e *PAX8/PPAR $\gamma$* .**

La Real Time RT-PCR non è stata quindi utilizzata per valutazioni quantitative ma in semplici termini qualitativi per individuare l'eventuale presenza dei riarrangiamenti investigati.

L'amplificazione dei campioni con primers e sonda per i riarrangiamenti è stata effettuata in parallelo all'analisi del gene *GAPDH*, un gene ubiquitariamente espresso, usato come riferimento per valutare la qualità e la quantità dei campioni di cDNA retrotrascritti dopo l'estrazione dell'RNA. In caso di assenza del segnale di amplificazione di *GAPDH*, indice di scarsa qualità del campione di partenza, il risultato dato dall'analisi dei riarrangiamenti è stato considerato non attendibile e pertanto non valutabile.

## **2 STUDIO DI VALIDAZIONE: CONFRONTO TRA L'ANALISI MOLECOLARE SUL MATERIALE DA AGOASPIRATO E DA LAVAGGIO**

L'allestimento di test molecolari per l'approfondimento diagnostico sul materiale agoaspirato di un nodulo tiroideo renderebbe necessario sottoporre il paziente due volte all'agobiopsia la quale resta, se pur minimamente, una metodica invasiva.

Nel presente lavoro è stata valutata la fattibilità di tale indagine su campioni ottenuti dal lavaggio dell'ago ossia sul materiale citologico residuo sull'ago dopo la preparazione del campione destinato alla analisi citologica, essendo

esso considerato di più semplice reperibilità rispetto ad un secondo prelievo dedicato alla sola indagine molecolare.

Per la valutazione iniziale dei metodi previsti nello studio è stata, quindi, raccolta una casistica iniziale composta da 100 campioni dei quali per 45 era disponibile sia un campione citologico vero e proprio, derivante da una seconda biopsia a livello dello stesso nodulo, sia il lavaggio del materiale residuo del primo agoaspirato inviato all'Anatomia Patologica per l'analisi citologica.

L'obiettivo principale è stato rappresentato dalla dimostrazione della possibilità di impiego del campione di lavaggio per l'analisi molecolare, aspetto che ha permesso di eliminare una ulteriore procedura invasiva per i pazienti comunque indirizzati alla citodiagnosi.

I campioni impiegati in questa fase sono stati raccolti consecutivamente in diverse sedute ambulatoriali mediante la procedura descritta in precedenza nella sezione materiali e metodi. L'analisi dei campioni ha previsto, inoltre, la valutazione della idoneità dei metodi analitici selezionati per il tipo di indagini da effettuare, ovvero la capacità di rilevamento delle alterazioni genetiche selezionate nello studio su campioni reali. L'analisi molecolare dei campioni è stata effettuata in cieco e soltanto successivamente il dato molecolare è stato confrontato con il responso citologico. Dalla analisi dei primi risultati è stato possibile effettuare una iniziale valutazione della validità dei saggi molecolari proposti come sussidio alla diagnosi citologica.

## **2.1 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE DEL GENE *GAPDH* SUL CAMPIONE DI RNA**

La valutazione dell'amplificazione del gene *GAPDH* in campioni di cDNA retrotrascritto a partire dall'RNA estratto da entrambe le tipologie di campione è stata indispensabile al fine di comprendere la possibilità di impiegare come fonte di materiale di partenza il materiale residuo o campione di lavaggio. Spesso, infatti, i campioni di RNA sono risultati non dosabili allo spettrofotometro e la resa dell'estrazione non è risultata un parametro sufficiente per sostenere la fattibilità dell'analisi sui campioni derivanti dal lavaggio. In seguito alla reazione di retrotrascrizione dell'intero campione di RNA, 2.5µL di cDNA per reazione sono stati amplificati in duplicato per il gene di riferimento *GAPDH* al fine di monitorare il successo sia della fase di estrazione che della fase di retrotrascrizione. Sulla base dei Ct ottenuti dalla popolazione dei campioni di agoaspirati e di lavaggi è stato, inoltre, definito un primo criterio di valutazione della qualità dell'acido nucleico per stimare la



appropriatezza dei lavaggi come fonte alternativa di materiale biologico da sottoporre alla indagine molecolare.

La media dei valori dei Ct per i due gruppi sono riportati in tabella 11.

**Tabella 11.**

Ct <sub>GAPDH</sub>	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Agoaspirati	45	22,64	34,47	27,4679	2,73517
Lavaggi	45	21,64	44,36	29,5745	4,48285

La qualità dei campioni (45 coppie formate da agoaspirato e lavaggio, 55 lavaggi) appartenenti allo studio di validazione è stata pertanto classificata sulla base del Ct ottenuto nel saggio di amplificazione del gene *GAPDH* seguendo i parametri riportati in tabella 12.

**Tabella 12.**

Classificazione	Ct	GAPDH Range C <sub>t</sub>	N agoaspirati coppie	N lavaggi coppie	N lavaggi
Qualità ottima	Inferiore a: Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )-SD	≤25	7	4	5
Qualità buona	Compreso tra: Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )-SD e Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )+SD	25<Ct≤33	36	34	67
Qualità sufficiente	Compreso tra: Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )+SD e Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )+2SD	33<Ct≤38	2	6	27
Qualità inadeguata	Superiore a: Mean (Ct <sub>Lavaggi</sub> )+2SD	>38	0	1	1
<b>Totale</b>			45	45	100

È stato possibile osservare che solo un campione è risultato inadeguato per l'analisi mentre un'elevata quota dei campioni possiede una qualità appropriata per lo studio. La distribuzione dei campioni componenti le coppie nelle diverse classi non è risultata statisticamente significativa tra agoaspirati e lavaggi ( $X^2=3,875$ ;  $p=0,275$ ), confermando la possibilità di allestire l'analisi molecolare sul materiale residuo dell'agoaspirato destinato alla citodiagnosi.

## 2.2 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: ESPRESSIONE DEL GENE DELLA TIREOGLOBULINA SUL CAMPIONE DI RNA

Per la valutazione della espressione del gene della Tireoglobulina (NM\_003235) è stato selezionato il saggio fornito dalla ditta Life Technologies TaqMan® Gene Expression Assays, Hs00794359\_m1, NM\_003235.4.

La specificità del saggio verso il trascritto è stata verificata mediante la assenza di cross-reazione in presenza di campioni di DNA provenienti da 4 linee cellulari (SK-MEL28, HT1197, MCF-7, CCRF-CEM) e da 4 campioni di DNA genomico estratto da linfociti.

L'espressione del gene è stata valutata, invece, in una serie di linee cellulari a disposizione in laboratorio al fine di selezionare una linea positiva per l'espressione del gene e una linea negativa da poter impiegare come campioni di controllo in ogni saggio dello studio. In particolare, è stato utilizzato nelle successive analisi come controllo positivo l'RNA dalla linea cellulare umana di carcinoma papillare tiroideo TPC1 e la linea cellulare umana di carcinoma prostatico come controllo negativo.

In ogni saggio è stato, inoltre, inserito come calibratore per la normalizzazione dei risultati un campione di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione di Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies) il quale ha dimostrato possedere ottime caratteristiche di stabilità.

La valutazione della adeguatezza dei campioni citologici prima della analisi molecolare è stata effettuata mediante lo studio della espressione relativa del gene tessuto-specifico della Tireoglobulina rispetto al gene di riferimento *GAPDH*.

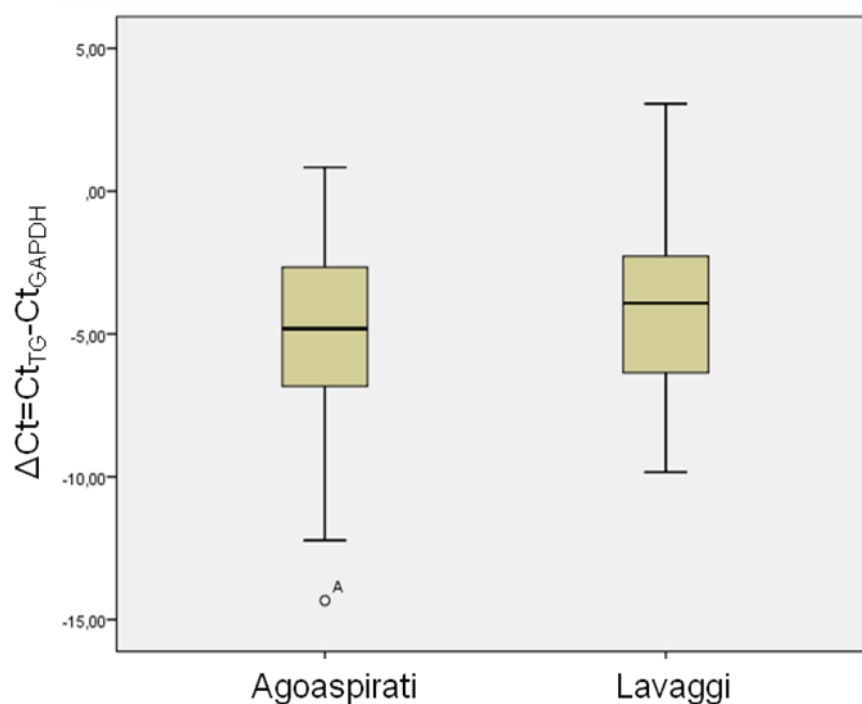
I valori di  $\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$ , normalizzati per il valore del calibratore, derivanti dai saggi effettuati sui campioni di agoaspirato e di lavaggio (Tabella 12 a), sono stati fra loro confrontati e la differenza tra le medie non è risultata statisticamente significativa (Tabella 12 b), indicando il campione di lavaggio come un campione paragonabile al citologico vero e proprio ai fini della indagine molecolare.

**Tabella 12 a. Statistiche descrittive  $\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$  campioni agoaspirati e lavaggi.**

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Agoaspirati	45	-12,23	,84	-4,5948	3,04168
Lavaggi	45	-9,84	3,06	-4,2212	3,35663

**Tabella 12 b. Test t di differenza delle medie per campioni appaiati (agoaspirati vs. lavaggi).**

$\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$	Differenze a coppie					t	df	Sig. (2-code)
	Media	Deviazione std.	Errore std. Media	Intervallo di confidenza per la differenza al 95%				
				Inferiore	Superiore			
<b>Agoaspirati vs. Lavaggi</b>	-,37355	3,55512	,56928	-1,52599	,77889	-,656	44	,516



Essendo noto che la maggior fonte di contaminazione nei campioni citologici da noduli tiroidei proviene da componente ematica, sono stati testati 8 campioni di RNA isolato da linfociti di soggetti sani ed è stato stimato il valore di  $\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$  per ognuno dei campioni. Ogni saggio è stato effettuato in triplicato in due diverse sedute di amplificazione.

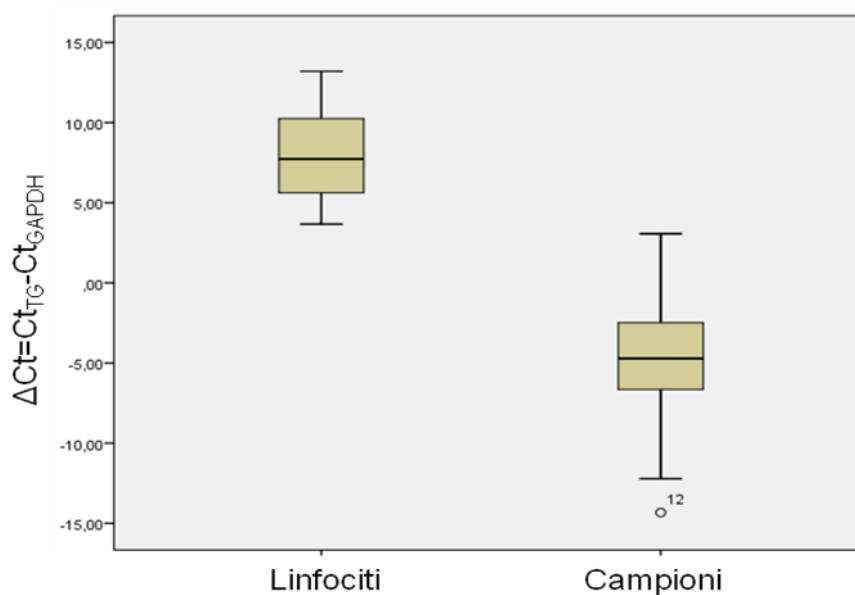
Il confronto tra i valori ottenuti sui campioni da nodulo tiroideo (agoaspirati e lavaggi) e da linfociti sono stati confrontati per valutare statisticamente la differenza nella espressione del marcatore della Tireoglobulina nei due tipi di materiale biologico. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 13 a e 13b.

**Tabella 13 a. Statistiche descrittive  $\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$  campioni e linfociti.**

	N	Media	Deviazione std.	Errore std. Media
Campioni (Agoaspirati e Lavaggi)	90	-4,5914	3,30289	,36254
Linfociti	8	8,0089	3,47167	1,22742

**Tabella 13 b. Test t di uguaglianza delle medie per campioni non appaiati (campioni vs. linfociti).**

t	df	Sig. (2-code)	Differenza fra medie	Differenza errore standard	Intervallo di confidenza per la differenza al 95%	
					Inferiore	Superiore
-10,263	97	,000	-12,60026	1,22776	-15,0398	-10,1607

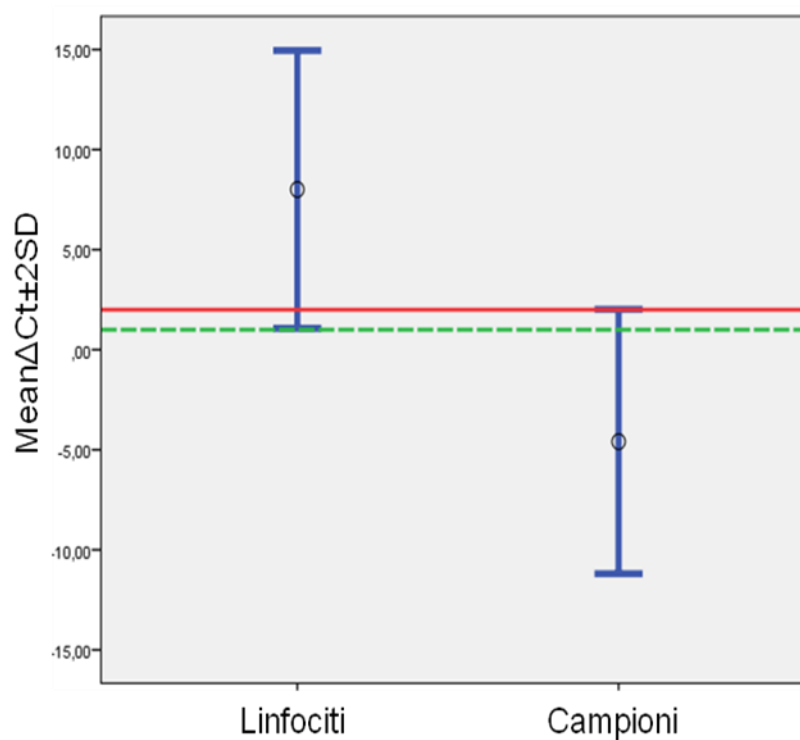


Il valore medio dei  $\Delta Ct$  dei campioni e dei linfociti è stato impiegato per definire la adeguatezza del materiale biologico, in termini di contenuto di materiale tiroideo, ossia la idoneità dei campioni per l'analisi molecolare.

Sono state stabilite tre tipologie di risultato per definire la adeguatezza del campione come indicato in tabella 14.

**Tabella 14. Intervalli di  $\Delta Ct = Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$  per la definizione della adeguatezza dei campioni.**

$\Delta Ct =$ $Ct_{TG} - Ct_{GAPDH}$	<b>Inferiore a:</b>  $media \Delta Ct_{(linfociti)} - 2SD$	<1	Campione idoneo
	<b>Compreso tra:</b>  $media \Delta Ct_{(linfociti)} - 2SD$ e $media \Delta Ct_{(campioni)} + 2SD$	1-2	Campione ai limiti della appropriatezza, fortemente contaminato ma processabile
	<b>Superiore a:</b>  $media \Delta Ct_{(campioni)} + 2SD$	>2	Campione non idoneo



È stata valutata la distribuzione dei campioni appartenenti allo studio di validazione nelle diverse classi e, anche sulla base di questo parametro, non è stato possibile osservare una differenza statisticamente significativa tra i risultati ottenuti dai campioni di agoaspirato e dai lavaggi ( $X^2=3,190$ ;  $p=0,203$ ) [Tabella 14], dimostrando la fattibilità dell'indagine molecolare anche sul materiale residuo.

**Tabella 14. Distribuzione dei campioni da agoaspirato o da lavaggio nelle diverse classi di idoneità del campione biologico.**

Classificazione	N agoaspirati coppie	N lavaggi coppie	N lavaggi
Campione idoneo	44	40	95
Campione ai limiti della appropriatezza	1	3	3
Campione non idoneo	0	2	2
Totale	45	45	100

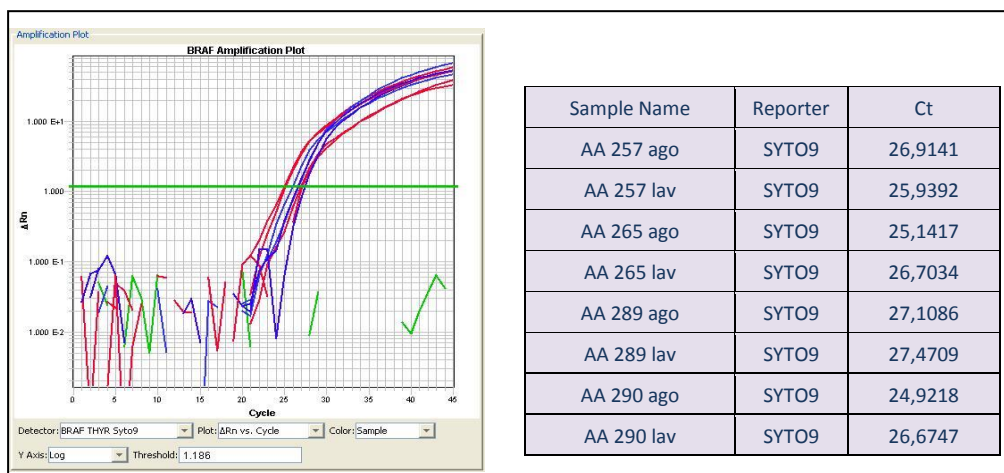
### **2.3 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DEL DNA E AMPLIFICAZIONE DEL GENE *BRAF***

In relazione al campione di DNA, la valutazione è stata sempre possibile grazie alla raccolta di 45 coppie di campioni, ago e lavaggio, dallo stesso nodulo e dal confronto della loro qualità, in termini di resa e qualità degli acidi nucleici e del risultato dell'indagine molecolare.

Una prima indicazione sul possibile impiego dei lavaggi per l'analisi molecolare è stata ottenuta dalla semplice valutazione spettrofotometrica dei campioni di DNA estratti dalle due diverse fonti di materiale cellulare. Il range di concentrazione, a parità di volume di eluizione, dei campioni derivanti da citologico vero e proprio è risultato 146,5-3,6 ng/μL e dei lavaggi 140,9-4,1 ng/μL, con una variabilità imputabile solo a caratteristiche intrinseche di ogni singolo campione e non alla fonte di materiale.

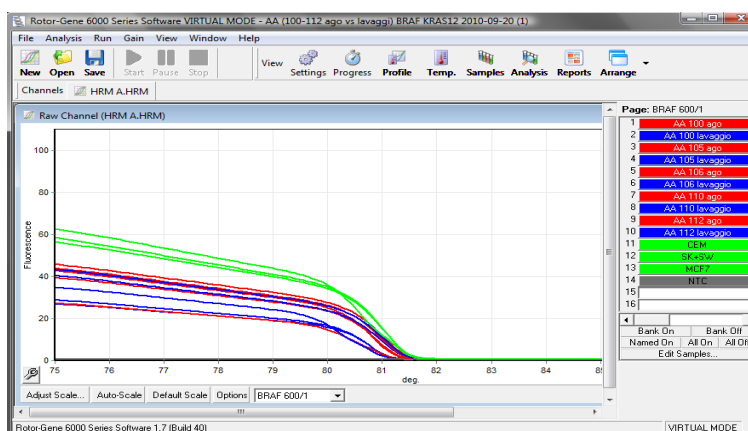
In secondo luogo è stata valutata mediante Real Time PCR l'efficienza di amplificazione del DNA per il gene *BRAF*, utilizzato come riferimento per stimare la qualità dei campioni di DNA estratti dall'agoaspirato e dal relativo lavaggio. L'intercalante fluorescente Syto 9 impiegato nella mix di PCR ha permesso di valutare le cinetiche di amplificazione dei campioni. L'eventuale presenza di interferenti o una maggiore frammentazione del DNA, anche a parità di quantità di DNA di partenza, possono infatti ridurre l'efficienza di amplificazione. Tramite questo saggio è, invece, stata dimostrata l'equivalente qualità del campione derivante dal lavaggio con quella del citologico che, infatti, presentano cinetiche di amplificazione paragonabili [Figura 38]. Ogni saggio di amplificazione è stato effettuato in presenza di due DNA di controllo purificati dalle linee cellulari SK-MEL28 e HT1197. I valori dei Ct sono stati normalizzati tra i diversi esperimenti utilizzando i controlli come calibratori. La

quantità di DNA dei controlli e dei campioni utilizzata nella reazione è stata, quando possibile, pari a 20ng.



**Figura 38.** In figura è riportato il profilo della Real Time PCR sul gene *BRAF* di coppie di agoaspirati (in rosso) e lavaggi (in blu). Entrambe le tipologie di campioni presentano un'amplificazione efficiente e curve sovrapponibili a parità di quantità di DNA amplificato. A fianco sono riportati i valori dei Ct associati alle curve di amplificazione di *BRAF*. Notiamo che i cicli soglia dei campioni sono compresi tra 24 e 27 indicando una buona qualità del DNA estratto sia dai campioni di agoaspirato che di lavaggio.

Anche il segnale di fluorescenza rilevato all'analisi HRM ha confermare che il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione di campioni di DNA da citologico e da lavaggio è generalmente sovrapponibile ed omogeneo [Figura 39] e inoltre confrontabile con quello ottenuto dall'amplificazione del DNA estratto dalle linee cellulari considerato di ottima qualità. Fino ad oggi nessun campione di DNA della casistica in esame è risultato non amplificabile e, quindi, non valutabile per la ricerca di mutazioni puntiformi.

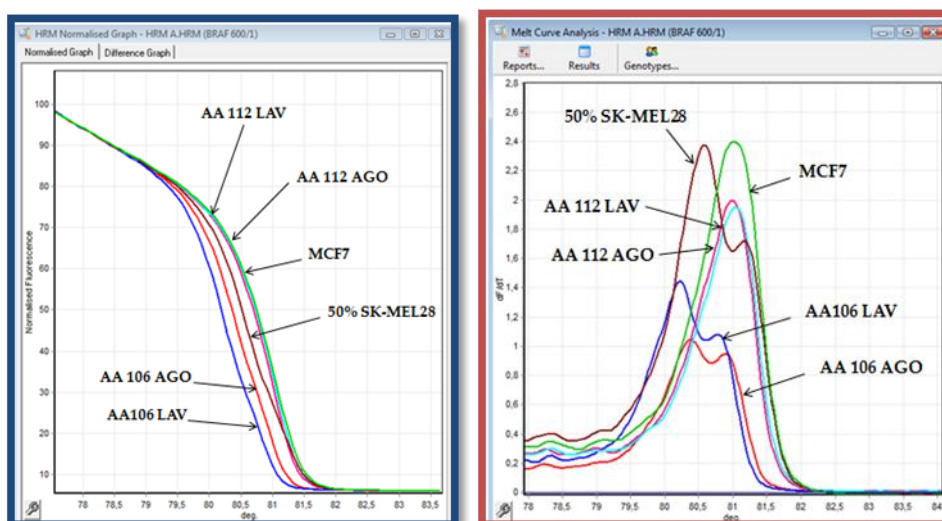


**Figura 39.** Profili di melting di campioni citologici agoaspirati e rispettivi lavaggi amplificati per il gene *BRAF*. La figura mostra come le curve siano generalmente sovrapponibili dimostrando una amplificazione confrontabile fra le due tipologie di campione.

## 2.4 SAGGI PER LA VERIFICA DELLA IDONEITÀ DEI CAMPIONI: VALUTAZIONE DELLA SOVRAPPONIBILITÀ DEI RISULTATI DELL'INDAGINE GENETICA TRA CAMPIONI DI AGOASPIRATO E LAVAGGI

La sovrapposizione del risultato ottenuto dall'analisi molecolare del DNA purificato dai campioni di lavaggio è stata valutata con quelli ottenuti dai rispetti agoaspirati mediante l'impiego dell'approccio metodologico ottimizzato.

Il confronto delle curve di melting all'analisi HRMA ha indicato come la presenza di una mutazione rintracciabile a livello del DNA estratto da un campione di agoaspirato sia dimostrabile anche a livello del DNA estratto dal rispettivo lavaggio. Allo stesso modo campioni da citologico vero e proprio risultati wild-type sono stati confermati dai dati ottenuti dai rispettivi lavaggi [Figura 40].



**Figura 40.** La figura mostra le curve di melting del gene *BRAF* normalizzate di due coppie ago-lavaggio e delle linee cellulari SK-MEL 28 (50%) e MCF7 . Il grafico di melt permette di identificare le  $T_M$  degli ampliconi come picchi e di genotipizzare i nostri campioni. Possiamo notare come sia l'ago che il lavaggio del campione AA106 presentino due picchi nel grafico di melt dovuti ad una variante genetica nel gene *BRAF*. Ago e lavaggio del campione AA112 presentano invece un unico picco sovrapponibile che identifica un genotipo wild-type.

Oltre a valutare la qualità dei campioni di cDNA è stato importante anche in questo caso assicurarsi che il risultato dell'indagine molecolare sui riarrangiamenti fornisca lo stesso risultato tra agoaspirato e lavaggio. In Figura 43 è possibile osservare il profilo di una amplificazione in Real Time PCR di un campione positivo per il riarrangiamento RET/PTC1 del quale era



disponibile la coppia di campioni agoaspirato e lavaggio. I campioni sono stati sottoposti al saggio di amplificazione per il gene di fusione *RET/PTC1*. La presenza di cDNA è stata dimostrata grazie alla amplificazione del gene *GAPDH* anche nel campione negativo il quale però, per l'assenza del riarrangiamento, non presenta amplificazione in questo saggio. La presenza di un segnale di amplificazione sia del campione da agoaspirato che del campione di lavaggio dimostra la sovrapposibilità dei due risultati che indicano la presenza della alterazione cromosomica nel campione. L'analisi di melting ha, inoltre, confermato prima ancora del sequenziamento diretto la presenza di un amplificato specifico di PCR.

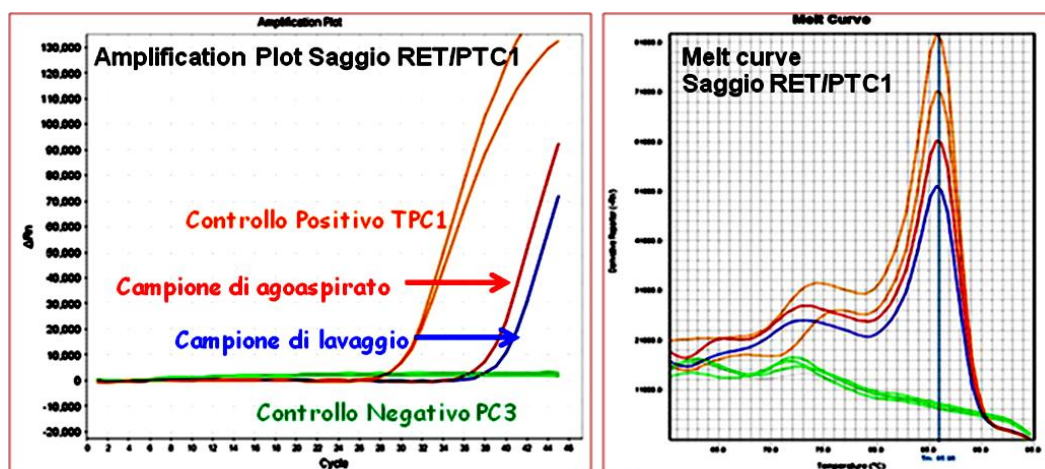


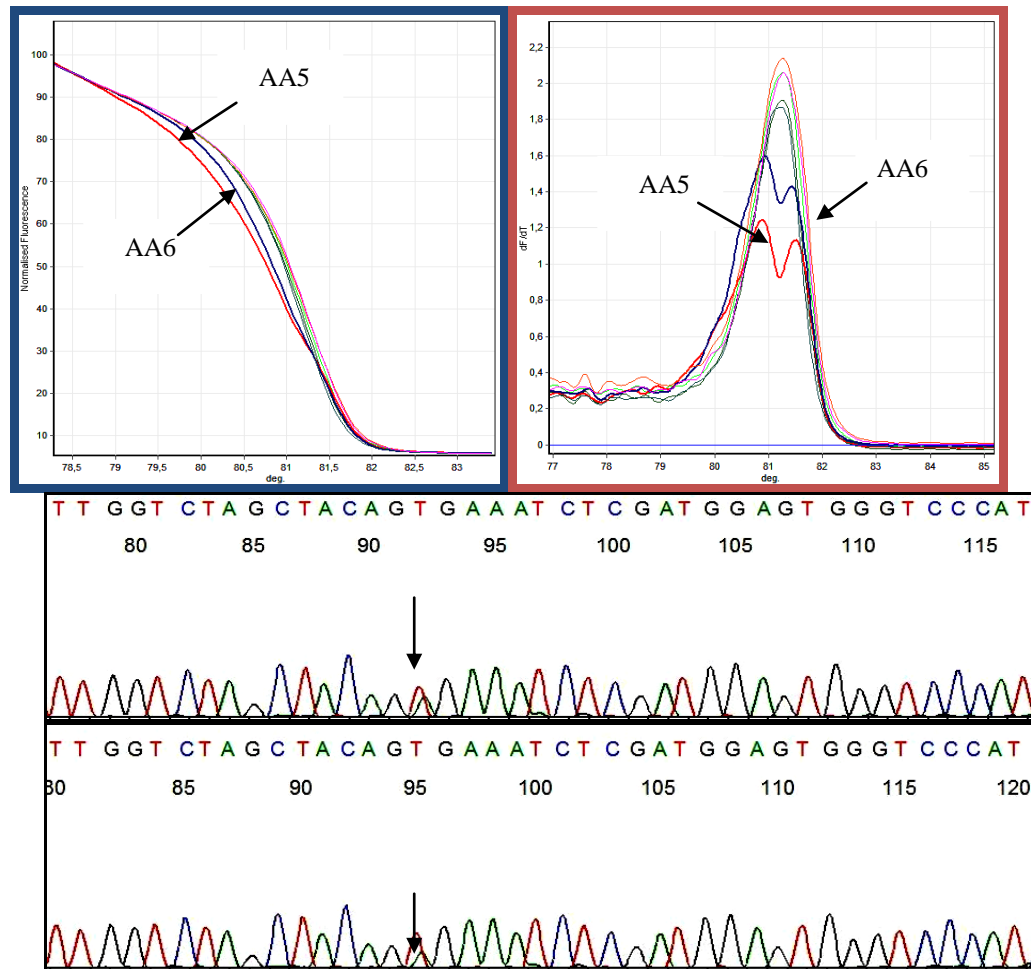
Figura 41. Profilo di amplificazione in Real Time PCR del saggio per la valutazione del riarrangiamento *RET/PTC1*. A confronto il risultato ottenuto da un campione di agoaspirato e un campione di lavaggio. A destra l'analisi del profilo di melting conferma la specificità del segnale ottenuto mediante l'uso di intercalanti fluorescenti.

### 3 STUDIO DI VALIDAZIONE: RISULTATI DELL'ANALISI MOLECOLARE

#### 3.1 RISULTATI DELL'ANALISI DELLE MUTAZIONI PUNTFORMI NELLO STUDIO DI VALIDAZIONE

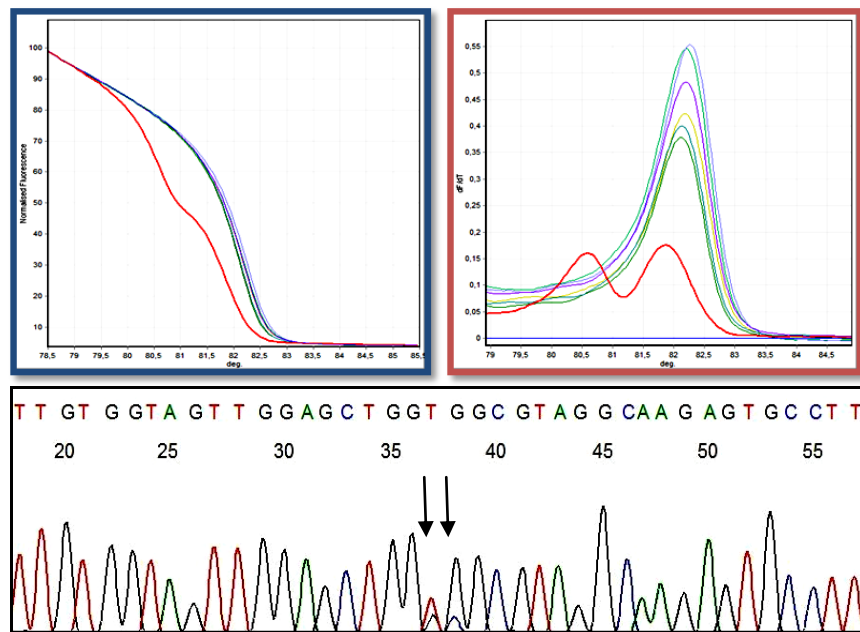
In seguito all'ottimizzazione dei protocolli di analisi molecolare abbiamo effettuato lo screening genetico sulla casistica a nostra disposizione. Per la ricerca delle mutazioni a carico dei geni *BRAF*, *HRAS*, *NRAS* e *KRAS* è stata utilizzata l'High Resolution Melting Analysis e, successivamente, la conferma e la precisa caratterizzazione della mutazione mediante sequenziamento diretto. Mediante l'analisi è stato possibile dimostrare la capacità del protocollo di indagine ottimizzato di individuare la presenza di varianti genetiche su campioni reali.

Per il gene *BRAF* è stata individuata la mutazione somatica p.V600E in un ampio numero di campioni. In Figura 42 è riportato il risultato dell'analisi HRM del DNA estratto dai campioni AA5 e AA6 amplificato sulla regione genica di interesse. La mutazione di *BRAF* è stata poi confermata mediante sequenziamento che permette la visualizzazione della sostituzione nucleotidica T>A in posizione 1799.

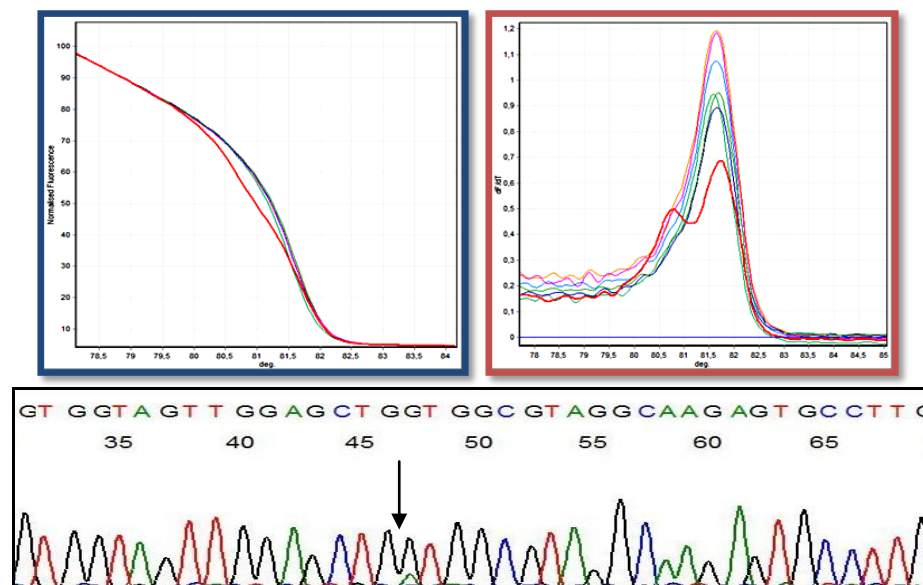


**Figura 42. Analisi HRM dei campioni AA5 e AA6 amplificati per il gene *BRAF* e risultati mutati. Sono riportati anche i risultati del sequenziamento dei due campioni il quale ha permesso la caratterizzazione della sostituzione nucleotidica c. 1799 T>A.**

A livello dei codoni 12 e 13 del gene *KRAS* sono state individuate modificazioni di sequenza diverse. Riportiamo come esempio il campione AA9 portatore della mutazione p.[G12G(+)-G13R] e il campione AA185 positivo per la mutazione p.G12D. La sostituzione aminoacidica p.G12G è silente ed è dovuta alla sostituzione nucleotidica T>G sulla terza base del codone, le mutazioni p.G13R e p.G12D sono, invece, missenso e sono dovute rispettivamente alle sostituzioni G>C sulla prima base del codone 13 e G>A sulla seconda base del codone 12. I risultati dell'analisi HRM e del sequenziamento sono riportati in Figura 43 e 44.



**Figura 43. Analisi HRM e sequenziamento diretto del campione AA9 amplificato per il gene *KRAS* codone 12-13.**

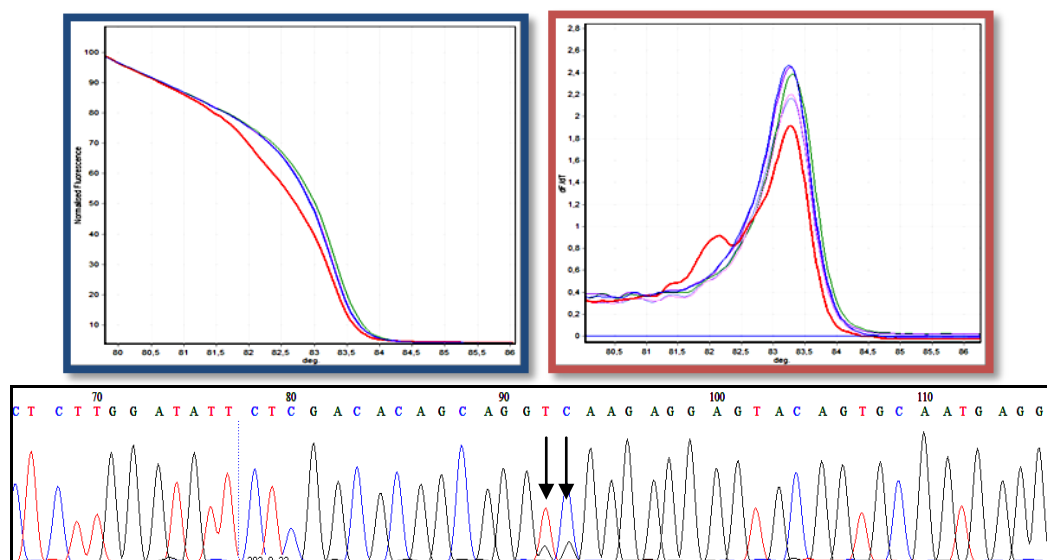


**Figura 44. Analisi HRM e sequenziamento diretto del campione AA185 amplificato per il gene *KRAS* codone 12-13.**

È stato, inoltre, identificato un campione con alterazioni a carico del codone 61 del gene *KRAS*. In particolare, anche nel campione AA32 è possibile rintracciare la copresenza di una alterazione silente e missenso p.[G60G(+)/Q61K] [Figura 45].

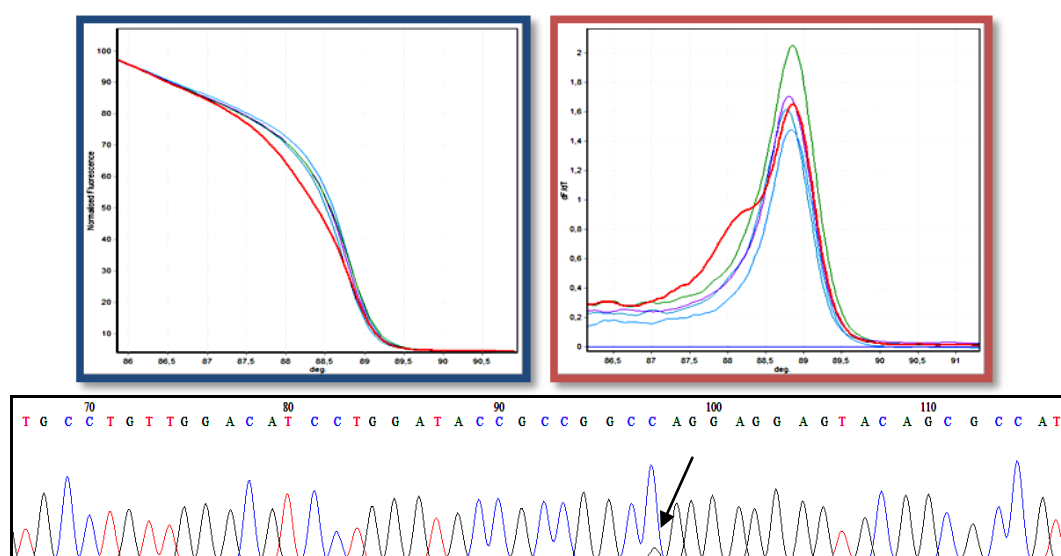
È impossibile mediante le metodiche utilizzate stabilire se le due sostituzioni sono a carico dello stesso clone cellulare o dello stesso allele o di alleli diversi. È importante però mettere in luce che qualora le mutazioni si presentassero nello stesso clone e a livello dello stesso allele il risultato dell'analisi

molecolare effettuata tramite metodi basati sull'impiego di sonde mutazione-specifiche potrebbe essere compromesso e risultare falsamente negativo. Il dato conferma, perciò, la validità dell'approccio metodologico scelto nel nostro lavoro, ovvero l'analisi mediante HRM e sequenziamento che consentono di rilevare la presenza di variazioni di sequenza all'interno della regione analizzata indipendentemente dal tipo di sostituzione presente.



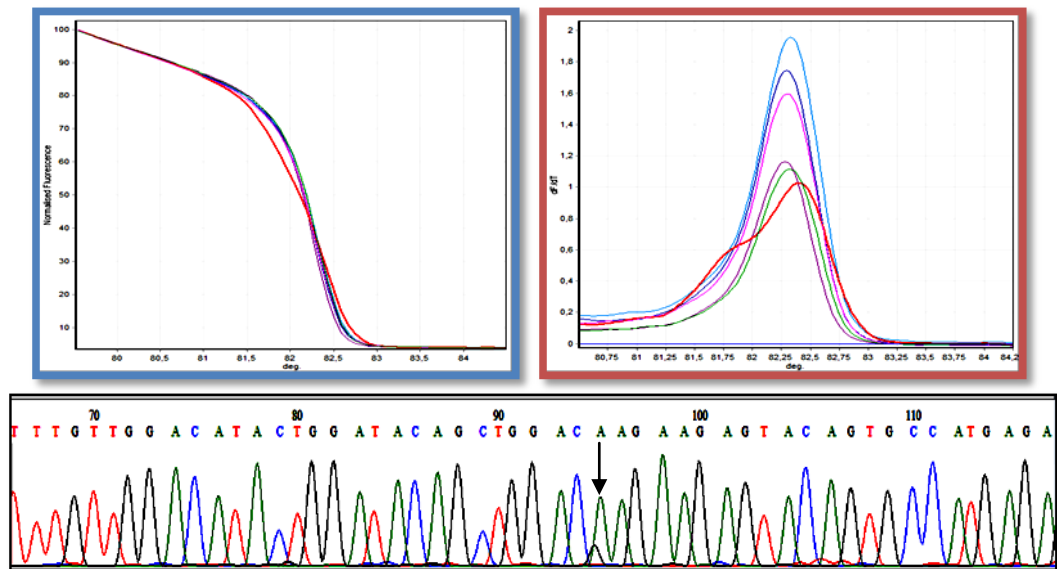
**Figura 45. Analisi HRM e sequenziamento diretto del campione AA32 amplificato per il gene *KRAS* codone 61.**

In Figura 46 sono riportati i risultati dell'analisi HRM e del sequenziamento sul gene *HRAS* del campione AA54 positivo per la mutazione missenso p.Q61K. La sostituzione nucleotidica coinvolta è C>A.



**Figura 46. Analisi HRM e sequenziamento diretto del campione AA54 amplificato per il gene *HRAS* codone 61.**

Per il gene *NRAS* riportiamo come esempio il risultato dell'analisi sul campione AA180 portatore della mutazione p.Q61R che in letteratura è indicata come una delle alterazioni più frequenti nell'ambito dei geni della famiglia RAS nel carcinoma tiroideo [Figura 47].



**Figura 47. Analisi HRM e sequenziamento diretto del campione AA180 amplificato per il gene *NRAS* codone 61.**

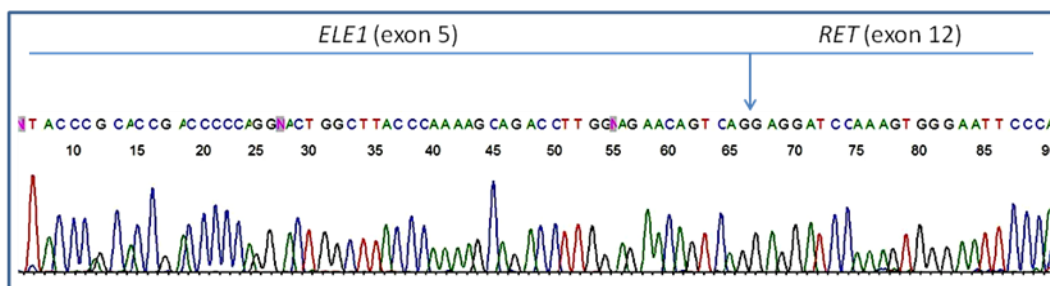
### 3.2 RISULTATI DELL'ANALISI DEI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI NELLO STUDIO DI VALIDAZIONE

Per il rilevamento della presenza di riarrangiamenti cromosomici sono state impiegate sonde TaqMan MGB che ibridano con alta affinità in corrispondenza di un tratto di sequenza coinvolto nella fusione dei geni *H4*, *ELE1* e *PPAR $\gamma$*  rispettivamente per lo studio di *RET/PTC1*, *RET/PTC3* e *PAX8/PPAR $\gamma$* . L'impiego di primer disegnati in modo da dare un amplificato solo in caso di presenza dell'inversione o della traslocazione consente la discriminazione tra campioni positivi e negativi per il riarrangiamento.

I campioni di cDNA sono stati sottoposti, oltre all'analisi molecolare sui riarrangiamenti, anche all'amplificazione del *GAPDH* che è stato utilizzato come gene di controllo della qualità dell'RNA estratto e del relativo cDNA. Il *GAPDH* essendo ubiquitariamente espresso deve sempre generare un amplificato: nel caso in cui il suo segnale risulti assente l'analisi del campione è invalidata.

Sono stati identificati due campioni portatori di riarrangiamenti cromosomici: entrambi risultati positivi per la presenza di una inversione paracentrica del

braccio lungo del cromosoma 10. Il campione AA98 è risultato positivo per il gene di fusione *RET/PTC3* [Figura 48] e il campione AA277 per *RET/PTC1*.



**Figura 48. Sequenziamento diretto del risultato dell'amplificazione del campione AA98 tramite il set di primer specifico per *RET/PTC3*.**

#### 4 STUDIO DI VALIDAZIONE: CONFRONTO PRELIMINARE TRA ANALISI CITOLOGICA E ANALISI MOLECOLARE

L'analisi molecolare è stata effettuata su una casistica di 100 campioni di noduli tiroidei di cui 45 agoaspirati veri e propri e 100 lavaggi. Le biopsie sono state ottenute da una popolazione di pazienti composta da 77 donne e 22 uomini (rapporto 3,5:1) di età compresa fra i 21 e i 79 anni (media $\pm$  SD= 52,9 $\pm$ 13,2). Il diametro superiore dei noduli indagati era compreso in un range di 9 e 75 mm (media $\pm$  SD= 25,9 $\pm$ 11,7mm).

La frequenza dei casi appartenenti alla casistica dello studio di fattibilità sono risultati ripartiti nelle diverse categorie citodiagnostiche nella percentuale generalmente riportata in letteratura ed è stato pertanto possibile considerare l'insieme analizzato come un campione adeguatamente rappresentativo della normale distribuzione della tipologia di noduli nella popolazione di pazienti affetti dalla patologia.

**Tabella 15. Distribuzione dei casi nelle classi citologiche**

Classe	Frequenza	Percentuale
Tir1- non diagnostico	10	10,0
Tir2- negativo	64	64,0
Tir3- prolif follicolare	16	16,0
Tir4- sospetto	5	5,0
Tir5- carcinoma	5	5,0
Totale	100	100,0

È stata, inoltre, valutata la distribuzione delle diverse mutazioni rilevate all'interno delle diverse classi citodiagnostiche.

**Tabella 16. Distribuzione delle mutazioni nelle classi citologiche**

Mutazioni	Tir					Totale
	1 non diagnostico	2 negativo	3 prolifer follicolare	4 sospetto	5 carcinoma	
BRAF p.V600E	0	3	1	2	4	10
BRAF p.V600E e KRAS p.G12D	0	0	0	0	1	1
HRAS p.Q61K	0	0	1	0	0	1
KRAS p.G12G+G13R	0	0	1	0	0	1
KRAS p.G60G+Q61K	0	0	1	0	0	1
NRAS p.Q61R	0	0	1	0	0	1
RET/PTC1	0	0	1	0	0	1
RET/PTC3	0	1	0	0	0	1
WT	9	60	10	2	0	81
INADEGUATO	1	0	0	1	0	2
Totale	10	64	16	5	5	100

La distribuzione delle mutazioni nelle diverse classi diagnostiche, escludendo il campione inadeguato per l'analisi molecolare, è risultata significativa sia considerando semplicemente la presenza o assenza di mutazioni ( $X^2=39,238(df=4,N=99)$ ; coefficiente di contingenza= 0,533;  $p<0,000$ ) sia raggruppando per gene, o famiglia di geni, soggetto a mutazione ( $X^2(df=12,N=99)=74,183$ ; coefficiente di contingenza= 0,654;  $p<0,000$ ).

**Tabella 17. Riassunto dei risultati dell'analisi molecolare nei 100 campioni dello studio di validazione**

Genotipo	Tir					Totale
	1 non diagnostico	2 negativo	3 prolifer follicolare	4 sospetto	5 carcinoma	
WT	10	60	10	2	0	82
BRAF <sup>mut</sup>	0	3	1	2	5	11
RAS <sup>mut</sup>	0	0	4	0	0	4
RET/PTC <sup>presente</sup>	0	1	1	0	0	2
Totale	10	64	16	4	5	99

La mutazione rilevata con maggiore frequenza è risultata la p.V600E nel gene *BRAF*, presente in un totale di 11 campioni appartenenti alle classi citologiche Tir2, Tir3, Tir4 e Tir5. Secondo la letteratura le mutazioni in *BRAF* sono un potente indicatore di malignità, altamente specifico per il carcinoma papillare tiroideo e con dimostrato valore predittivo positivo.

I cinque campioni appartenenti alla categoria Tir5 sono tutti risultati mutati su *BRAF* ed è, quindi, evidente come l'analisi molecolare sia risultata utile nel confermare il risultato dell'analisi citomorfologica. Per sette campioni con mutazione a carico di *BRAF* è stato inoltre possibile avere la conferma di malignità del nodulo tramite il risultato dell'analisi istologica: nella casistica analizzata è, quindi, confermato il potente valore diagnostico dell'analisi mutazionale dell'oncogene *BRAF*.

Nella categoria dei Tir4, a cui appartengono citologie fortemente suggestive di malignità, solo 2 campioni su 4 presentavano la mutazione su *BRAF*. Un campione della categoria dei Tir4 è risultato inadeguato per l'analisi molecolare a causa della qualità degli acidi nucleici purificati.

È da sottolineare il fatto che mentre l'individuazione di una mutazione è significativa da un punto di vista diagnostico, non si può dire lo stesso di un risultato negativo. L'assenza di alterazioni genetiche nei campioni a citologia sospetta non esclude infatti con certezza la presenza di un carcinoma. L'assenza di un marcatore unico di neoplasia e la numerosità di alterazioni genetiche che possono esserne causa impedisce, infatti, di individuare il profilo molecolare di ogni nodulo con caratteristiche di malignità. È previsto, a seguito di questo studio, l'ampliamento del pannello delle alterazioni genetiche in esame parallelamente alla disponibilità di nuove tecnologie che consentano di aumentare la automatizzazione e l'abbattimento dei costi per marcatore in esame.

Risulta di grande interesse l'individuazione di un campione *BRAF* positivo appartenente alla classe dei Tir3, categoria dei noduli indeterminati considerata la più controversa da un punto di vista interpretativo e, sicuramente, quella per la quale l'applicazione dell'analisi molecolare può divenire uno strumento essenziale per la diagnosi differenziale.

La presenza di campioni risultati positivi per *BRAF* e appartenenti alla categoria Tir3, come a quella dei Tir2, permette di affermare che l'indagine genetica rappresenta uno strumento valido per incrementare l'accuratezza del risultato dell'analisi del materiale agoaspirato. Importante per confermare il valore diagnostico del dato molecolare sarà la possibilità di indagare un campione proveniente da una successiva biopsia dopo un periodo di follow-up



ed eventualmente un campione di tessuto ottenuto in caso di asportazione chirurgica del nodulo.

Sono state, inoltre, rilevate mutazioni a carico di tutti i geni della famiglia RAS: *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, soggetti a diversi tipi di sostituzione nucleotidica. Nella classe citologica dei Tir3 è stato individuato un campione positivo per la mutazione p.Q61R del gene *NRAS*. A carico dei geni *HRAS* e *KRAS* è stata rilevata la presenza della mutazione p.Q61K, in particolare in due campioni appartenenti sempre alla categoria Tir3. Per quanto riguarda il gene *KRAS* le mutazioni osservate sono state la p.[(G12G)+(G13R)] in un campione con citologia Tir3 e la p.G12D in un campione appartenente alla classe dei Tir5 che presentava contemporaneamente la mutazione *BRAF* p.V600E. Mutazioni a carico dei geni della famiglia RAS, secondo la letteratura, risultano un indicatore di malignità meno specifico di *BRAF* essendo state ritrovate anche a livello di adenomi. Inoltre non presentano specificità per un determinato sottotipo tumorale essendo presenti sia negli FTC che nei PTC, sebbene soltanto nella variante follicolare. Tuttavia la loro presenza in un campione biotico di nodulo tiroideo non può essere sottovalutata: la letteratura riporta, infatti, che eventi mutazionali a carico dei geni RAS sono, comunque, strettamente legati alla progressione da adenoma a carcinoma.

L'analisi dei riarrangiamenti genici non ha permesso di rilevare la presenza del gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$*  in nessun campione. Sono stati comunque osservati due campioni positivi per la presenza dei riarrangiamenti *RET/PTC* in particolare un nodulo Tir2 portatore del riarrangiamento *RET/PTC3* e un nodulo Tir3 positivo per *RET/PTC1*.

## **5 CONFRONTO TRA DATO CITOLOGICO E RISULTATO DELL'ANALISI MOLECOLARE**

I risultati dello studio di validazione hanno permesso la applicazione dei criteri di valutazione e delle metodiche selezionate ad una casistica più ampia. È stato, così, raccolto un campione di materiale residuo per ogni nodulo. Sono stati in particolare selezionati per l'analisi un maggior numero di campioni di lavaggio appartenenti alle categorie delle proliferazioni follicolari di incerto significato, quelli con forte sospetto malignità e campioni già classificati come carcinomi a seguito dell'esame citologico, ossia i più interessanti dal punto di vista diagnostico. L'obiettivo è stato rappresentato dalla valutazione delle frequenze delle mutazioni nei diversi gruppi diagnostici e del valore diagnostico che queste assumono in relazione alla caratterizzazione del nodulo.

La distribuzione dei campioni analizzati nelle diverse categorie citologiche è riportata in tabella 18, per la descrizione della popolazione dei pazienti si rimanda alla precedente sezione dei Materiali e Metodi. La casistica complessiva rispetto allo studio di validazione è stata arricchita di campioni appartenenti alla classe dei Tir3, riducendo il numero dei campioni con citologia benigna. I campioni classificati come Tir4 e Tir5 sono stati comunque analizzati, in modo retrospettivo, al fine di costituire una popolazione di controllo positiva per la valutazione dei risultati.

**Tabella 18. Distribuzione dei casi per classe citologica**

<b>Tir- classe citologica</b>	<b>Frequenza</b>	<b>Percentuale</b>
<b>1- non diagnostico</b>	56	13,0
<b>2- negativo</b>	184	42,8
<b>3- prolifer follicolare</b>	155	36,0
<b>4- sospetto</b>	19	4,4
<b>5- carcinoma</b>	16	3,7
<b>Totale</b>	430	100,0

L'analisi della distribuzione delle specifiche mutazioni rilevate nelle diverse classi citologiche è riportata in tabella 19.

Tabella 19.

Genotipo		Tir- classe citologica					Totale
		1- non diagnostico	2- negativo	3- prolif follicolare	4- sospetto	5- carcinoma	
BRAF p.V600E	N	1	6	6	8	11	32
	% entro Tir	1,8%	3,3%	3,9%	42,1%	68,8%	7,4%
BRAF p.V600E e KRAS p.G12A	N	0	0	0	0	2	2
	% entro Tir	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	12,5%	,5%
BRAF p.V600E e KRAS p.G12D	N	0	0	0	0	1	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,3%	,2%
BRAF p.V600E e NRAS p.Q61R	N	0	0	1	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	,6%	0,0%	0,0%	,2%
BRAF p.V600E e NRAS p.Q61Stop	N	0	0	1	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	,6%	0,0%	0,0%	,2%
HRAS p.Q61K	N	0	0	2	0	0	2
	% entro Tir	0,0%	0,0%	1,3%	0,0%	0,0%	,5%
HRAS p.Q61R	N	0	1	2	2	0	5
	% entro Tir	0,0%	,5%	1,3%	10,5%	0,0%	1,2%
KRAS p.G12A	N	0	0	2	0	0	2
	% entro Tir	0,0%	0,0%	1,3%	0,0%	0,0%	,5%
KRAS p.G12D	N	3	1	1	0	0	5
	% entro Tir	5,4%	,5%	,6%	0,0%	0,0%	1,2%
KRAS p.G12G+G13R	N	0	0	1	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	,6%	0,0%	0,0%	,2%
KRAS p.G12R	N	0	0	1	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	,6%	0,0%	0,0%	,2%
KRAS p.G13D	N	0	0	2	0	0	2
	% entro Tir	0,0%	0,0%	1,3%	0,0%	0,0%	,5%
KRAS p.G60G+Q61K	N	0	0	1	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	0,0%	,6%	0,0%	0,0%	,2%
NRAS p.Q61R	N	1	1	11	0	0	13
	% entro Tir	1,8%	,5%	7,1%	0,0%	0,0%	3,0%
RET/PTC1	N	2	0	2	2	1	7
	% entro Tir	3,6%	0,0%	1,3%	10,5%	6,3%	1,6%
RET/PTC3	N	0	1	0	0	0	1
	% entro Tir	0,0%	,5%	0,0%	0,0%	0,0%	,2%
WT	N	35	169	118	6	0	328
	% entro Tir	62,5%	91,8%	76,1%	31,6%	0,0%	76,3%
INADEGUATO	N	14	5	4	1	1	25
	% entro Tir	25,0%	2,7%	2,6%	5,3%	6,3%	5,8%
Totale	N	56	184	155	19	16	430
	% entro Tir	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Nelle successive analisi, che prevedono il confronto tra il dato molecolare e l'esito dell'esame citologico, i campioni con citologia indeterminata (Tir1, N=56) sono stati esclusi data la impossibilità di confronto. Per lo stesso motivo anche i 25 campioni (5,8%) risultati non idonei per l'analisi molecolare, 14 dei quali (56%) appartenenti alla categoria dei Tir1 (N=56),

sono stati esclusi. Risulta, comunque, importante segnalare la identificazione di campioni positivi all'indagine molecolare a seguito della identificazione di diverse tipologie di alterazioni genetiche. Il dato suggerisce la possibilità di tentare di approfondire l'inquadramento diagnostico del nodulo mediante l'impiego di marcatori molecolari anche in questa categoria, difatti l'analisi molecolare potrebbe rappresentare un importante ausilio quando la citologia non consente, per la scarsa rappresentatività cellulare del campione, di fornire un risultato. La presenza di un'alterazione molecolare può, infatti, suggerire la necessità di ripetere in modo più tempestivo una seconda biopsia e/o fornire un importante supporto diagnostico nel caso in cui anche la ripetizione dell'esame citologico non sia in grado di fornire un risultato.

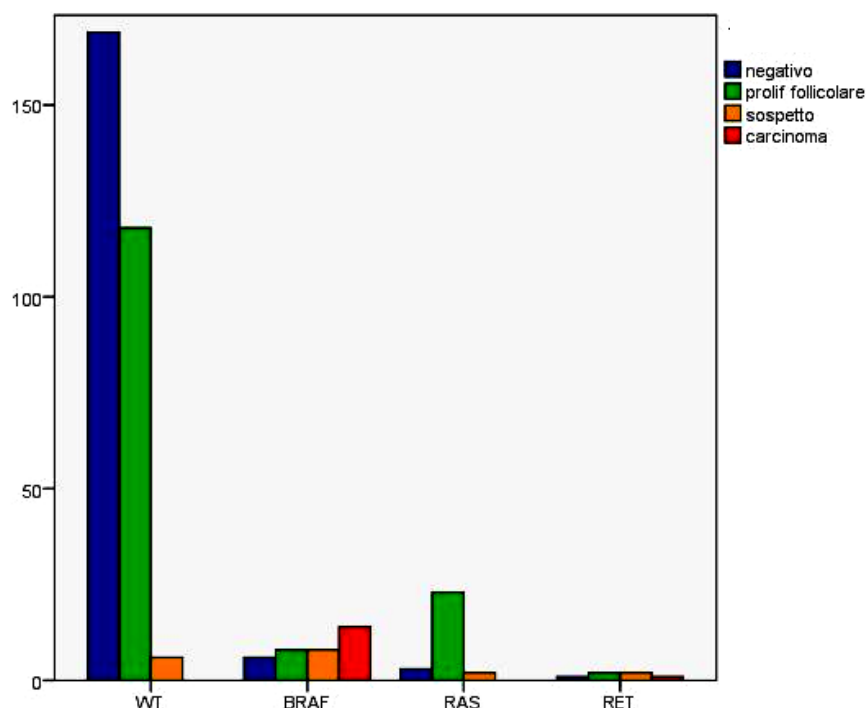
In nessun campione è stato individuato il riarrangiamento cromosomico che porta alla formazione del gene di fusione *PAX8/PPAR $\gamma$*  per il quale, pertanto, non è stata effettuata nessuna analisi della distribuzione.

L'analisi statistica è stata, quindi, effettuata su un totale di campioni pari a N=363.

La frequenza dei diversi genotipi nelle 4 classi diagnostiche è riportata in tabella 20 e la frequenza delle diverse alterazioni per classe diagnostica raffigurata nel grafico della figura 49.

**Tabella 20. Distribuzione dei genotipi nelle classi citologiche**

Genotipo		Tir				Totale
		2	3	4	5	
WT	N	169	118	6	0	293
	% entro Tir	94,4%	78,1%	33,3%	0,0%	80,7%
BRAF <sup>mut</sup>	N	6	8	8	14	36
	% entro Tir	3,4%	5,3%	44,4%	93,3%	9,9%
RAS <sup>mut</sup>	N	3	23	2	0	28
	% entro Tir	1,7%	15,2%	11,1%	0,0%	7,7%
RET/PTC <sup>presente</sup>	N	1	2	2	1	6
	% entro Tir	,6%	1,3%	11,1%	6,7%	1,7%
Totale	N	179	151	18	15	363
	% entro Tir	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



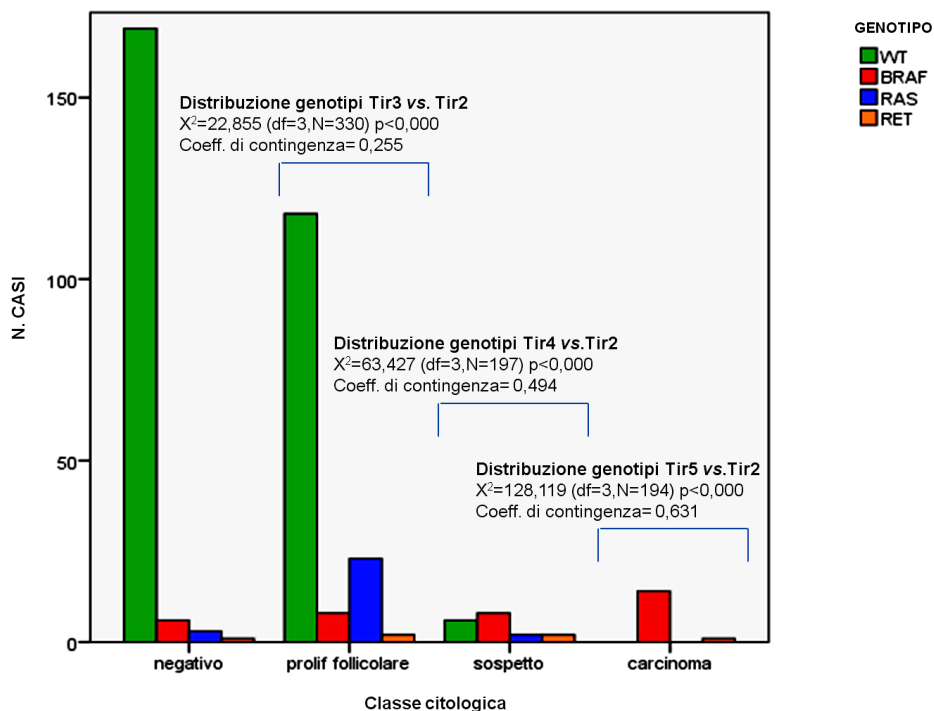
**Figura 49. Rappresentazione grafica del numero dei campioni per genotipo suddivisi per classe citologica di appartenenza**

La distribuzione delle diverse alterazioni, raggruppate per tipo o famiglia di gene coinvolto, nelle diverse classi diagnostiche, escludendo i campioni inadeguati per l'analisi citologica e molecolare, è stata confermata statisticamente significativa anche nella intera casistica analizzata ( $X^2=193,677(df=9,N=363)$ ; coefficiente di contingenza= 0,590;  $p<0,000$ ).

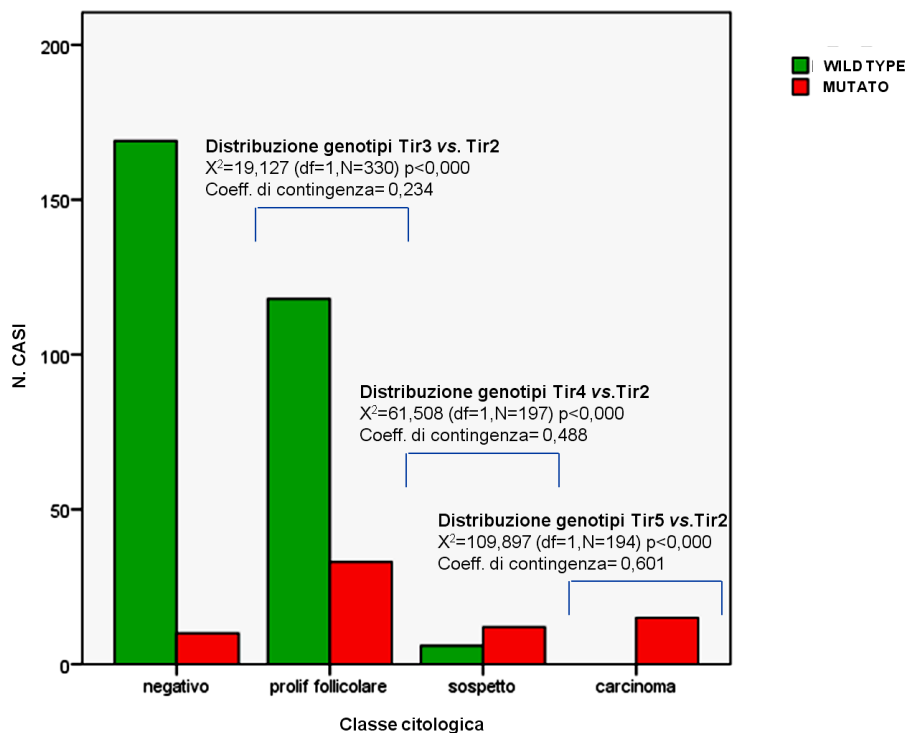
La mutazione più frequentemente identificata nelle categorie dei Tir4 e Tir5 è risultata nuovamente la sostituzione p.V600E nel gene *BRAF* confermandosi un potenziale marcatore specifico di neoplasia. Da segnalare è, inoltre, l'aumento della frequenza di mutazioni nei geni *RAS* nei campioni della categoria Tir3 (15,2%) rispetto alle altre categorie citologiche. Infine, è importante indicare la presenza di N=10 campioni mutati (5,6%) in noduli classificati come benigni, evidenza che necessita di essere investigata per comprendere se sia dovuta ad una bassa specificità dell'analisi molecolare o alla capacità dei marcatori molecolari, per la loro elevata sensibilità, di rappresentare un indicatore precoce di patologia neoplastica.

La distribuzione dei genotipi è stata inoltre valutata singolarmente per le categorie Tir3, Tir4 e Tir5 categoria diagnostica rispetto alla categoria dei noduli benigni Tir2. I risultati dell'analisi sono riportati nel grafico della figura 50 in base alla distribuzione per diverso gene mutato e sulla base della presenza o assenza di una qualsiasi delle mutazioni nel grafico della figura 51. Nonostante sia mantenuta la significatività statistica è da evidenziare che la associazione tra la presenza di una mutazione e la appartenenza ad una delle tre classi, raffrontata singolarmente con la classe dei Tir2, vada diminuendo

tra i campioni che presentano citologia indeterminata rispetto a quelli con diagnosi di carcinoma. Questa osservazione mette in evidenza la grande eterogeneità del gruppo dei campioni classificati come proliferazioni follicolari di incerto significato, all'interno della quale vengono riuniti, a causa dei limiti intrinseci della osservazione citologica, campioni di natura estremamente diversa.

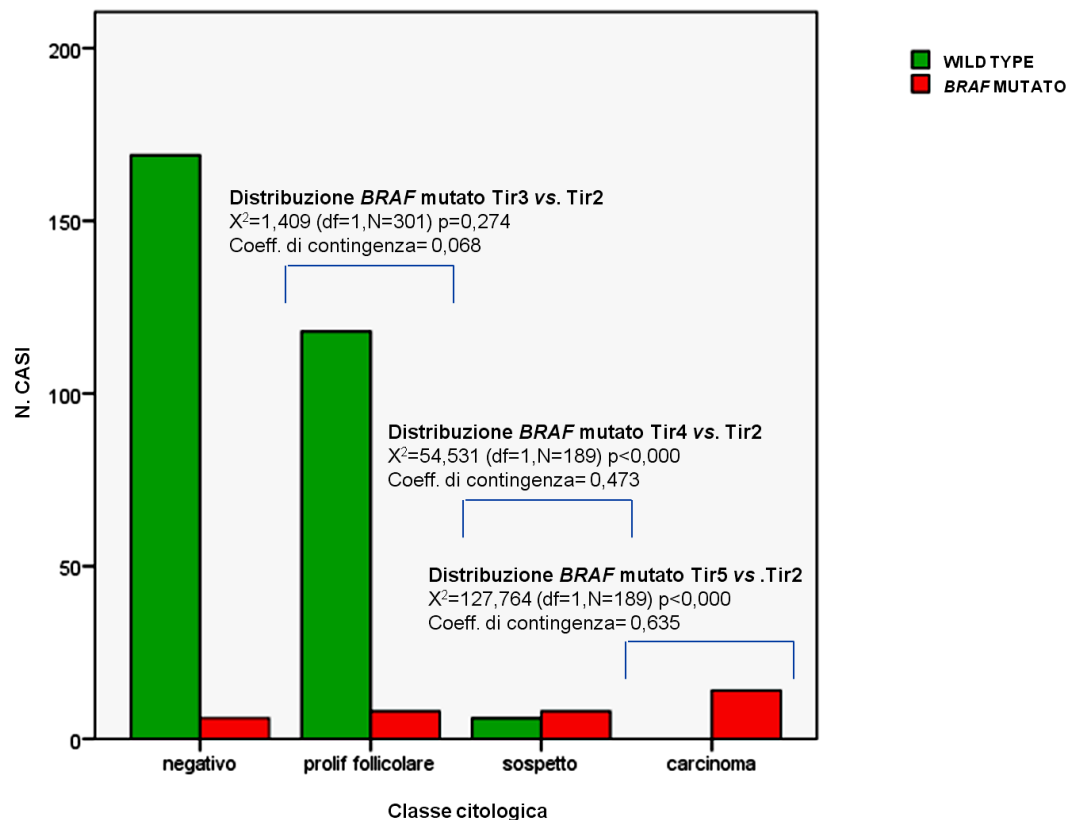


**Figura 50.**



**Figura 51.**

La stessa analisi è stata effettuata considerando singolarmente ogni singolo gene mutato e i campioni wild type. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici delle successive figure 52-55. Questa valutazione ha confermato la stessa differenza fra le diverse classi citologiche ma ha, inoltre, evidenziato come il maggior contributo in termini di associazione tra categoria diagnostica e presenza di mutazione sia dovuto ai campioni che presentano una mutazione nel gene *BRAF*, il quale rappresenta il marcatore più specifico di carcinoma papillare della tiroide e che, infatti, costituisce la alterazione con maggior frequenza nelle classi dei campioni Tir 4 e dei Tir5.



**Figura 52.**

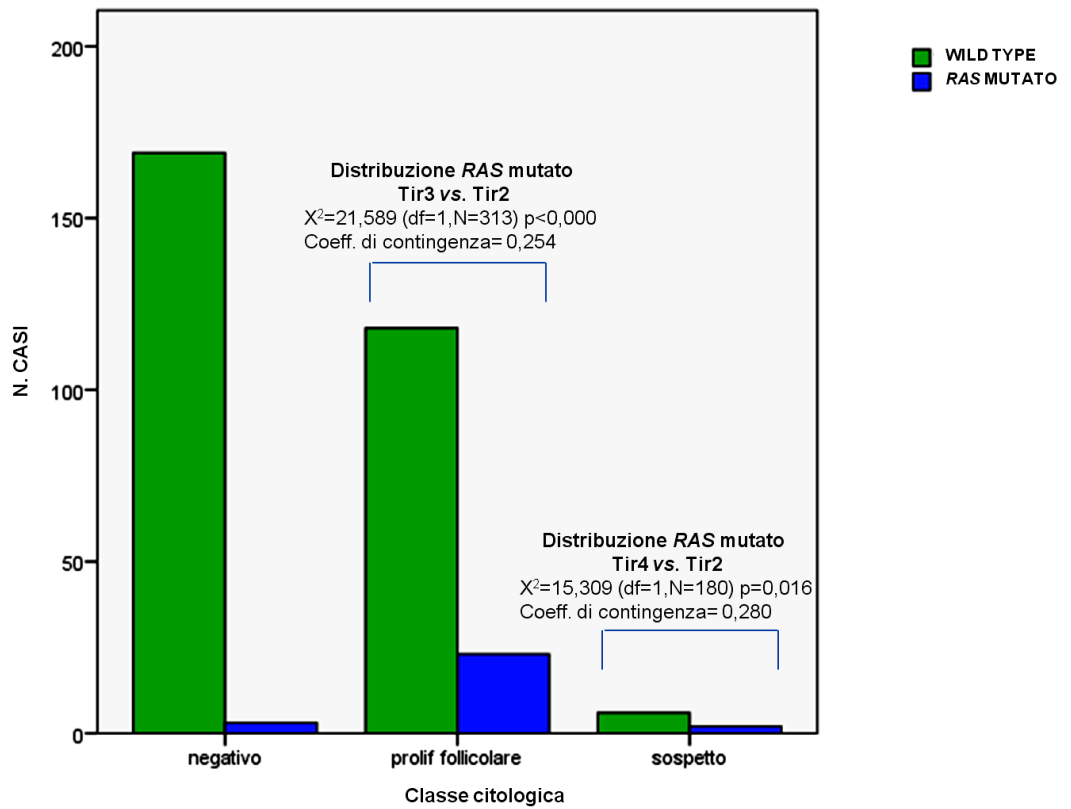


Figura 53.

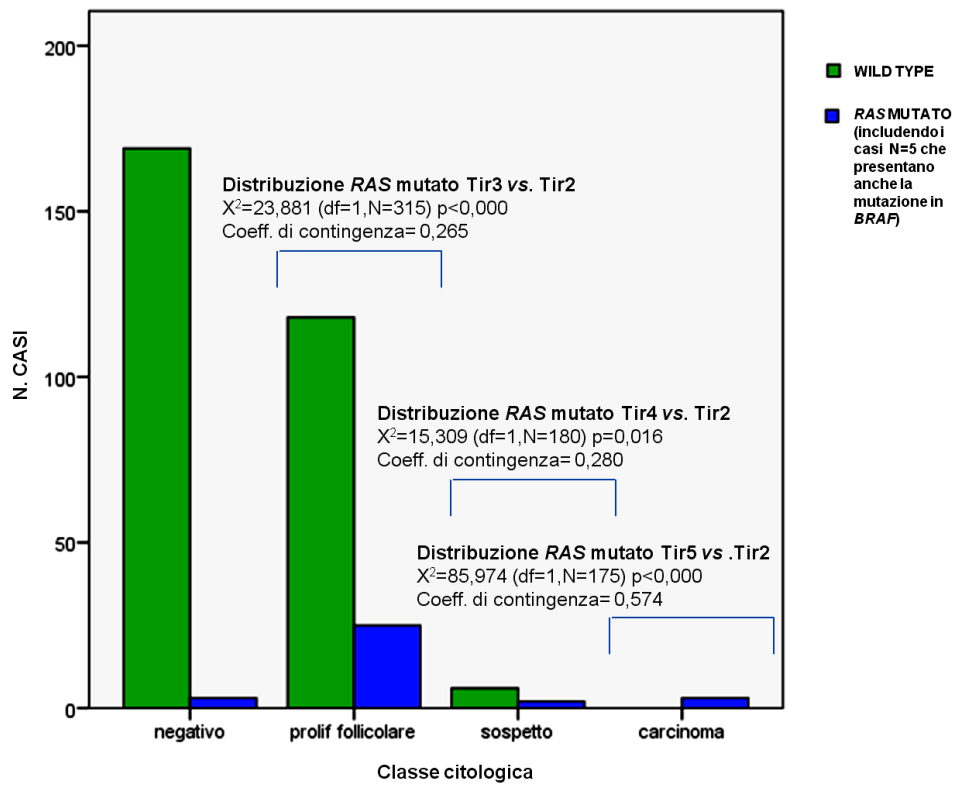


Figura 54.



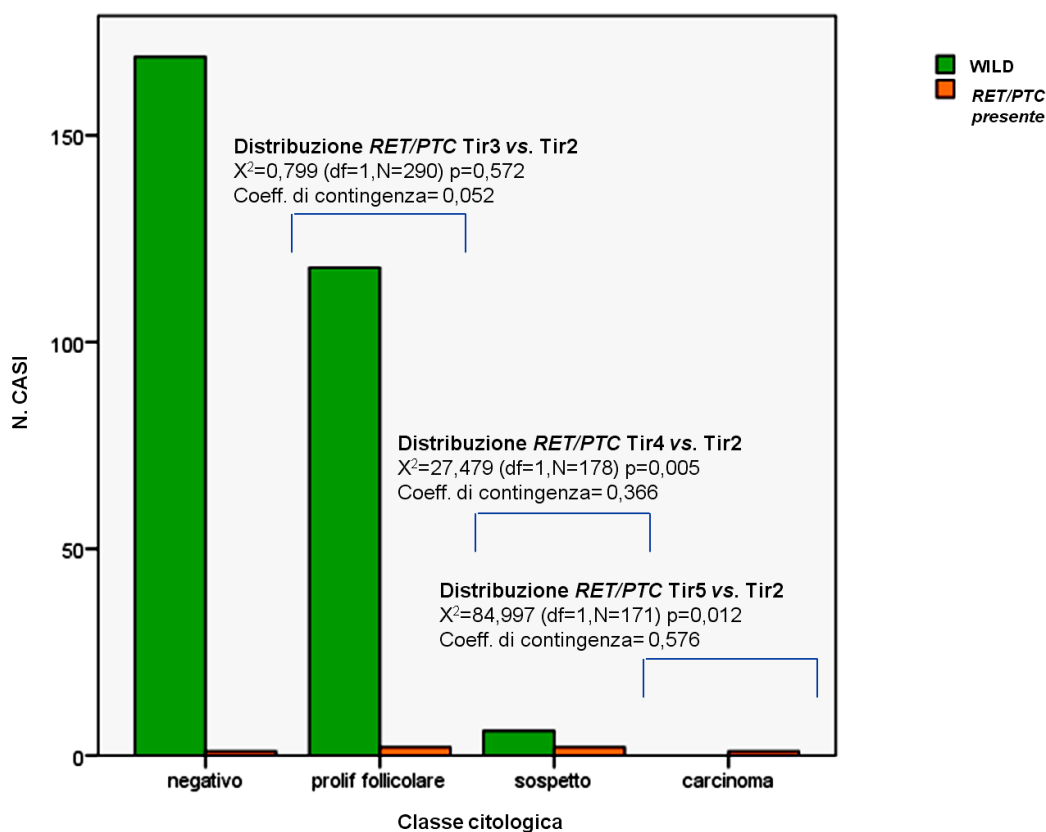


Figura 55.

## 6 CONFRONTO TRA DATO ISTOLOGICO E RISULTATO DELL'ANALISI MOLECOLARE

Per 93 noduli della casistica analizzata si è reso disponibile il dato istologico. La distribuzione dei noduli con istologia positiva o negativa nelle diverse classi citologiche è riportata nella tabella 21. Risulta interessante osservare come 51 campioni (81%) appartenenti alla classe dei Tir3 all'esame istologico non si siano dimostrati noduli di natura maligna, pertanto noduli per i quali l'asportazione chirurgica non sarebbe stata necessaria, mentre tutti campioni delle classi Tir4 e Tir 5 si sono confermati essere carcinomi all'esame istologico. Soltanto un campione con citologia Tir2 si è rivelato all'analisi istologica un nodulo positivo con diagnosi di carcinoma papillare della tiroide e, in particolare, portatore della mutazione p.V600E nel gene *BRAF* alla analisi molecolare.

**Tabella 21. Distribuzione delle istologie positive e negative nelle diverse classi citologiche.**

ISTOLOGIA	Tir- classe citologica					Totale
	1- non diagnostico	2- negativo	3- prolifer follicolare	4- sospetto	5- carcinoma	
negativa	1	3	51	0	0	55
positiva	0	1 <sup>BRAFp.V600E</sup>	12	13	12	38
Totale	1	4	63	13	12	93

Due campioni sono stati esclusi dalle successive analisi perché risultati inadeguati per l'analisi molecolare secondo i parametri definiti in precedenza, in particolare un campione con istologia negativa della classe dei Tir1 e un campione con istologia positiva della classe dei Tir4.

La distribuzione dei geni risultati alterati all'analisi molecolare nei diversi sottotipi, suddivisi per istologia negativa o positiva, è riportata nelle successive tabelle 22 e 23.

**Tabella 22. Distribuzione delle mutazioni identificate nelle diverse varietà di istologie negative.**

ISTOLOGIA NEGATIVA varietà		struma colloidocistico	adenoma follicolare	adenoma a cell di Hurtle	Totale
MUTAZIONI	<b>BRAF p.V600E</b>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	0	1
	<b>HRAS p.Q61K</b>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	2
	<b>KRAS p.G12A</b>	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	1
	<b>KRAS p.G12D</b>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	0	1
	<b>NRAS p.Q61R</b>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	2 <sup>(1)Tir3</sup>	4
	<b>WT</b>	14 <sup>(1)Tir2(13)Tir3</sup>	16 <sup>(1)Tir2(15)Tir3</sup>	8 <sup>(8)Tir3</sup>	38
Totale		18	20	10	48

<sup>(N)Tir2</sup>: numero di casi provenienti da classe citologica Tir2

<sup>(N)Tir3</sup>: numero di casi provenienti da classe citologica Tir3

Per quanto riguarda i campioni con istologia negativa non è possibile osservare una distribuzione significativamente diversa fra i diversi sottotipi. È importante indicare però la presenza di noduli che presentano una alterazione genetica (N=9). In particolare, è possibile osservare che in 8 su 47 campioni

totali è stata identificata una mutazione nei geni della famiglia RAS. Come già precedentemente affermato, mutazioni a carico dei geni RAS sembrano possedere una minore specificità poiché presenti anche a livello di adenomi tiroidei ma è, comunque, da considerare la possibilità che questi rappresentino marcatori estremamente precoci del processo di trasformazione neoplastica o che sia la loro stessa comparsa a determinare l'evoluzione del nodulo verso un fenotipo maligno. L'ampliamento della casistica potrebbe permettere, quindi, di definire il significato delle varianti genetiche individuate e permettere una stratificazione dei campioni in diverse classi di rischio di evoluzione neoplastica fin dal momento della diagnosi.

Nelle tabelle 24 e 25 è riportata la distribuzione rispetto ai criteri di stadiazione del TNM dei campioni, per i quali era disponibile l'informazione, in base al genotipo identificato mediante l'analisi molecolare.

**Tabella 23. Distribuzione delle mutazioni identificate nelle diverse varietà di istologie positive.**

MUTAZIONI	ISTOLOGIA POSITIVA varietà							Totale
	papillare	variante follicolare del papillare	con aree di dedifferenziazione	insulare	midollare	tumore follicolare a potenziale incerto	ka cell di hurtle	
<b>BRAF p.V600E</b>	11 <sup>(1)Tir2</sup>	2	1	0	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	15
<b>BRAF p.V600E KRAS p.G12A</b>	2	0	0	0	0	0	0	2
<b>BRAF p.V600E KRAS p.G12D</b>	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>HRAS p.Q61R</b>	0	0	0	0	1	0	0	1
<b>KRAS p.G12R</b>	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	0	0	0	0	1
<b>KRAS p.G60G+Q61K</b>	0	0	0	0	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	1
<b>NRAS p.Q61R</b>	0	0	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	0	0	0	1
<b>RET/PTC1</b>	3 <sup>(1)Tir3</sup>	0	0	0	0	0	0	3
<b>WT</b>	4 <sup>(2)Tir3</sup>	3 <sup>(3)Tir3</sup>	0	0	0	1 <sup>(1)Tir3</sup>	1 <sup>(1)Tir3</sup>	9
Totale	22	6	1	1	1	3	1	35

<sup>(N)Tir2</sup>: numero di casi provenienti da classe citologica Tir2

<sup>(N)Tir3</sup>: numero di casi provenienti da classe citologica Tir3

**Tabella 24. Distribuzione dei genotipi nelle diverse categorie della classe T secondo la stadiazione TNM.**

		GENOTIPO					Totale
		<i>WT</i>	<i>BRAF</i>	<i>RET</i> <i>/PTC</i>	<i>NRAS</i>	<i>KRAS</i>	
T	T1a < 1 cm	2	3	0	0	1	6
	T1b > 1cm	4	5	2	0	0	11
	T2=2-4 cm	1	0	0	0	0	1
	T3 infiltrante gli stromi	1	8	1	1	0	11
	T4 infiltrante diffuso agli stromi connettivo- adiposi peritiroidei	0	1	0	0	0	1
Totale		8	17	3	1	1	30

**Tabella 25. Distribuzione dei genotipi nelle diverse categorie della classe N secondo la stadiazione TNM.**

		GENOTIPO				Totale
		<i>WT</i>	<i>BRAF</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>KRAS</i>	
N	N0	1	3	0	1	5
	N1	0	5	1	0	6
Totale		1	8	1	1	11

In tabella 26 è, inoltre, riportata la associazione tra la presenza di una mutazione e la presenza o assenza di capsula. E' possibile osservare la tendenza per i campioni che presentano una mutazione nel gene *BRAF* sia a collocarsi negli stadi T3-T4 (carcinomi infiltranti) o nello stadio N1 (interessamento linfonodale) sia a provenire da noduli non capsulati (tabella 26) e unifocali, aspetti patologici considerati segno di maggiore aggressività. Ovviamente perché queste associazioni possano essere realmente considerate, al fine di ritenere una mutazione in *BRAF* non solo un parametro diagnostico ma anche una informazione prognostica, sarà necessaria la valutazione su una casistica più ampia e finemente caratterizzata.

**Tabella 26. Distribuzione dei genotipi dei campioni con istologia positiva in base alla presenza o assenza di capsula e di multifocalità.**

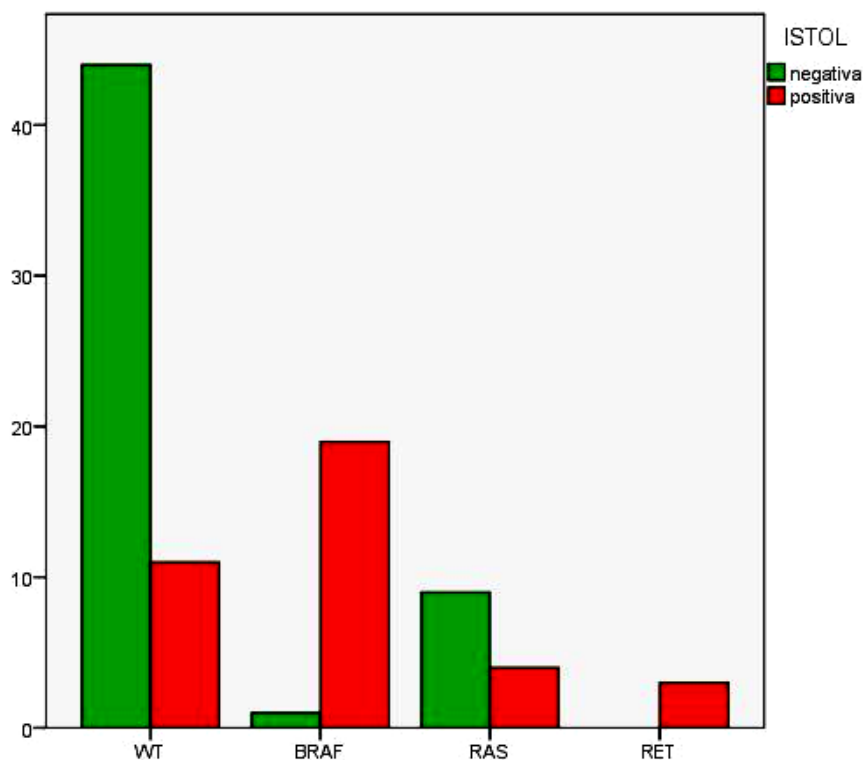
		GENOTIPO			Totale
		<i>WT</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	
capsula	capsulato	2	2	1	5
	non capsulato	0	12	0	12
Totale		2	14	1	17

La distribuzione delle diverse alterazioni nella casistica disponibile, raggruppate per tipo o famiglia di gene coinvolto, nei campioni con istologia positiva e negativa è risultata statisticamente significativa ( $X^2=39,112(df=3,N=91)$ ; coefficiente di contingenza= 0,548;  $p<0,000$ ).

La significatività dell'analisi è mantenuta raggruppando i casi semplicemente per presenza o assenza di una mutazione ( $X^2=24,594(df=1,N=91)$ ; coefficiente di contingenza= 0,461;  $p<0,000$ ).

**Tabella 27. Distribuzione dei genotipi in base al responso istologico.**

Genotipo		ISTOLOGIA		Totale
		negativa	positiva	
<b>WT</b>	N	44	11	55
	% entro ISTOL	81,5%	29,7%	60,4%
<b>BRAF<sup>mut</sup></b>	N	1	19	20
	% entro ISTOL	1,9%	51,4%	22,0%
<b>RAS<sup>mut</sup></b>	N	9	4	13
	% entro ISTOL	16,7%	10,8%	14,3%
<b>RET/PTC<sup>presente</sup></b>	N	0	3	3
	% entro ISTOL	0,0%	8,1%	3,3%
<b>Totale</b>	N	54	37	91
	% entro ISTOL	100,0%	100,0%	100,0%

**Figura 56. Rappresentazione grafica della frequenza dei genotipi per responso istologico.**

È stata, inoltre, anche in questo caso valutata la significatività della distribuzione prendendo singolarmente in esame ogni gene, o famiglia di geni, per valutare il diverso contributo di ognuno di essi nella identificazione di noduli di natura potenzialmente neoplastica. I risultati della analisi sono riportati nei grafici delle figure successive Figure 57-60. La presenza di mutazioni nel gene *BRAF* è confermato come l'evento più fortemente associato alla malignità di un nodulo. È importante considerare, però, che

nella maggior parte dei casi, come nella nostra casistica, la variante di carcinoma più frequente e, quindi, la maggior parte dei campioni positivi all'istologia è rappresentata dalla forma classica di carcinoma papillare nella quale le mutazioni di *BRAF* sono le più comunemente descritte. Di grande importanza sarebbe, quindi, la identificazione di marcatori che fossero allo stesso modo specifici per le altre forme di carcinoma e, soprattutto, per la distinzione fra diverse forme di proliferazione follicolare.

Per quanto riguarda la distribuzione dei geni della famiglia RAS è opportuno mettere in evidenza la loro bassa correlazione con il risultato istologico positivo. È, infatti, maggiore il numero di campioni mutati tra i reperti con istologia negativa rispetto a quelli con istologia positiva. È confermato, quindi, che le mutazioni a carico dei geni RAS non rappresentano marcatori specifici di neoplasia. La presenza di mutazioni a carico questi geni in 5 campioni risultati, in seguito, adenomi all'esame istologico permette però di supporre che l'evento mutazionale possa rappresentare un avvenimento estremamente precoce in grado di determinare un diverso decorso della lesione rispetto ai casi wild-type per ogni marcatore. A rafforzare tale ipotesi è la identificazione di 5 campioni nella casistica totale, 3 dei quali appartenenti alla classe dei Tir 5 e confermati carcinomi all'esame istologico, portatori contemporaneamente di una mutazione nel gene *BRAF* e di una mutazione a carico di un gene RAS. Risulta impossibile stabilire quale dei due eventi mutazionali sia il più precoce ma probabilmente la perdita di regolazione cellulare dovuta a uno di essi potrebbe essere un fattore coinvolto nella comparsa della successiva alterazione. Potrebbe, quindi, essere opportuno considerare i noduli nei quali è stata identificata una mutazione, anche in marcatori meno specifici come i geni *RAS*, soggetti comunque ad un decorso meno favorevole e, pertanto, valutare se per essi sia opportuno stabilire un diverso tipo di monitoraggio o approntare un percorso terapeutico più appropriato.

Per quanto riguarda i riarrangiamenti cromosomici *RET/PTC* essi sembrano rappresentare, nei casi analizzati nello studio, marcatori specifici di neoplasia. La loro frequenza risulta, però, estremamente bassa nella casistica in esame e pertanto un parametro che, usato singolarmente, non è in grado di incrementare o migliorare la individuazione di noduli potenzialmente di natura neoplastica.

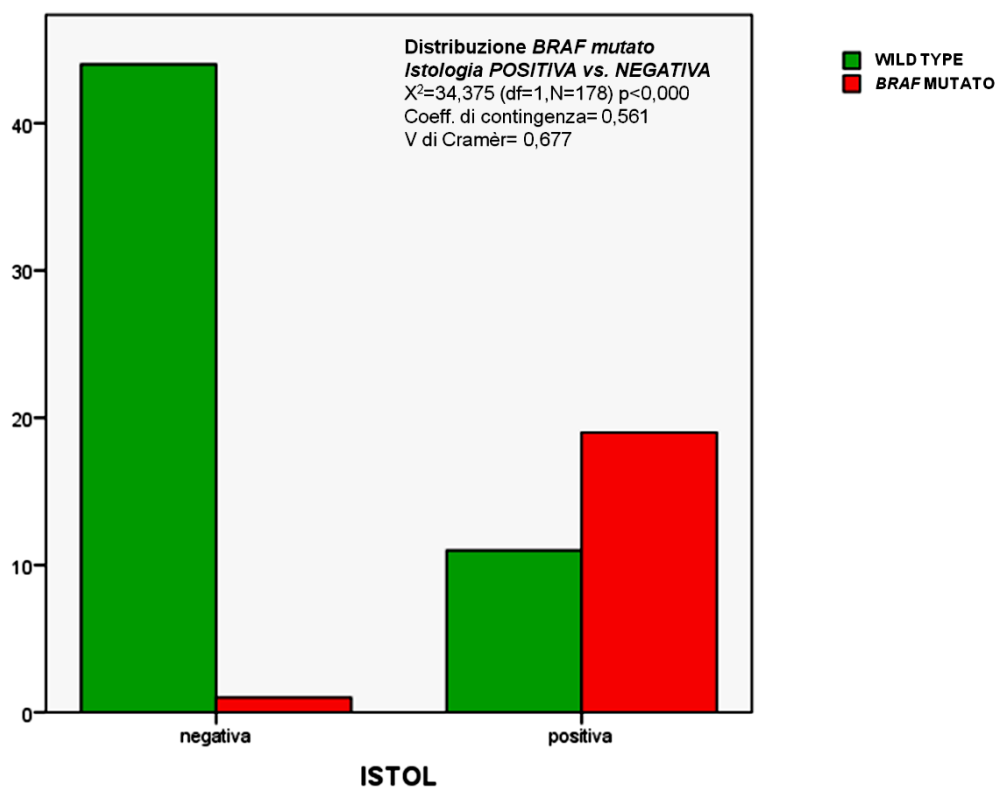


Figura 57. Distribuzione dei campioni suddivisi in base al responso dell'esame istologico tra mutati e non in relazione al gene *BRAF*.

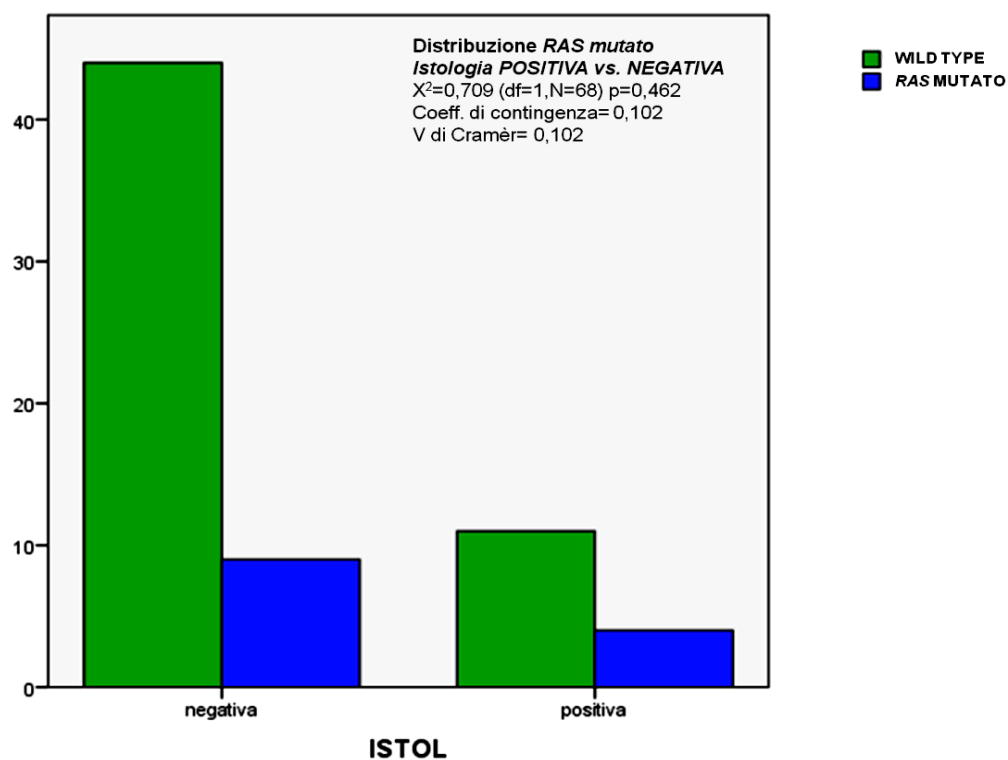
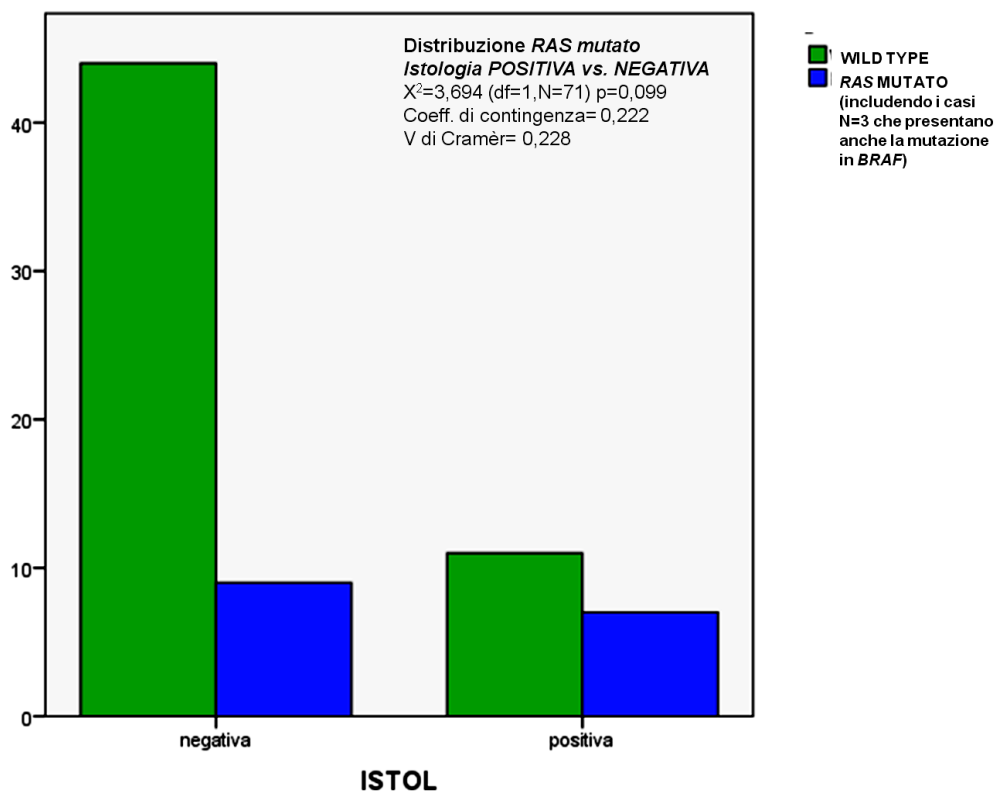
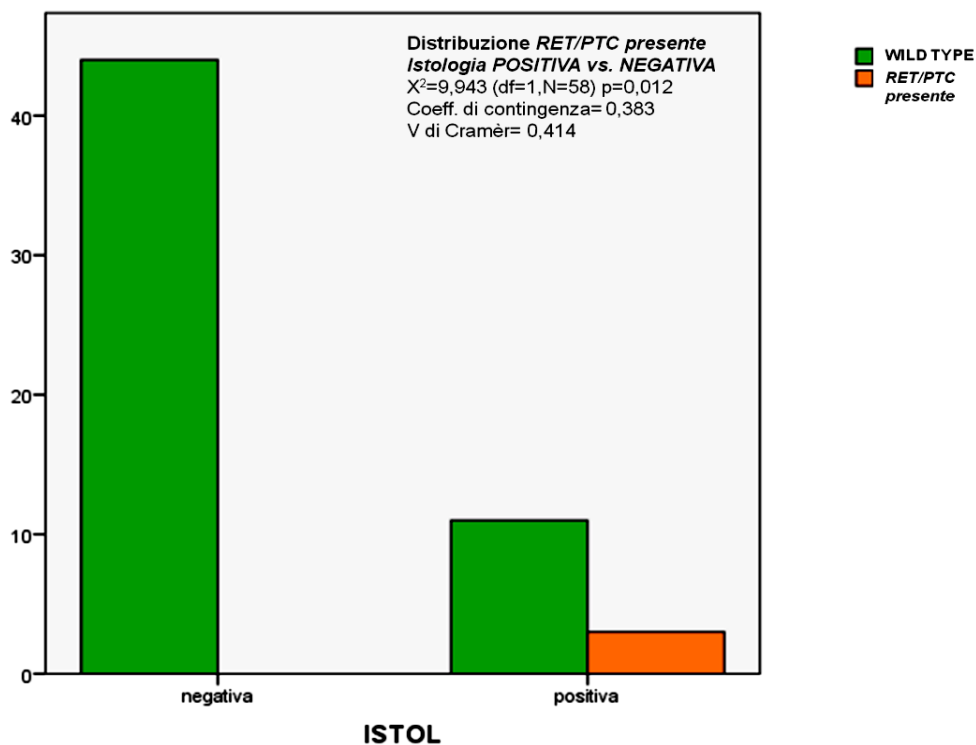


Figura 58. Distribuzione dei campioni suddivisi in base al responso dell'esame istologico tra mutati e non in uno dei geni della famiglia *RAS*.





**Figura 59.** Distribuzione dei campioni suddivisi in base al responso dell'esame istologico tra mutati e non in uno dei geni della famiglia *RAS*, includendo nella analisi N=3 campioni portatori anche della mutazione *BRAF* p.V600E.



**Figura 60.** Distribuzione dei campioni suddivisi in base al responso dell'esame istologico tra positivi e non per la presenza di un riarrangiamento cromosomico *RET/PTC*.

Infine, per valutare il valore diagnostico della indagine molecolare è stato considerato il risultato della istologia come il *gold standard* di riferimento e determinato in relazione ad ogni gene il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) della identificazione o della mancata individuazione di mutazioni a carico di esso oltre che la sensibilità, la specificità e l'accuratezza determinata dal test.

Per questa analisi sono stati considerati:

- campioni VP (veri positivi): campioni che presentavano una mutazione nel gene e sono risultati positivi alla istologia;
- campioni VN (veri negativi): campioni nei quali non è stata individuata nessuna mutazione nel gene e sono risultati negativi alla istologia;
- campioni FN (falsi negativi): campioni nei quali non è stata individuata nessuna mutazione nel gene ma sono risultati positivi alla istologia;
- campioni FP (falsi positivi): campioni che presentavano una mutazione nel gene ma sono risultati negativi alla istologia.

Utilizzando le tavole di contingenza costruite come la seguente

		MUTATO	
		NO	SI
ISTOL	negativa	VN	FP
	positiva	FN	VP

i valori sono stati così calcolati:

$$\text{VPP} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP});$$

$$\text{VPN} = \text{VN} / (\text{FN} + \text{VN});$$

$$\text{Sensibilità} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN});$$

$$\text{Specificità} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP});$$

$$\text{Accuratezza} = (\text{VP} + \text{VN}) / (\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}).$$

Considerando complessivamente il pannello di tutti i marcatori in esame i valori ottenuti sono stati i seguenti:

		MUTATO		Totale
		NO	SI	
ISTOL	negativa	44	10	54
	positiva	11	26	37
Totale		55	36	91

VPP= 0,72    Sensibilità= 0,70

VPN= 0,80    Specificità= 0,81

Accuratezza= 0,77

Mentre stratificando i campioni per singolo gene analizzato:

- per le mutazioni a carico del gene *BRAF*:

		BRAF MUTATO		Totale
		NO	SI	
ISTOL	negativa	53	1	54
	positiva	18	19	37
Totale		71	20	91

VPP= 0,95    sensibilità= 0,51

VPN= 0,83    specificità= 0,98

Accuratezza= 0,79

- per le mutazioni a carico dei geni della famiglia *RAS*:

		RAS MUTATO		Totale
		NO	SI	
ISTOL	negativa	45	9	54
	positiva	33	4	37
Totale		78	13	91

VPP= 0,31    sensibilità= 0,11

VPN= 0,58    specificità= 0,83

Accuratezza= 0,54

- per le mutazioni a carico dei geni della famiglia *RAS*, includendo i campioni con doppia mutazione:

		<b>RAS* MUTATO</b>		Totale
		<b>NO</b>	<b>SI</b>	
<b>ISTOL</b>	<b>negativa</b>	45	9	54
	<b>positiva</b>	30	7*	37
Totale		75	16	91

\*(con N=3 campioni mutati anche in *BRAF*)

VPP= 0,54      sensibilità= 0,19

VPN= 0,60      specificità= 0,83

Accuratezza= 0,57

- per la presenza di un gene di fusione *RET/PTC*:

		<b>RET/PTC PRESENTE</b>		Totale
		<b>NO</b>	<b>SI</b>	
<b>ISTOL</b>	<b>negativa</b>	54	0	54
	<b>positiva</b>	34	3	37
Totale		88	3	91

VPP= 1,00      sensibilità= 0,08

VPN= 0,61      specificità= 1,00

Accuratezza= 0,63

## V. CONCLUSIONI

L'individuazione di un nodulo tiroideo rappresenta una scoperta clinica sempre più frequente a seguito dell'elevato numero di casi riscontrati accidentalmente nel corso di esami strumentali con tecniche di imaging. Le cause di insorgenza possono rivelarsi estremamente varie e il percorso diagnostico persegue come obiettivi principali la esclusione della natura maligna della lesione e la selezione della strategia terapeutica più appropriata. Il carcinoma tiroideo, pur rappresentando la più frequente neoplasia a carico del sistema endocrino, è causa soltanto del 5-15% di tutte le tireopatie nodulari e mostra una diversa incidenza nella popolazione affetta sulla base di una stratificazione per età e sesso oltre che per familiarità e fattori ambientali. L'esame citologico del materiale agoaspirato (FNAB - Fine Needle Aspiration Biopsy) rappresenta, ad oggi, il metodo di indagine più adeguato per la diagnosi differenziale tra noduli maligni e benigni. La valutazione del materiale biotico si è dimostrata, infatti, lo strumento più efficiente per la selezione dei pazienti per i quali esiste un sospetto di patologia neoplastica e, quindi, opportunamente da indirizzare verso l'asportazione chirurgica del nodulo. L'introduzione della analisi citologica nella gestione ordinaria di queste patologie ha portato, infatti, ad una notevole riduzione del numero di interventi chirurgici su pazienti trattabili con un approccio conservativo tuttavia, a causa di limiti intrinseci della analisi, per circa un terzo dei pazienti non consente di raggiungere una diagnosi definitiva.

L'incapacità da parte della sola citologia di mettere chiaramente in evidenza la presenza o dimostrare inequivocabilmente l'assenza di cellule neoplastiche in alcuni preparati citologici può spesso portare alla necessità di effettuare una emitiroidectomia con finalità principalmente di tipo diagnostico. In larga parte dei casi, infatti, è solo l'esame istologico a determinare in maniera inequivocabile la natura benigna della lesione dimostrando, però, la inopportunità dell'intervento chirurgico. Allo stesso modo la constatazione della natura maligna del nodulo può portare, dopo l'iniziale chirurgia subottimale, all'occorrenza di un secondo intervento di tipo ablativo. La classificazione indeterminata su base citologica del nodulo si può tradurre, quindi, in una gestione esacerbata o inadeguata della patologia.

La dimostrazione che noduli positivi per la presenza di alterazioni genetiche sono a più alto rischio di malignità ha portato ad una possibile revisione delle procedure di selezione dei pazienti da indirizzare in prima istanza alla chirurgia. Il miglioramento della accuratezza diagnostica dato dalla combinazione dell'esame citologico con l'analisi molecolare potrebbe, infatti,

dettare le basi per una scelta più ponderata fin dal risultato della prima biopsia, in particolare, per i pazienti che presentano noduli classificati come Tir3 ovvero come proliferazioni follicolari di incerto significato.

Negli ultimi dieci anni, diversi marcatori molecolari sono emersi come possibili strumenti diagnostici per risolvere questo limite. Test per la valutazione della presenza di mutazioni somatiche [11;19;20;53;58;59], l'analisi del profilo di espressione di geni selezionati [60-62] e, più recentemente, l'analisi di miRNA [63-65] sono stati tutti impiegati in lesioni tiroidee indeterminate con ragionevole successo.

Nonostante ancora non sia chiaramente definito se lo studio di un pannello che comprende le alterazioni genetiche più frequenti, quali quelle a carico di *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC* e *PAX8/PPAR-γ*, possa essere in grado di modificare la gestione delle lesioni tiroidee indeterminate, un crescente numero di lavori ha dimostrato effettivi miglioramenti nella accuratezza diagnostica correlati all'impiego della biologia molecolare nella caratterizzazione differenziale delle proliferazioni follicolari. In ragione dell'acquisizione di tali conoscenze, nelle ultime linee guida per la gestione dei noduli tiroidei e dei carcinomi differenziati della tiroide [13] è stata considerata nella raccomandazione N.8 la possibile applicazione di marcatori molecolari per il miglioramento della gestione clinica dei pazienti con noduli di natura indeterminata. È importante, comunque, ricordare che l'impatto della biologia molecolare sulla cura clinica dei pazienti necessita ancora di essere convalidato mediante studi prospettici che prevedano la standardizzazione dei criteri adottati per l'analisi in laboratori indipendenti ma anche per la definizione accurata delle caratteristiche citomorfologiche dei noduli studiati e per la raccolta ed elaborazione dei dati relativi all'outcome del paziente.

Il principale obiettivo del nostro studio è stato la ottimizzazione di un protocollo rapido ed affidabile per l'analisi molecolare dei principali marcatori tumorali impiegati per finalità diagnostiche nell'ambito dei carcinomi differenziati della tiroide. La prima fase del lavoro ha comportato il disegno e la validazione di saggi per il rilevamento sia di varianti somatiche puntiformi sul campione di DNA, a carico del gene *BRAF* e dei geni *RAS*, sia di riarrangiamenti cromosomici mediante lo studio dei trascritti prodotti dai geni di fusione *RET/PTC* e *PAX8/PPARγ*. Il coinvolgimento di diversi geni nel processo di carcinogenesi tiroidea comporta, infatti, la valutazione contemporanea di un pannello di marcatori relativamente ampio ed eterogeneo. La necessità di allestire un protocollo che fosse accurato e, allo stesso tempo, compatibile con la portata dei campioni previsti da una sua potenziale applicazione nella pratica clinica, si è sommata alla ricerca del

disegno di un metodo sensibile, specifico e omogeneo per lo studio delle diverse alterazioni in esame. L'analisi di melting come metodo di pre-screening e di selezione dei campioni positivi, che necessitano di un approfondimento mediante sequenziamento diretto, ha mostrato le caratteristiche desiderate sia in termini di sensibilità e specificità sia perchè rappresenta un sistema di rilevazione estremamente semplice, a basso costo e rapido nel fornire un risultato. La tecnica, infatti, permette in tempi estremamente contenuti l'analisi di più campioni e più marcatori in parallelo. Inoltre, anche nel presente studio, è stata confermata la capacità della HRMA di individuare campioni portatori di mutazioni causate da diversi tipi di sostituzione nucleotidica. È necessario considerare, infatti, che variazioni di sequenza rare, come mutazioni in tandem, non risultano evidenziabili tramite saggi di genotipizzazione allele-specifici ma potrebbero possedere un potenziale significato dal punto di vista diagnostico. Da non sottovalutare, inoltre, è il contributo fornito dalla analisi del segnale di fluorescenza, ottenuto grazie all'impiego dell'intercalante del DNA, nella valutazione della idoneità del prodotto di amplificazione che rappresenta uno dei principali aspetti critici dell'analisi molecolare su campioni biologici estremamente esigui.

Lo studio di validazione del metodo ha dimostrato, mediante l'impiego di saggi di controllo, la possibilità di impiego non soltanto del materiale citologico vero e proprio per l'analisi molecolare ma anche del campione di lavaggio residuo. Soltanto 25 campioni su 430 lavaggi analizzati si sono, infatti, rivelati non idonei per l'analisi molecolare, 14 dei quali risultavano appartenenti alla classe dei Tir1 ossia campioni inadeguati anche per l'analisi citologica. La qualità e la quantità degli acidi nucleici purificati difatti è risultata sufficiente per l'allestimento dell'intero pannello di marcatori in esame e la attendibilità dei genotipi individuati è stata confermata su 45 coppie per i quali erano disponibili entrambe le tipologie di campione.

L'analisi delle alterazioni genetiche ha confermato che la mutazione riscontrata con maggior frequenza nel contesto dei carcinomi differenziati della tiroide è rappresentata dalla p.V600E nel gene *BRAF*. Il dato risulta coerente con la incidenza nettamente superiore di carcinomi papillari, rispetto alle altre varianti di carcinoma differenziato, per i quali sembra essere un marcatore estremamente specifico. Anche nella nostra casistica con istologia di riferimento, 14 su 22 carcinomi papillari mostrano la presenza della mutazione. L'analisi del marcatore ha, inoltre, permesso la individuazione di 6 positivi per la mutazione in campioni classificati alla analisi citologica come lesioni di natura benigna. Soltanto per uno di questi noduli si è resa disponibile la istologia la quale ha fornito un risultato concorde con l'analisi

molecolare trattandosi effettivamente di un carcinoma papillare della tiroide e contribuendo così ad avvalorare il valore predittivo positivo del marcatore. Un unico campione negativo all'istologia è risultato mutato in *BRAF* durante lo screening molecolare del rispettivo campione citologico. Data la forte specificità del marcatore è possibile supporre la presenza di cellule mutate a livello di microaree pre-cancerose del nodulo non rilevabili mediante la osservazione del tessuto ma in grado di essere individuate grazie alla analisi molecolare.

La presenza di un riarrangiamento cromosomico *RET/PTC*, come la identificazione di *BRAF* mutato, ha mostrato un potente significato diagnostico. Tre campioni portatori del riarrangiamento *RET/PTC1* sono stati confermati all'esame istologico carcinomi papillari della tiroide. L'unico campione identificato come positivo per *RET/PTC3* è stato classificato come nodulo benigno all'analisi citologica ma l'esame istologico ha ridefinito la diagnosi come una proliferazione follicolare di incerto significato.

Al momento nessun campione ha mostrato la presenza di riarrangiamenti di *PAX8/PPAR $\gamma$* , motivo per il quale potrà essere considerata la rimozione di tale marcatore dal pannello in esame e la sostituzione con nuovi marcatori.

Lo studio ha, inoltre, incluso l'analisi di mutazioni a carico delle tre isoforme di *RAS*. Mutazioni che coinvolgono questi geni sono state frequentemente descritte anche a livello di adenomi tiroidei. Nella nostra casistica otto campioni portatori di una mutazione a carico dei geni della famiglia *RAS* sono risultati negativi e soltanto quattro positivi all'esame istologico. Questo induce a considerare *RAS* come un marcatore meno specifico di neoplasia. Allo stesso tempo è importante considerare la possibilità che mutazioni a carico di questi geni insorgano in fasi estremamente precoci del processo di trasformazione neoplastica o che sia la loro stessa comparsa a determinare l'evoluzione del nodulo verso un fenotipo maligno [25]. Da questo punto di vista risulta estremamente interessante la identificazione di quattro campioni portatori contemporaneamente della mutazione *BRAF* p.V600E e di una mutazione a livello dei geni *RAS*. È possibile supporre, infatti, sia l'eventuale presenza di popolazioni cellulari multiclonali a livello del nodulo sia che la comparsa di una delle due mutazioni abbia contribuito, alterando processi fondamentali della crescita e regolazione cellulare, alla acquisizione della seconda mutazione. In ragione di questa ultima ipotesi, un nodulo portatore di una alterazione a carico di *RAS* potrebbe rappresentare comunque una lesione a maggior rischio, seppure solo potenzialmente nel momento della diagnosi, di trasformazione neoplastica.

L'ultimo aspetto dei risultati ottenuti da considerare è la valutazione,



sebbene su una casistica ridotta, dei livelli di sensibilità e specificità raggiunti comparando il risultato della analisi molecolare con il dato istologico. L'impiego dell'intero pannello di marcatori ha mostrato una sensibilità del 70% e una specificità dell'81%. Il calcolo dei valori ottenuti considerando singolarmente ogni tipo di alterazione ha permesso di confermare che il maggior contributo alla significatività diagnostica del test è fornito dallo studio dello stato mutazionale del gene *BRAF*. La possibilità di ottenere nel corso del tempo ulteriori informazioni diagnostiche e cliniche per un maggior numero di pazienti potrebbe, però, consentire una rivalutazione dell'effetto apportato dagli altri geni. Inoltre, sarà opportuno considerare la rielaborazione del pannello e la introduzione di nuovi marcatori in modo da incrementare la accuratezza dell'esame molecolare. A tale scopo risulterà molto importante la possibilità di impiegare per lo screening molecolare nuove piattaforme con più rapida ed elevata produzione di risultati.

## VI. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] <http://globocan.iarc.fr/>

[2] De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA *CANCER Principles & Practice of Oncology*. Chapter 37.2 (Section 2): 1629-1648.

[3] Biersack HJ, Grünwald F *Thyroid Cancer*. Chapter 1(Part 1): 4.

[4] Eszlinger M, Paschke 2010 Molecular fine-needle aspiration biopsy diagnosis of thyroid nodules by tumor specific mutations and gene expression patterns. *Mol Cell Endocrinol*; 322(1-2): 29-37.

[5] Gimm O 2001 Thyroid Cancer. *Cancer Lett*; 163(2): 143-156.

[6] Mazzaferri EL, Jhiang SM 1994 Long-Term Impact of Initial Surgical and Medical Therapy on Papillary and Follicular Thyroid Cancer. *Am J Med*; 97(5): 418-428.

[7] Nikiforova MN, Nikiforov YE 2009 Molecular Diagnostics and Predictors in Thyroid Cancer. *Thyroid*; 19(12): 1351-1361.

[8] Rocchetti R, Bianchelli G, Tacaliti A, Cavicchi A, Braccioni F, Braccioni U 2004 Medullary Thyroid Carcinoma and Genetic Screening. *Journal of Medicine and the Person*; 2(2): 69-72

[9] Denham MJ, Wills EJ 1980 A clinico-pathological survey of thyroid glands in old age. *Gerontology*; 26(3): 160-166.

[10] Melillo RM, Santoro M, Vecchio G 2010 Differential diagnosis of thyroid nodules using fine-needle aspiration cytology and oncogene mutation screening: are we ready? *F1000 Med Rep*; 2: 62.

[11] Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN 2009 Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab*; 94(6): 2092-2098.

[12] Gharib H, Papini E, Paschke R, Duik DS, Valcavi R, Hegedüs L, Vitti P *et al.* 2010 American Association of Clinical Endocrinologist, Associazione Medici Endocrinologi and European Thyroid Association Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. *Endocr Pract*; 16(Suppl 1): 1-43.

[13] Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM 2009 Revised American Thyroid Association Management Guidelines

for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*; 19(11): 1167-1214.

**[14]** Radović B, Tatić S, Jaksić EK, Han R 2010 Cytological findings in scintigraphically nonfunctioning thyroid nodules. *Vojnosanit Pregl*; 67(10): 797-801.

**[15]** Hegedüs L 2004 Clinical Practice. The Thyroid Nodule. *N Eng J Med*; 351(17): 1764-1771.

**[16]** Bagga PK, Mahajan NC 2010 Fine needle aspiration cytology of thyroid swellings: How useful and accurate is it? *Indian J Cancer*; 47(4): 437-442.

**[17]** Layfield LJ, Cibas ES, Baloch Z 2010 Thyroid fine needle aspiration cytology: a review of the National Cancer Institute state of the science symposium. *Cytopathology*; 21(2): 75-85.

**[18]** Park KT, Ahn SH, Mo JH, Park YJ, Park do J, Choi S, Park SY 2011 Role of Core Needle Biopsy and Ultrasonographic Findings in Management of Indeterminate Thyroid Nodules. *Head Neck*; 33(2): 160-165.

**[19]** Ohori NP, Nikiforova MN, Schoedel KE, LeBeau SO, Hodak SP, Seethala RR, Carty SE, Ogilvie JB, Yip L, Nikiforov YE 2010 Contribution of Molecular Testing to Thyroid Fine-needle Aspiration Cytology of "Follicular Lesion of Undetermined Significance/ Atypia of Undetermined Significance". *Cancer Cytopathol*; 118(1): 17-23.

**[20]** Moses W, Weng J, Sansano I, Peng M, Khanafshar E, Ljung BM, Duh QY, Clark O, Kebebew 2010 Molecular Testing for Somatic Mutations Improves the Accuracy of Thyroid Fine-needle Aspiration Biopsy. *World J Surg*; 34(11): 2589-2594.

**[21]** Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Moretti MI, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Fenzi G, Rossi G, Vitale M 2011 Prevalence of *RET/PTC* rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application. *Endocr J*; 58(1): 31-38.

**[22]** Seningen JL, Nassar A, Henry MR 2010 Correlation of Thyroid Nodule Fine-Needle Aspiration Cytology with Corresponding Histology at Mayo Clinic, 2001-2007: An Institutional Experience of 1,945 Cases. *Diagn Cytopathol*; 00: 000.

**[23]** Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, Wang H, Kebebew E, Steward DL, Zeiger MA, Westra WH, Wang Y, Khanafshar E, Fellegara G, Rosai J, LiVolsi V, Lanman RB 2011 A Large Multicenter Correlation Study of Thyroid Nodule Cytopathology and Histopathology. *Thyroid*; 21(3): 243-251.

**[24]** Amrikachi M, Ramzy I, Rubinfeld S, Wheeler TM 2001 Accuracy of Fine-Needle Aspiration of Thyroid. *Arch Pathol Lab Med*; 125(4): 484-488.

- [25] Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE 2003 *RAS* Point Mutations and *PAX8-PPAR $\gamma$*  Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 88(5): 2318-2326.
- [26] Neri G, Genuardi M. *Genetica Umana e Medica*. 2nd Edition. Capitolo 10. Elsevier Srl.
- [27] Gianoukakis AG, Giannelli SV, Salameh WA, McPhaul LW 2011 Well differentiated follicular thyroid neoplasia: Impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Mol Cell Endocrinol*; 332(1-2): 9-20.
- [28] Xing M 2007 *BRAF* Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases and Clinical Implications. *Endocr Rev*; 28(7): 742-762.
- [29] 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 2003 *BRAF* Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 88(11): 5399-5404.
- [30] Greco A, Borrello MG, Miranda C, Degli'Innocenti D, Pierotti MA 2009 Molecular Pathology of differentiated thyroid cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging*; 53(5): 440-453.
- [31] Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M 2006 *PAX8-PPAR $\gamma$*  Rearrangement Is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 91(1): 213-220.
- [32] Nikiforov YE 2008 Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. *Mod Pathol*; 21(Suppl 2): S37-S43.
- [33] Lui WO, Foukakis T, Lidén J, Thoppe SR, Dwight T, Höög A, Zedenius J, Wallin G, Reimers M, Larsson C 2005 Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a *PAX8-PPAR $\gamma$*  fusion oncogene. *Oncogene*; 24(8): 1467-1476.
- [34] Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Borganzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G 1990 PTC is a novel rearranged form of the *ret* proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*; 60(4): 557-563.
- [35] Nikiforov YE 2002 *RET/PTC* rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*; 13(1): 3-16.
- [36] Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M, Salvatore G, Chiappetta G, Pacini F, Elisei R, Miccoli P, Pinchera A, Fusco A, Santoro M 2002 Potent Mitogenicity of the *RET/PTC3* Oncogene Correlates

with its Prevalence in Tall-Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Pathol*; 160(1): 247-254.

**[37]** Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA 2003 High Prevalence of *BRAF* Mutations in Thyroid Cancer: Genetic Evidence for Constitutive Activation of the RET/PTC-RAS-BRAF Signaling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Res*; 63(7): 1454-1457.

**[38]** Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE 2000 Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*; 290(5489): 138-141.

**[39]** Gandhi M, Dillon LW, Pramanik S, Nikiforov YE, Wang YH 2010 DNA Breaks at Fragile Sites Generate Oncogenic *RET/PTC* Rearrangements in Human Thyroid Cells. *Oncogene*; 29(15): 2272-2280.

**[40]** Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, Kastner P, Zurnadzhy L, Tronko N, Hutzler P, Thomas G 2004 Heterogeneity in the Distribution of *RET/PTC* Rearrangements within Individual Post-Chernobyl Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 89(9): 4272-4279.

**[41]** Vakiani E, Solit DB 2011 KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*; 223(2): 219-229.

**[42]** Xing M 2005 *BRAF* Mutation in Thyroid Cancer. *Endocr Relat Cancer*; 12(2): 245-262.

**[43]** [www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic)

**[44]** Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, Pinchera A, Bevilacqua G 2009 A Morpho-Molecular Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma: *BRAF* V600E Detection as an Important Tool in Preoperative Evaluation of Fine-Needle Aspirates. *Thyroid*; 19(8): 837-842.

**[45]** Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson W 2005 *BRAF* Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*; 90(12): 6373-6379.

**[46]** Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, De Micco C 2003 Specific Pattern of *RAS* Oncogene Mutations in Follicular Thyroid Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 88(6): 2745-2752.

**[47]** Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE 2009 *RAS* Mutations Are the Predominant Molecular Alteration in Poorly Differentiated Thyroid Carcinomas and Bear Prognostic Impact. *J Clin Endocrinol Metab*; 94(12): 4735-4741.

- [48]** Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fisher AH, Nikiforov YE 2003 Molecular Profile and Clinical-Pathologic Features of the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Clin Pathol*; 120(1):71-77.
- [49]** Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA 2000 *PAX8/PPAR $\gamma$ 1* Fusion in Oncogene Human Thyroid Carcinoma. *Science*; 289(5483): 1357-1360.
- [50]** Fagin JA, Mitsiades N 2008 Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 22(6): 955-969.
- [51]** Paes JE, Ringel MD 2008 Dysregulation of the Phosphatidylinositol 3-kinase Pathway in Thyroid Neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 37(2): 375-387.
- [52]** Chao MV, Rajagopal R, Lee FS 2006 Neurotrophin signaling in health and disease. *Clin Sci*; 110(2): 167-173.
- [53]** Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brilli L, Montanaro A, Pacini F 2010 Impact of Proto-oncogene Mutation Detection in Cytological Specimens from Thyroid Nodules Improves the Diagnostic Accuracy of Biopsy. *J Clin Endocrinol Metab*; 95(3): 1365-1369.
- [54]** Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Sebastiani M, Colaci M, Ruffilli I, Fallahi P 2010 New Targeted Molecular Therapies for Dedifferentiated Thyroid Cancer. *J Oncol*; 2010: 921682.
- [55]** Catalano MG, Poli R, Pugliese M, Fortunati N, Boccuzzi G 2010 Emerging molecular therapies of advanced thyroid cancer. *Mol Aspects Med*; 31(2): 215-226.
- [56]** Wells SA, Santoro M 2009 Targeting the RET Pathway in Thyroid Cancer. *Clin Cancer Res*; 15(23): 7119-7123.
- [57]** Petrone L, Mannucci E, De Feo ML, Parenti G, Biagini C, Panconesi R, Vezzosi V, Bianchi S, Boddi V, Di Medio L, Pupilli C, Forti G: A simple us score for the identification of candidates to fine needle aspiration of thyroid nodules. *J Endocrinol Invest* 2011, [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21975367.
- [58]** Filicori F, Keutgen XM, Buitrago D, AlDailami H, Crowley M, Fahey TJ 3rd, Zarnegar R. Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis. *Surgery*. 2011 Dec;150(6):1085-91.
- [59]** Kleiman DA, Zarnegar R, Fahey TJ 3rd. Reply to Preoperative BRAF(V600E)mutation screening is unlikely to alter initial surgical treatment of patients with indeterminate thyroid nodules: A prospective case series of 960 patients. *Cancer*. 2013 Dec 18. doi: 10.1002/cncr.28529. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24353098.

- [60]** Jin L, Lloyd RV, Nassar A *et al.* HMGA2 expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagn. Mol. Pathol.* 20(2), 71–80 (2011).
- [61]** Guerriero E, Ferraro A, Desiderio D *et al.* UbcH10 expression on thyroid fine-needle aspirates. *Cancer Cytopathol.* 118(3), 157–165 (2010).
- [62]** Chudova D, Wilde JI, Wang ET *et al.* Molecular classification of thyroid nodules using high-dimensionality genomic data. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(12), 5296–5304 (2010).
- [63]** Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(5), 1600–1608 (2008).
- [64]** Agretti P, Ferrarini E, Rago T *et al.* MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration. *Eur. J. Endocrinol.* 167(3), 393–400 (2012).
- [65]** Shen R, Liyanarachchi S, Li W *et al.* MicroRNA signature in thyroid fine needle aspiration cytology applied to 'atypia of undetermined significance' cases. *Thyroid* 22(1), 9–16 (2012).

**Allegato 1**

**Dichiarazione di consenso informato  
all'esecuzione di analisi molecolari su agoaspirato di  
noduli tiroidei**

Sig. / ra .....  
nato / a a ..... il .....

Io sottoscritto/a dichiaro:

- di effettuare volontariamente il test diagnostico propostomi, di cui mi sono stati spiegati e di cui ho compreso lo scopo, le procedure, i possibili rischi e benefici;
- di essere stato/a adeguatamente informato/a sull'esame e di aver inoltre aver preso visione delle informazioni contenute nell'allegato "Modulo informativo", parte integrante del presente documento di consenso, che precisano quanto mi è stato spiegato oralmente;
- di aver avuto la possibilità di discutere in dettaglio ogni particolare della procedura e di avere avuto una risposta chiara e completa ad ogni mia domanda, in breve di aver ricevuto un'informazione comprensibile ed esauriente.
- aver avuto il tempo necessario prima di decidere liberamente se accettare o meno la prestazione propostami;
- di accettare liberamente, spontaneamente ed in piena coscienza l'atto sanitario proposto e di essere comunque stato informato/a della possibilità di revocare, in qualsiasi momento prima dell'effettuazione dell'esame, il consenso eventualmente prestato.

Ciò considerato

**PRESTO il mio consenso all'atto sanitario proposto**

**Firma** .....

**Data** .....

Il medico che raccoglie la dichiarazione (timbro e firma) .....

Firenze, li .....

Nel caso di pazienti minori, interdetti o sottoposti ad amministrazione di sostegno, il consenso è validamente espresso dal/dal seguente/i soggetto/i legittimato/i:

Sig. / ra .....  
Nato / a a ..... il .....  
In qualità di .....

Sig. / ra .....  
Nato / a a ..... il .....  
In qualità di .....



## Allegato 2

**Informativa  
sull'esecuzione di analisi molecolari su agoaspirato di  
noduli tiroidei**

---

Negli ultimi dieci anni il riscontro di noduli tiroidei è divenuto un fenomeno comune, con una frequenza stimabile tra il 20 e il 76% nella popolazione generale; questo è soprattutto dovuto al miglioramento delle tecniche di diagnostica per immagini, che sono in grado di svelare la presenza di noduli di piccole dimensioni (<2cm) non evidenziabili all'esame clinico. Nel 5% dei casi, tali noduli possono essere associati a tumori tiroidei.

Secondo le recenti linee guida<sup>1</sup>, la metodica preferibile per la diagnosi differenziale tra tumore ed alterazione benigna del nodulo tiroideo è rappresentata dalla valutazione citologica del materiale ottenuto dal nodulo mediante agoaspirato eco-assistito.

In breve, viene prelevato dal nodulo, mediante una siringa, del materiale, sul quale viene anzitutto effettuato, presso l'Anatomia patologica dell'Azienda, un test citologico.

Già i risultati di questo test consentono una selezione accurata dei soggetti che realmente necessitano di intervento chirurgico.

I risultati dell'esame citologico sono divisi in cinque classi (non diagnostico, citodiagnosi benigna, lesione follicolare di incerto significato, campione con sospetto di malignità, citologia maligna positiva).

Mentre le indicazioni cliniche sono ovvie per la seconda classe (nessuna necessità di intervento) e per le ultime due (opportunità o anche necessità di intervenire), la categoria di referti riconducibile alla terza classe, quella delle "lesioni follicolari di incerto significato", è meno definita, e di fatto determina l'orientamento dei pazienti verso la chirurgia nonostante esista solo il 20-30% di probabilità che essi realmente siano affetti da un tumore tiroideo maligno.

Recenti studi<sup>2</sup> dimostrano che sarebbe utile ed importante poter integrare il risultato citologico dell'agoaspirato effettuando dei test molecolari; tali test hanno lo scopo di identificare mutazioni che insorgono solo nelle cellule potenzialmente tumorali consentendo di individuare noduli potenzialmente maligni: il risultato positivo del test molecolare (presenza di una mutazione nel materiale prelevato dal nodulo) ci orienterà senz'altro verso l'intervento chirurgico, mentre in caso di risposta negativa potrebbe essere scelto un approccio che preveda esami di controllo sul nodulo ma senza eventualmente intervenire chirurgicamente.

Questo tipo di analisi molecolare può essere effettuata anche recuperando cellule dal lavaggio del materiale residuo dell'agoaspirato destinato all'indagine citologica, evitando di dover effettuare una ulteriore agobiopsia.

**È importante sottolineare che le mutazioni indagate mediante questa procedura sono di tipo somatico e si riscontrano cioè soltanto a livello delle cellule potenzialmente tumorali nella sede del nodulo. L'informazione molecolare ottenuta dall'indagine non coinvolge il DNA di tutte le altre cellule dell'organismo ed esclude quindi un qualsiasi tipo di ripercussione del risultato diagnostico su soggetti della famiglia diversi dal paziente sottoposto all'esame.**

---

<sup>1</sup> AACE/AME/ETA Thyroid Nodule Guidelines, *Endocr Pract.*, 2010; 16 (Suppl1) [10.3.3 Additional Studies]

<sup>2</sup> Nikiforov YE et al., Molecular Testing for Mutation in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* June 2009, 94(6):2092-2098.

Irene Manchi et al., A High Resolution Melting protocol for the rapid and accurate differential diagnosis of thyroid nodules. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2012, 14: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.003>

**Allegato 3**

**Consenso  
alla conservazione di materiale biologico  
per studi e ricerche**

---

Sig. / ra ..... nato / a a ..... il .....
--

Io sottoscritto/a dichiaro di acconsentire a che il materiale biologico eventualmente residuo dall'esame sopra descritto possa essere conservato presso il Laboratorio di Endocrinologia dell'AOU-Careggi per la effettuazione di indagini a scopo di ricerca.

**Firma** .....

**Data** .....

Firenze, li .....

Nel caso di pazienti minori, interdetti o sottoposti ad amministrazione di sostegno, il consenso è validamente espresso dal/dal seguente/i soggetto/i legittimato/i:

Sig. / ra ..... Nato / a a ..... il ..... In qualità di .....
---

Sig. / ra ..... Nato / a a ..... il ..... In qualità di .....
---

## Pubblicazioni

Parte dei risultati ottenuti nel presente studio hanno contribuito al lavoro scientifico pubblicato sulla rivista *The Journal of Molecular Diagnostics* (Volume 14, Issue 5, September 2012, Pages 501–509)

### **A High-Resolution Melting Protocol for Rapid and Accurate Differential Diagnosis of Thyroid Nodules.**

Mancini I, Pinzani P, Pupilli C, Petrone L, De Feo ML, Bencini L, Pazzagli M, Forti G, Orlando C.

Unit of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence, Italy.

**Abstract.** A large majority of thyroid nodules are benign, and only 5% have malignant features on cytological examination. Unfortunately, fine-needle aspiration is inconclusive in approximately 30% of all thyroid biopsies, because the cytological features are indeterminate (suspicious for malignancy but not completely diagnostic or nondiagnostic). Wide panels of somatic mutations have been identified in thyroid cancers, and detection of genetic alterations in fine-needle aspirate has been demonstrated to improve diagnostic accuracy. Nevertheless, the relatively high number of genetic targets to be investigated, in comparison with the low percentage of malignant samples, makes the usual diagnostic protocol both time-consuming and expensive. We developed a reliable and sensitive protocol based on high-resolution melting analysis for the rapid screening of mutations of KRAS, HRAS, NRAS, and BRAF oncogenes in thyroid fine-needle aspirations. The entire procedure can be completed in approximately 48 hours, with a dramatic reduction in costs. The proposed protocol was applied to the analysis of 260 consecutive fine-needle aspiration biopsy (FNAB) samples. In 35 of 252 samples, 36 sequence variants were detected for BRAF (17 samples), NRAS (6 samples), HRAS (3 samples), KRAS codon 12 (9 samples), and KRAS codon 61 (1 sample).

#### **Elenco pubblicazioni correlate allo studio per le metodologie impiegate:**

- 1: Galbiati S, Damin F, Pinzani P, **Mancini I**, Vinci S, Chiari M, Orlando C, Cremonesi L, Ferrari M. A new microarray substrate for ultra-sensitive genotyping of KRAS and BRAF gene variants in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e59939. doi:10.1371/journal.pone.0059939.
- 2: Vinci S, Gelmini S, **Mancini I**, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, Pinzani P, Orlando C. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods*. 2013 Jan;59(1):138-46. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.002.
- 3: **Mancini I**, Pinzani P, Pupilli C, Petrone L, De Feo ML, Bencini L, Pazzagli M, Forti G, Orlando C. A high-resolution melting protocol for rapid and accurate differential diagnosis of thyroid nodules. *J Mol Diagn*. 2012 Sep;14(5):501-9.
- 4: Pratesi N, Mangoni M, **Mancini I**, Paiar F, Simi L, Livi L, Cassani S, Buglione M, Grisanti S, Almici C, Polli C, Saieva C, Magrini SM, Biti G, Pazzagli M, Orlando C. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2011 Jun;99(3):356-61.
- 5: Pinzani P, Santucci C, **Mancini I**, Simi L, Salvianti F, Pratesi N, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, Orlando C. BRAFV600E detection in melanoma is highly improved by COLD-PCR. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12;412(11-12):901-5.
- 6: **Mancini I**, Santucci C, Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, Valanzano R, Pinzani P, Orlando C. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2010 Sep;12(5):705-11.

## Ringraziamenti

Un particolare ringraziamento è rivolto al Prof. Gianni Forti e alle Dott.sse Cinzia Pupilli e Luisa Petrone dell'Unità di Endocrinologia di Careggi per la partecipazione scientifica e clinica che ha portato alla nascita e costruzione del presente lavoro e ai medici Dott.ssa Angela Magini, Dott.ri Roberto Salerno, Gabriele Parenti, Antonio Cilotti e ai Professori Massimo Mannelli e Alessandro Peri per il loro prezioso contributo clinico.

Desidero esprimere sincera riconoscenza al Prof. Mario Pazzagli che ha stimolato e rafforzato nei mesi la mia crescita e autonomia lavorativa.

La più affettuosa gratitudine è per le mie colleghe Dott.sse Stefania Gelmini, Francesca Malentacchi, Pamela Pinzani, Francesca Salvianti e Lisa Simi semplicemente per tutto quello che hanno condiviso con me giorno per giorno.

Ad ogni volto caro, amico e familiare, che mi ha sostenuto nel corso degli anni infinitamente grazie.