

Carcinoma differenziato della tiroide: dalla diagnosi al follow up
21 Marzo 2009

Biologia molecolare nella diagnosi citologica

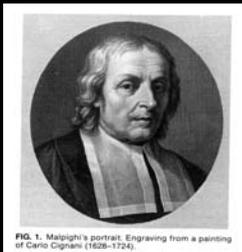
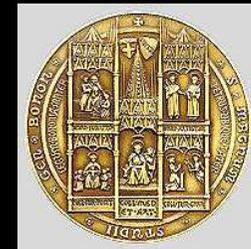
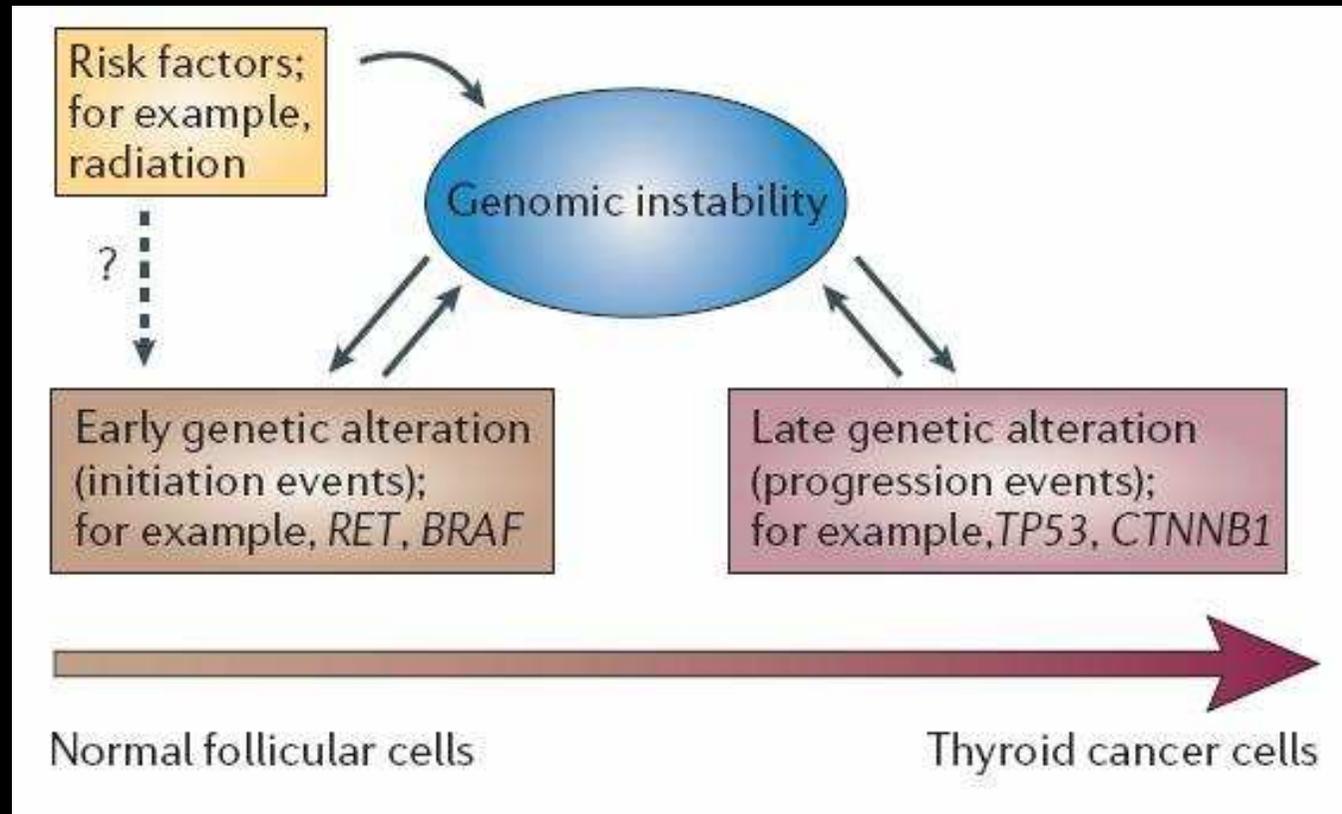


FIG. 1. Morgagni's portrait. Engraving from a painting of Carlo Cignani (1628-1724).

Giovanni Tallini
Universita' di Bologna
Anatomia Patologica Osp. Bellaria



Patogenesi molecolare del carcinoma tiroideo

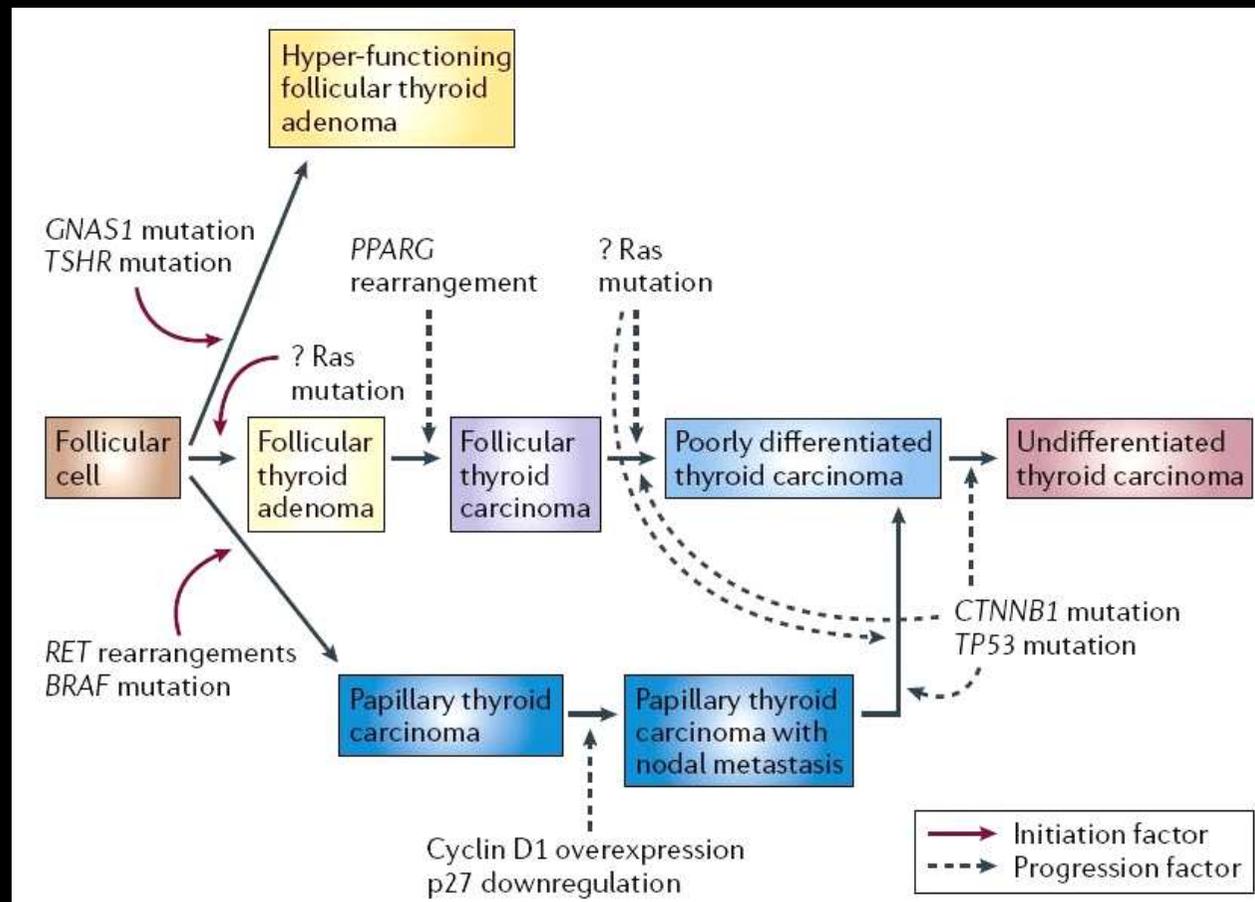


Kondo T, et al. Nat Rev Cancer. 2006

- Background genetico
- Fattori di rischio esterno

p.es. radiazioni inducono instabilita' genetica sia direttamente che indirettamente causando alterazioni iniziali e tardive che determinano lo sviluppo e la progressione del tumore

Modello di carcinogenesi multi-step per le neoplasie tiroidee ad origine dalle cellule follicolari



Kondo T, et al. Nat Rev Cancer. 2006

Alterazioni genetiche iniziali

- Fattori di trascrizione e differenziazione: **riarrangiamento di Pax8 (Pax8/PPRg)**
- Signalling: **via delle MAP chinasi**

Alterazioni genetiche tardive (progressione neoplastica)

- Regolatori del ciclo cellulare (es. p53, p27)
- Molecole di adesione (es. β catenina)
- Fattori di crescita (es. FGF, VEGF, EGF)

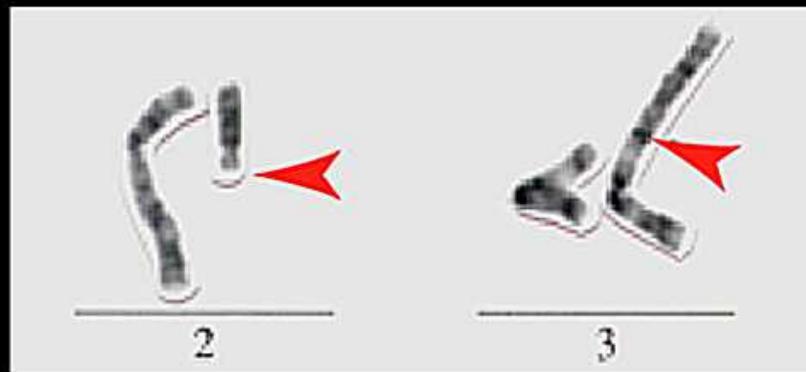
Alterazioni genetiche iniziali
(Fattori di trascrizione e differenziazione)

➤ riarrangiamento di Pax8
(Pax8/PPR γ)

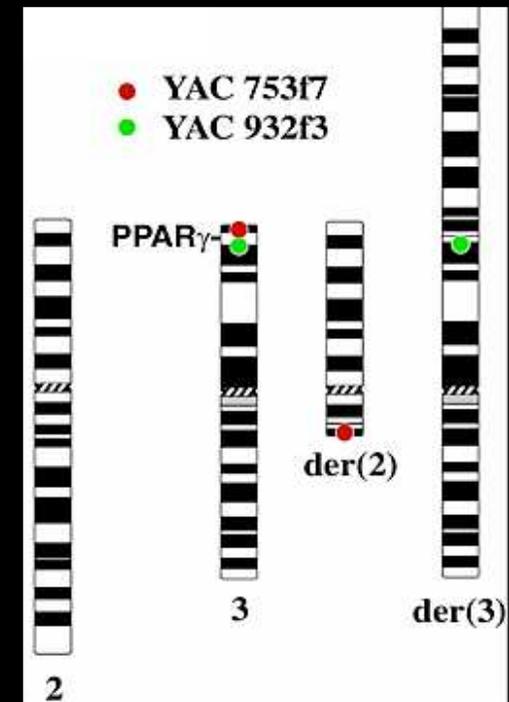
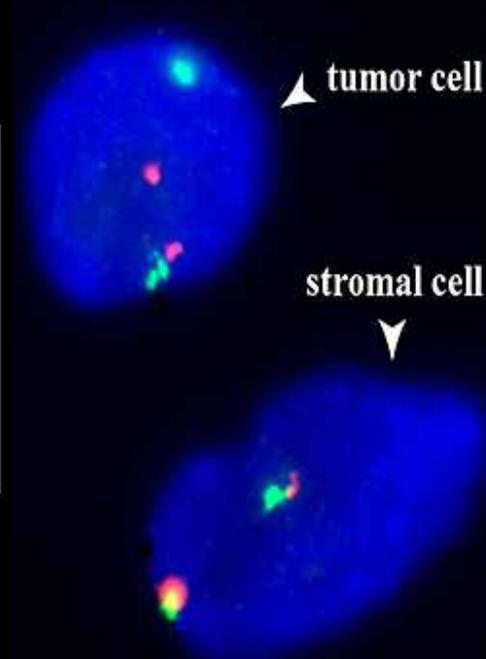
PAX8-PPAR γ 1 Oncogene Fusion in Human Thyroid Carcinoma

Todd G. Kroll,^{1*} Pasha Sarraf,² Lorenza Pecciarini,¹
Chang-Jie Chen,¹ Elisabetta Mueller,² Bruce M. Spiegelman,²
Jonathan A. Fletcher^{1,2,3*}

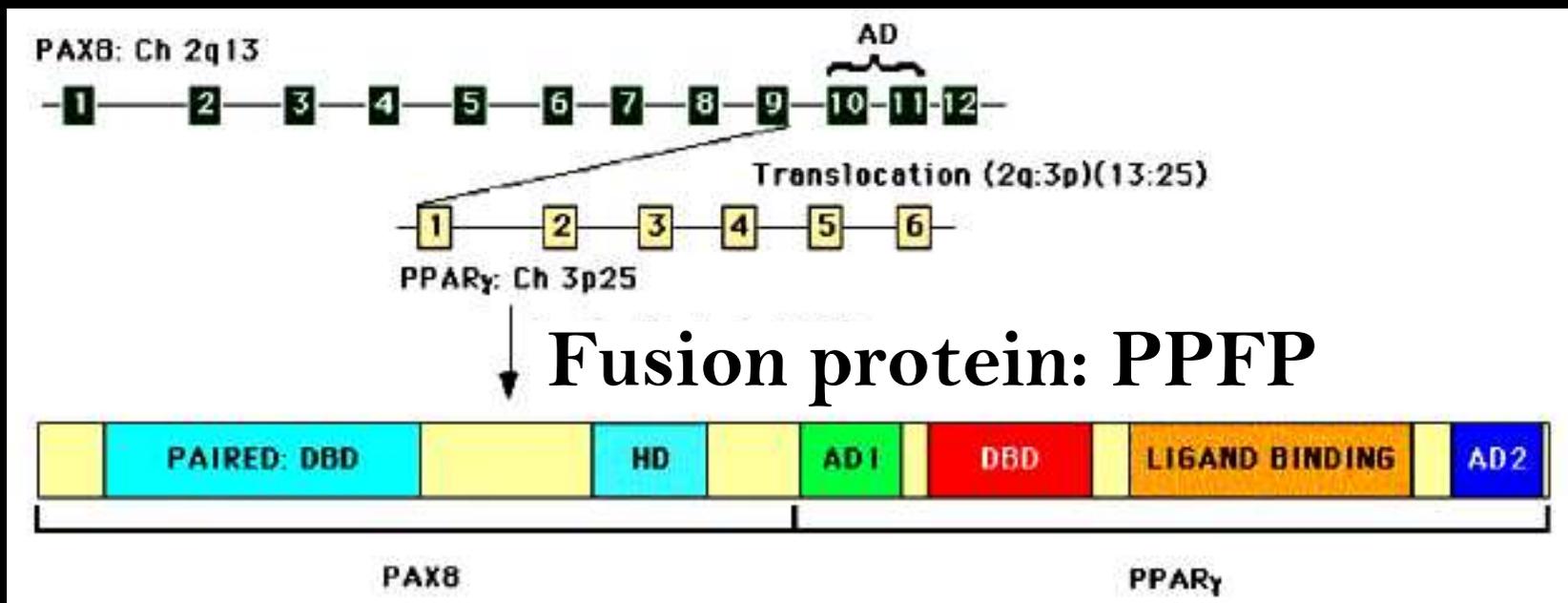
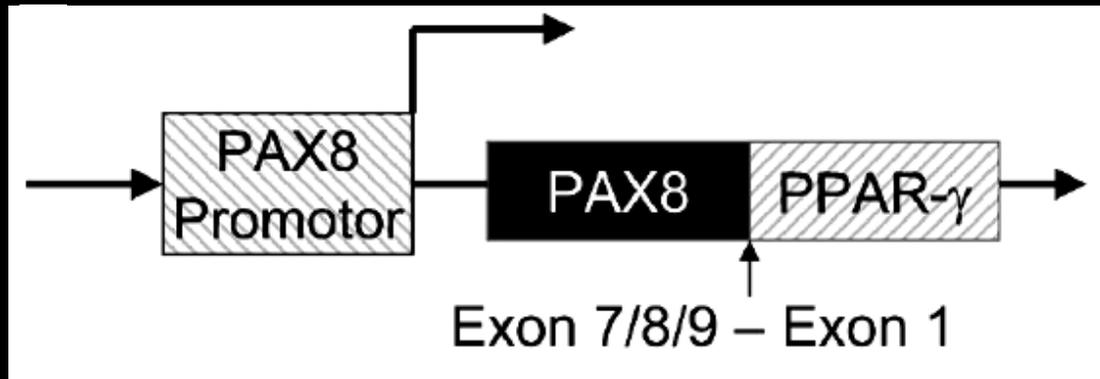
Science, 289:1357-1360. 2000



t(2;3)(q13;p25)

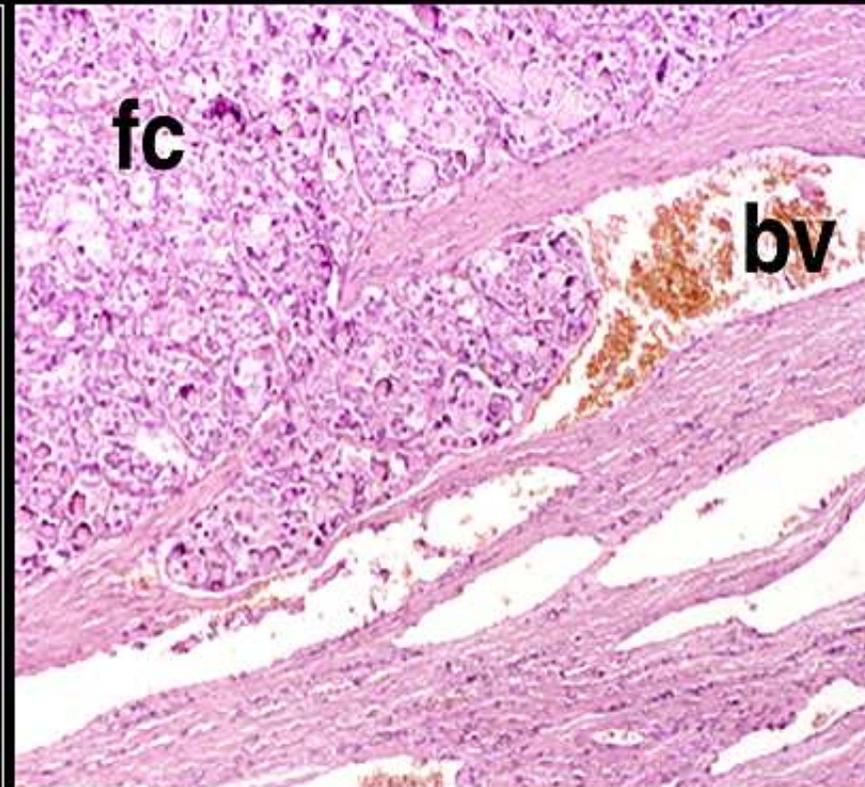


Kroll nel 2000 caratterizza l'aberrante prodotto di fusione associato alla traslocazione tra il cromosoma 2 e 3 in un sottogruppo di carcinomi follicolari tiroidei. Tale prodotto di fusione coinvolge i geni *PAX8* e *PPAR γ* .



- **PAX8**: fattore di trascrizione essenziale per la genesi ed il mantenimento della differenziazione delle cellule follicolari
- **PPAR γ** : membro di una superfamiglia di recettori ormonali nucleari (come p.es. l'ormone tiroideo, il recettore per l'acido retinoico ed i recettori per gli androgeni ed estrogeni) con un dominio centrale che lega il DNA ed uno C-terminale per il ligando. PPAR γ e' un fattore di differenziazione espresso a basso livello nelle cellule follicolari che riduce l'attivit  proliferativa e promuove l'apoptosi.
- **PPFP**: PAX8 troncato (N-terminus), PPAR γ intero (C-terminus), l'espressione della proteina di fusione e' controllata dal promotore di PAX8.

Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con Pax8/PPAR γ



Provvisi di capsula ma angioinvasivi, FC (60%),
alcuni PTC-FV (30%) alcuni FA (10%)

FNA: Pax8/PPAR γ

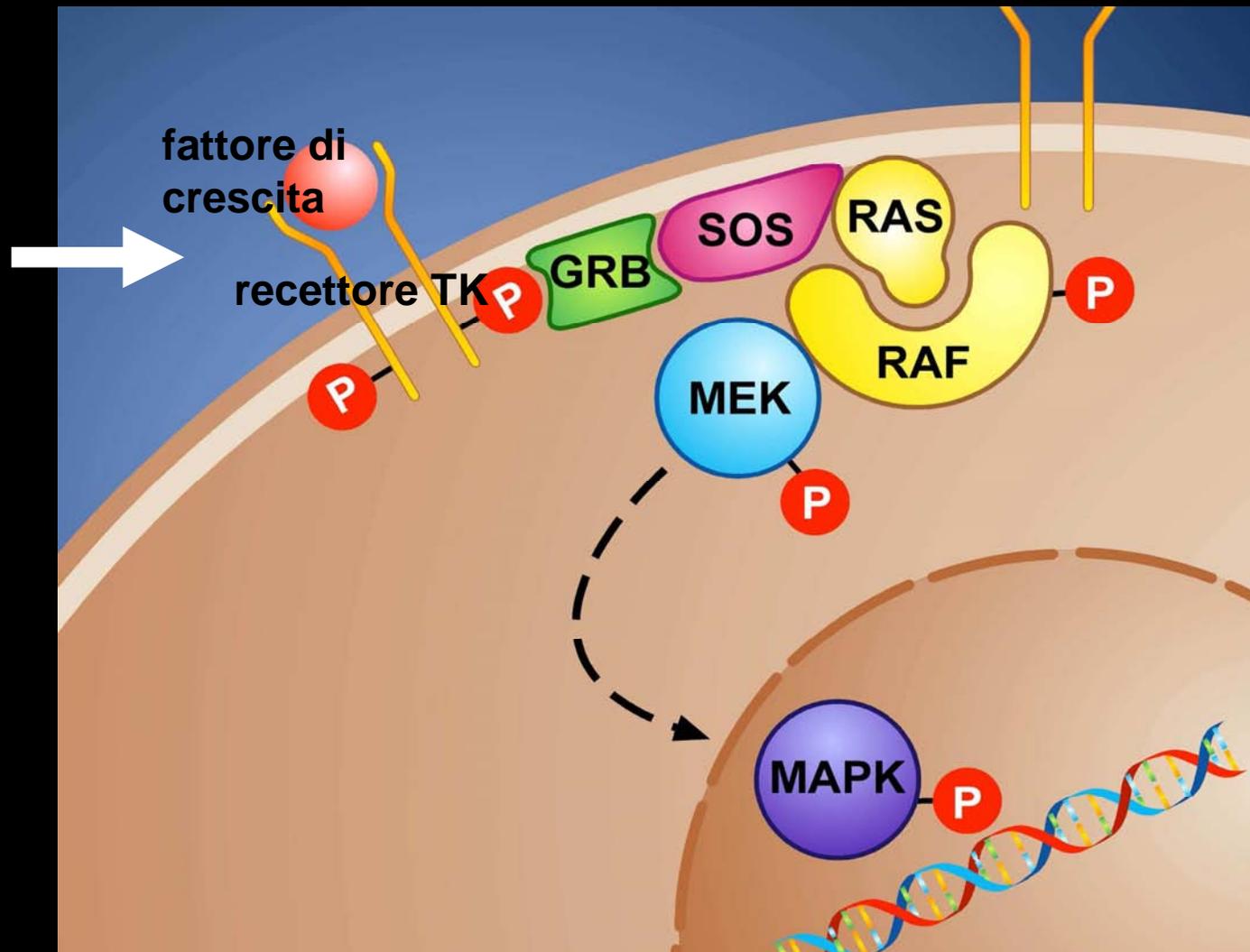
- Metodi: FISH (striscio), RTPCR (mRNA da striscio o prelievo diretto), immunoistochimica (PPAR γ , striscio)
- Utilita': "lesioni follicolari", potenzialmente molto utile (ddx FA vs FC); anche se presente in alcuni FA e' probabile che FA con Pax8/PPAR γ rappresentino lesioni "displastiche"-preinvasive
- Nessuno studio rilevante: forse per la relativa difficulta' di standardizzare le metodiche e/o loro relativa complessita'

Alterazioni genetiche iniziali (Signalling)

via delle MAP chinasi:

- RET/PTC
- RAS
- BRAF

La cascata delle MAPK



Signalling che fa seguito al legame di un fattore di crescita ad una proteina recettore di membrane con funzione tirosino chinasi. La fosforillazione della tirosino chinasi attiva fattori di scambio e proteine adattatrici culminando nell'attivazione di Ras. Ras a sua volta attiva la cascata delle MAPK composta da 3 chinasi Ser/Thr RAF, MEK, MAPK. MAPK si trasferisce nel nucleo dove attiva varie funzioni cellulari (proliferazione etc.)

Alterazioni genetiche iniziali (Signalling)

via delle MAP chinasi:

➤ RET/PTC

• RAS

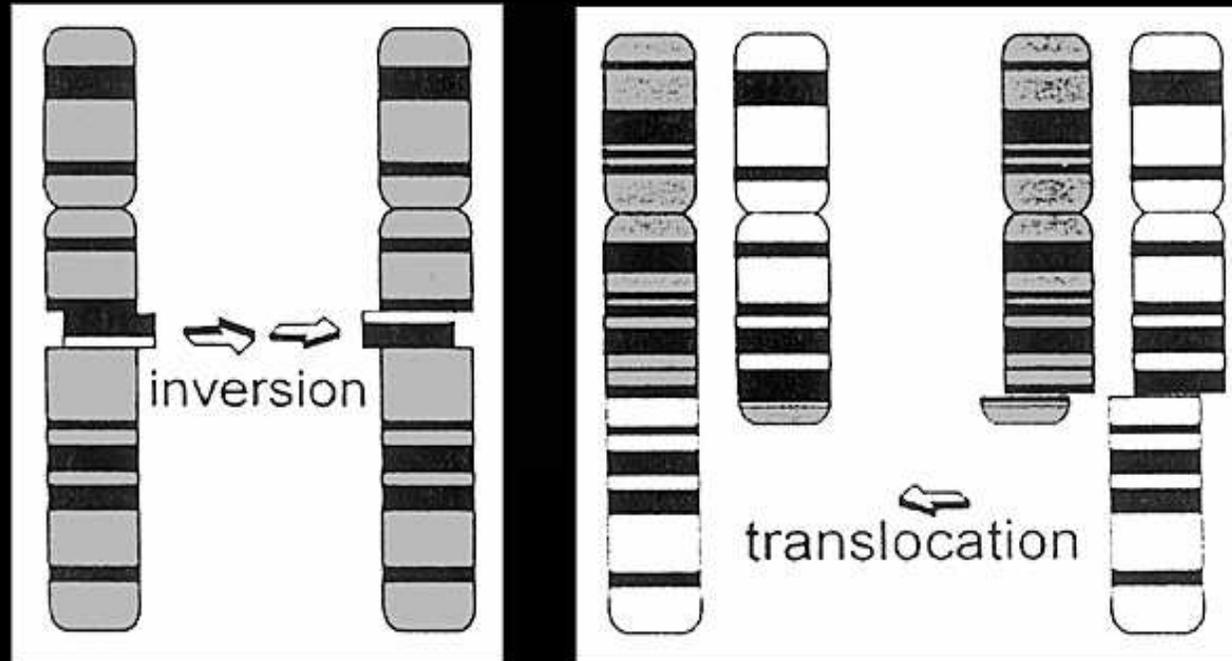
• BRAF

Attivazione oncogenica di RET: RET/PTC

Riarrangiamento

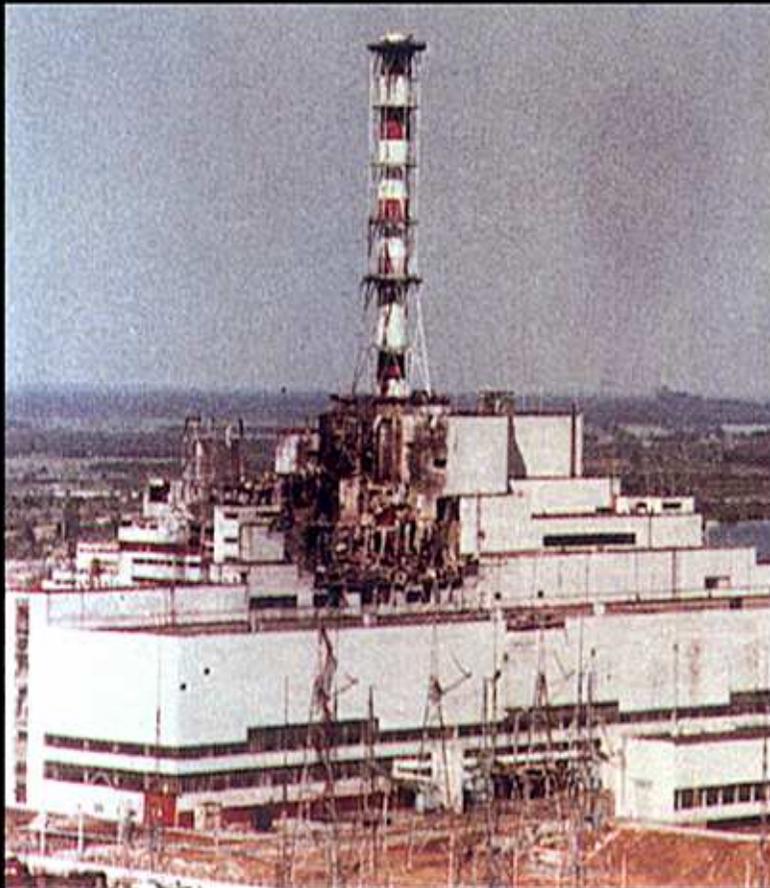
intracromosomico

intercromosomico

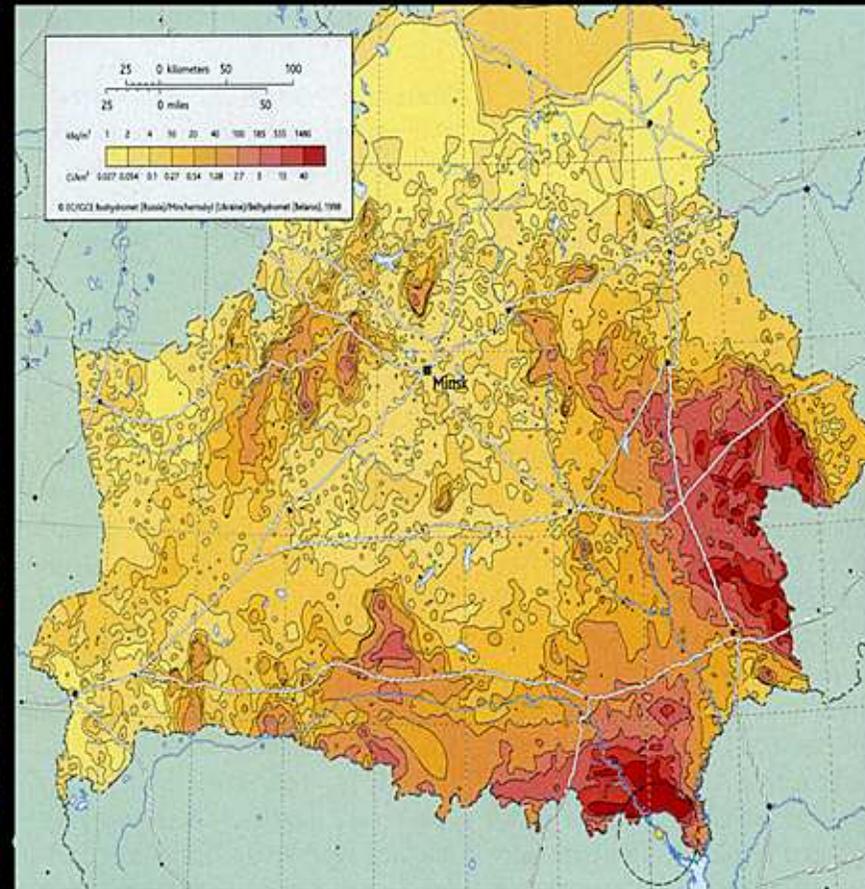


FUSION GENE



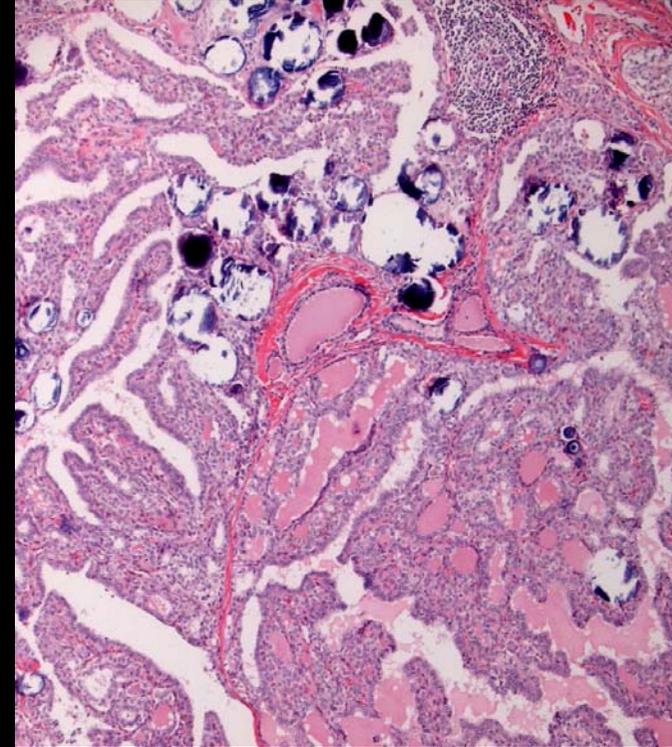
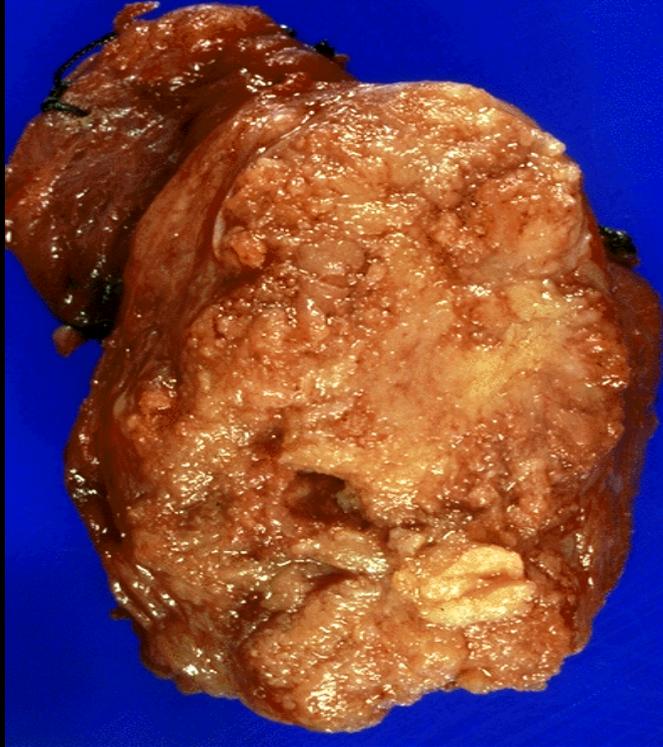


Chernobyl's unit four reactor, on fire on 26 April 1986.



Radioactive fallout. Deposition of cesium-137 in Belarus (above) and around the Chernobyl power plant. (Activity levels as of May 1986; Cs¹³⁷ has a half-life of 30 years.)

Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con RET/PTC



PC classico (20-40%), pz. giovani/bambini, pz. esposti a radiazioni ionizzanti (50-80%), metastasi LN ma basso stadio, non tendenza a progredire verso forme piu' aggressive

FNA: RET/PTC

- Metodi: FISH (tutti i riarrangiamenti, striscio), RTPCR (RET/PTC1 e RET/PTC3, mRNA da striscio o prelievo diretto), immunistoichimica (RET, striscio)
- Utilita': diagnosi carcinoma papillare

Analysis of *ret*/PTC Gene Rearrangements Refines the Fine Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Cancer

J Clin Endocrinol Metab 86: 2187–2190, 2001

CAROL C. CHEUNG, BESSIE CARYDIS, SHEREEN EZZAT, YVAN C. BEDARD, AND SYLVIA L. ASA

Departments of Pathology and Laboratory Medicine (C.C.C., B.C., Y.C.B., S.A.) and Medicine (Endocrinology) (S.E.), The Freeman Center for Endocrine Oncology, Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5G 2M9

73 citologici (33PC, 11FA, 25MNG, 3tiroiditi, 1AC); RTPCR su mRNA da Cytolyt-ThinPrep; 100% concordanza tra RET/PTC+ e dx istologica di PC; 9/15 (60%) "indeterminate" RET/PTC+; 2/6 (33%) "insufficient" RET/PTC+

FNA: RET/PTC

- Variabilità geografica notevole (0-85%)
- Può essere espresso a basso livello e solo da alcune cellule come evento mutazionale "passenger" in PC e FA, o in tiroidite di Hashimoto

RET/Papillary Thyroid Cancer Rearrangement in Nonneoplastic Thyrocytes: Follicular Cells of Hashimoto's Thyroiditis Share Low-Level Recombination Events with a Subset of Papillary Carcinoma

J Clin Endocrinol Metab 91: 2414–2423, 2006

Kerry J. Rhoden,* Kristian Unger,* Giuliana Salvatore, Yesim Yilmaz, Volodymyr Vovk, Gennaro Chiappetta, Mazin B. Qumsiyeh, Jay L. Rothstein, Alfredo Fusco, Massimo Santoro, Horst Zitzelsberger, and Giovanni Tallini

- Se vengono evitate metodiche troppo sensibili e/o vengono utilizzati cutoff appropriati l'identificazione di RET/PTC ha un valore predittivo per la diagnosi di PC del 100%

Alterazioni genetiche iniziali (Signalling)

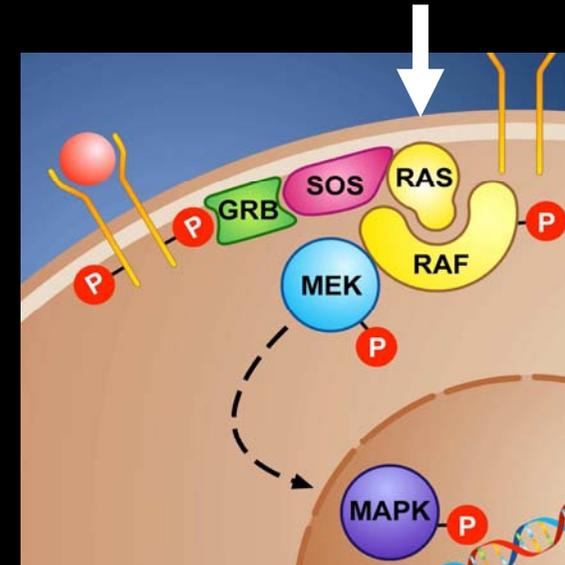
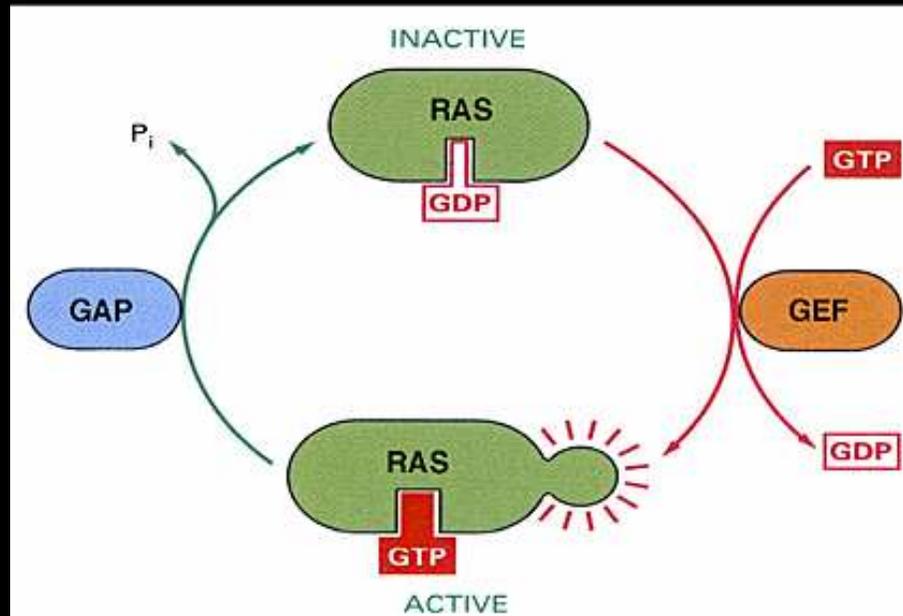
via delle MAP chinasi:

- RET/PTC

- RAS

- BRAF

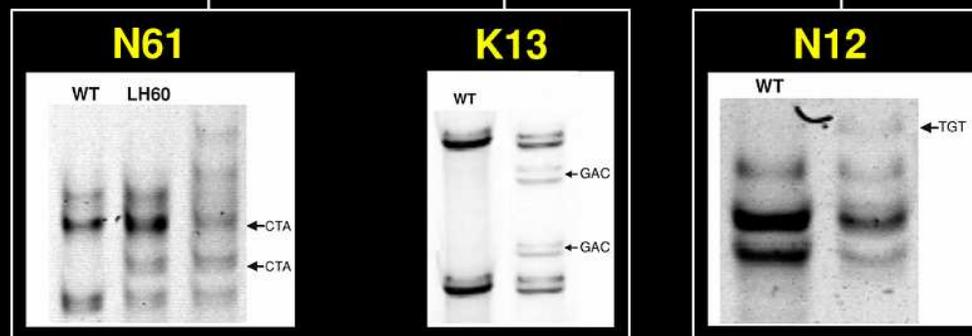
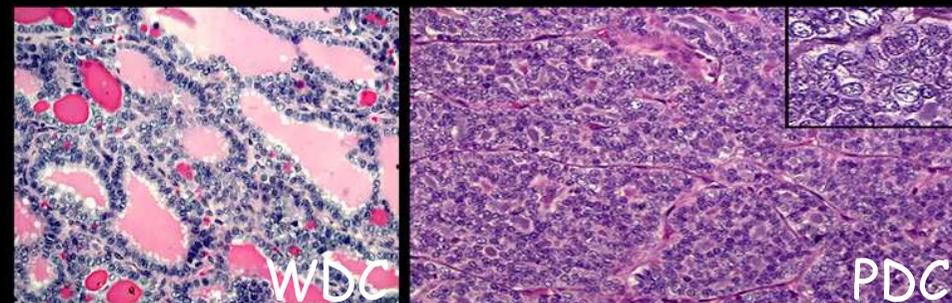
H-, K-, N-Ras



Le proteine RAS (Harvey, Kirsten e Neuroblastoma) sono G proteine monomeriche legate alla parte interna della membrana cellulare con un ruolo chiave nella trasduzione del segnale verso il nucleo della cellula. Esistono in una forma inattiva, legata a GDP ed una attiva, legata a GTP. L'attivazione oncogenica di RAS e' dovuta a mutazioni puntiformi del GTP binding domain di RAS (codoni 12, 13 dell'esone 1) o mutazioni del GTPase domain (codon 61, exon2) che bloccano la proteina nella forma attiva legata al GTP.

Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con mutazioni di H-, K-, N-Ras

- FA (30%), FC (45%), PC (rara, ma PC-FV 45%), PDC (35-50%), UDC (30-50%)



- Mutazioni di Ras sono associate a tendenza del tumore a progredire verso forme aggressive (in vitro instabilità cromosomica, interferenza con processi di riparazione del DNA, perdita di differenziazione cellulare)

Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con mutazioni di H-, K-, N-Ras

High frequency of *ras* oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis

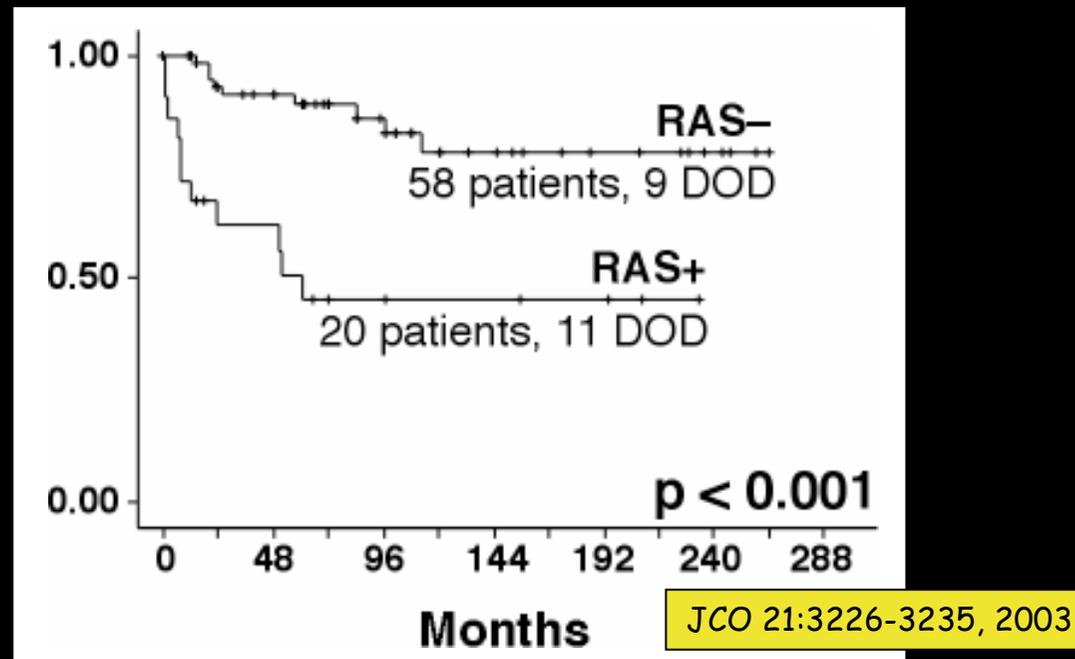
Nick R. Lemoine¹, Edward S. Mayall¹, Fiona S. Wyllie¹, E. Dillwyn Williams¹, Malcolm Goyns², Bradley Stringer³ & David Wynford-Thomas¹

Oncogene, 4:159-164, 1989

- FA (30%), FC (45%), PC (rara, ma PC-FV 45%), PDC (35-50%), UDC (30-50%)
- Mutazioni di Ras sono associate a tendenza del tumore a progredire verso forme aggressive (in vitro instabilità cromosomica, interferenza con processi di riparazione del DNA, perdita di differenziazione cellulare)
- Ridotta sopravvivenza in pz. con carcinoma differenziato della tiroide

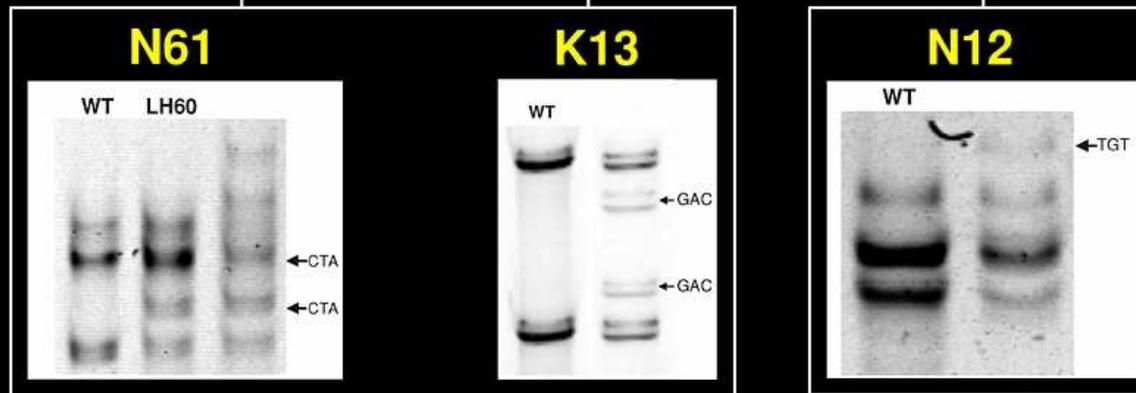
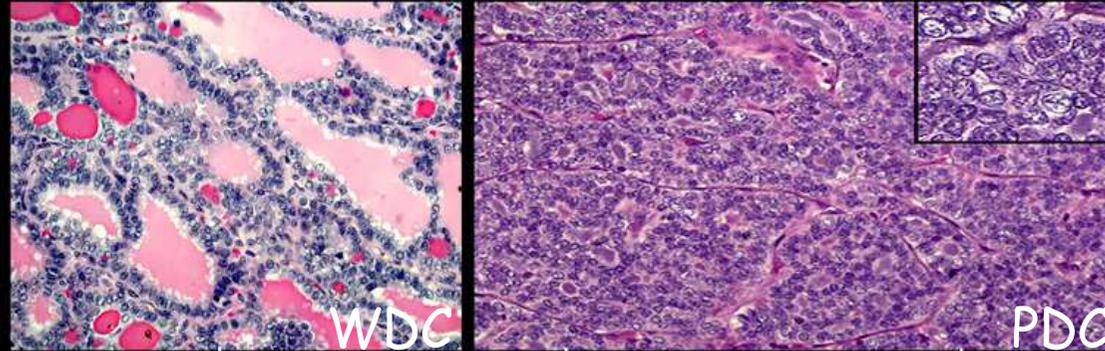
Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con mutazioni di H-, K-, N-Ras

- FA (30%), FC (45%), PC (rara, ma PC-FV 45%), PDC (35-50%), UDC (30-50%)



- Ridotta sopravvivenza in pz. con carcinoma differenziato della tiroide

Caratteristiche clinicopatologiche dei tumori con mutazioni di H-, K-, N-Ras



- Mutazioni di Ras sono associate a tendenza del tumore a progredire verso forme aggressive (in vitro instabilità cromosomica, interferenza con processi di riparazione del DNA, perdita di differenziazione cellulare)

FNA: H-, K-, N-Ras

- Metodi: DNA da striscio o prelievo diretto; sequenziamento, melting curve analysis, PCR-SSCP, AS-PCR; la maggioranza delle mutazioni in codon 61 di H-Ras e N-Ras, K-Ras in tumori in aree con deficienza di Iodio
- Utilita': "lesioni follicolari" e tumori aggressivi; anche se presente in FA e' probabile che FA con mutazioni di Ras rappresentino lesioni "displastiche"-preinvasive
- Pochi studi: 21 PC-FV (75%), 3 FC (11%), 4 FA (14%) le dx istologiche in 28 campioni citologici Ras+ di noduli che sono stati poi rimossi chirurgicamente (Nikiforova, unpublished 2008)

Alterazioni genetiche iniziali (Signalling)

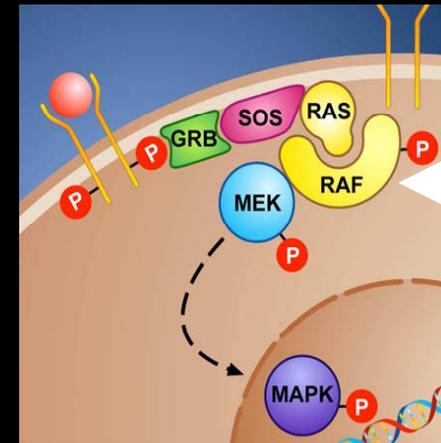
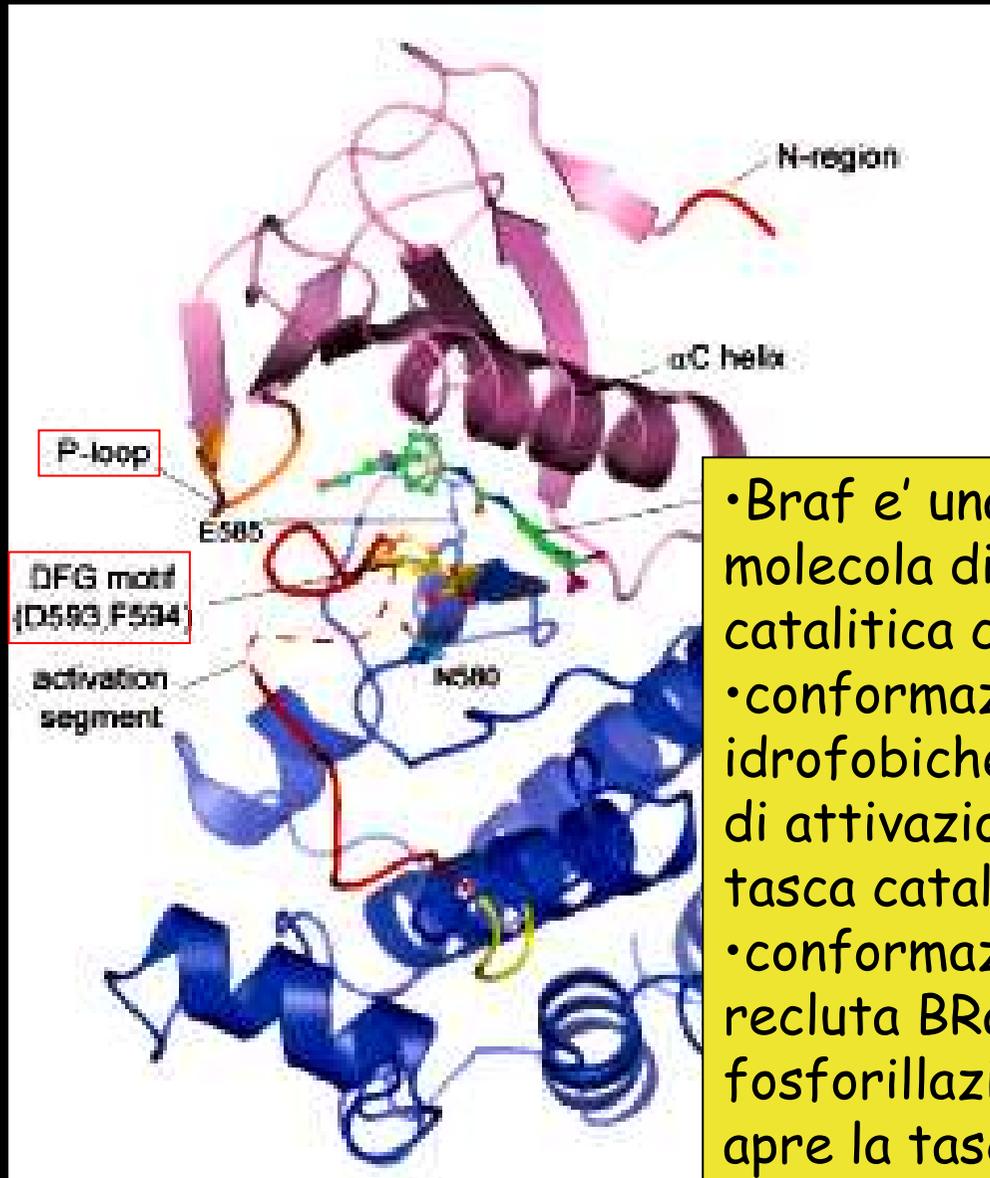
via delle MAP chinasi:

- RET/PTC

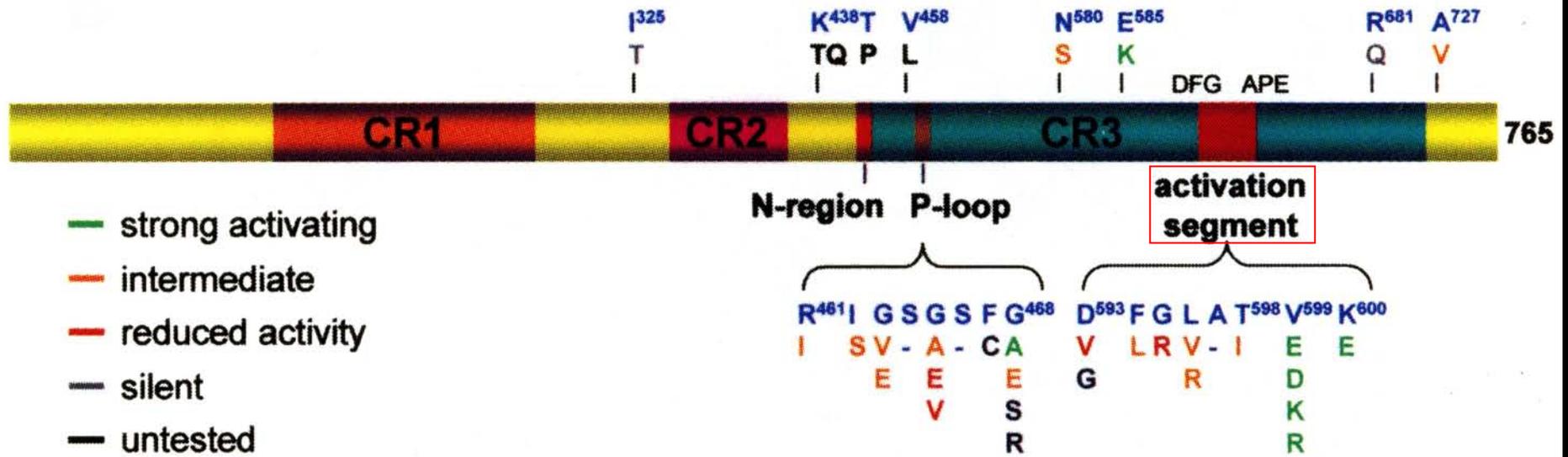
- RAS

- BRAF

BRaf



- Braf e' una serina/treonina chinasi piccola molecola di forma bilobata con tasca catalitica chinasica tra i due lobi
- conformazione non attiva: interazioni idrofobiche tra il motivo DFG nel segmento di attivazione e P-loop tengono chiusa la tasca catalitica
- conformazione attiva: l'attivazione di Ras recluta BRaf alla membrana; la fosforillazione del segmento di attivazione apre la tasca catalitica ed attiva la funzione serina/treonina-chinasica di Braf



Mutazioni in corrispondenza del segmento di attivazione mimano la fosforillazione fisiologica, aprono la tasca catalitica ed attivano Braf in modo costitutivo (V600E)



Mutazioni di Braf e aspetti clinicopatologici del tumore (PTC)

500 PTC analizzati mediante PCR/SSCP e sequenziamento: mutazioni di Braf in 219/500 casi (43.8%) (quasi tutte V600E), associate a

- assenza di capsula tumorale ($p < 0.001$)*
- infiltrazione extratiroidea ($P < 0.001$)
- multicentricita' ($p = 0.003$)
- metastasi LN ($p < 0.001$)
- Classe prognostica sfavorevole (I&II vs III, $p < 0.001$)

*anche all'analisi multivariata

Mutazioni di Braf e aspetti clinicopatologici del tumore (PTC)

Tumori da pz. con PTC e FU (mediana FU 15 a.a.) analizzati mediante PCR/SSCP e sequenziamento: mutazioni di Braf in 38/102 casi (37.3%) (V600E), associate a

- Eta' > 60 a.a. (p = 0.02)
- Alto stadio (III e IV) (p = 0.005)
- Invasione vascolare (p = 0.02)

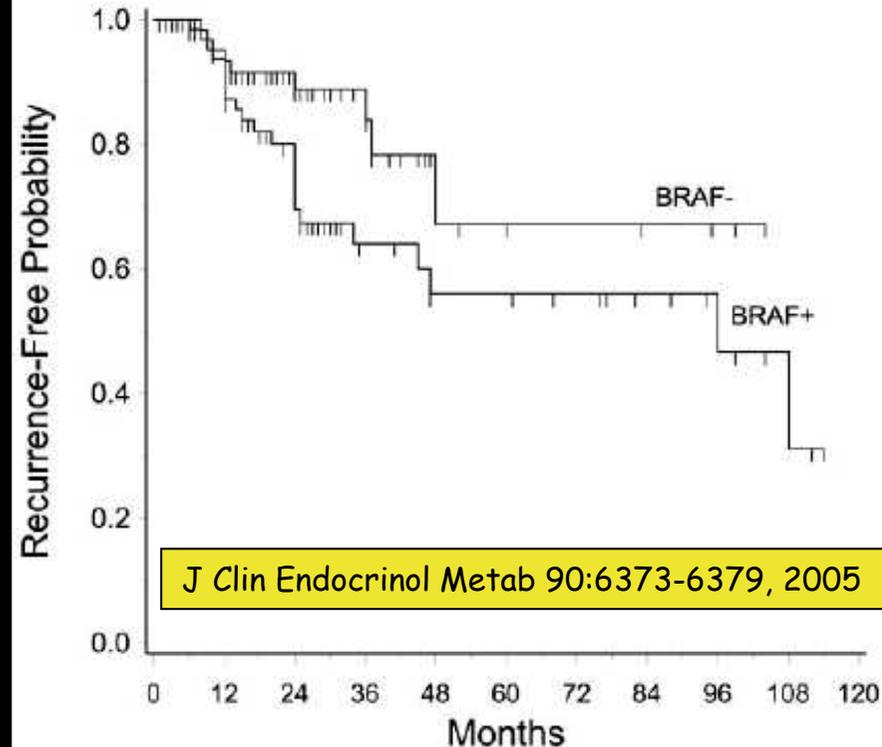
Persistenza di malattia o decesso del paziente associati (p < 0.05) a

- Braf (V600E) (p < 0.002)*
- Eta' > 60
- Dimensioni del tumore
- Estensione extraghiandolare
- Metastasi a distanza
- Alto stadio (III e IV)
- Invasione vascolare

*unica indipendente all'analisi multivariata

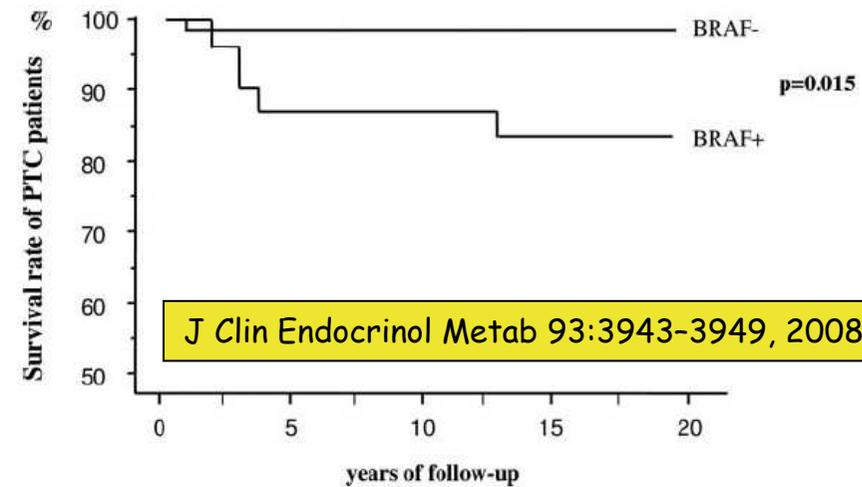
BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer

Mingzhao Xing,* William H. Westra,* Ralph P. Tufano, Yoram Cohen, Eli Rosenbaum, Kerry J. Rhoden, Kathryn A. Carson, Vasily Vasko, Alexandr Larin, Giovanni Tallini, Sara Tolaney, Elizabeth H. Holt, Pei Hui, Christopher B. Umbricht, Shehzad Basaria, Marge Ewertz, Anthony P. Tufano, Joseph A. Califano, Matthew D. Ringel, Martha A. Zeiger, David Sidransky, and Paul W. Ladenson

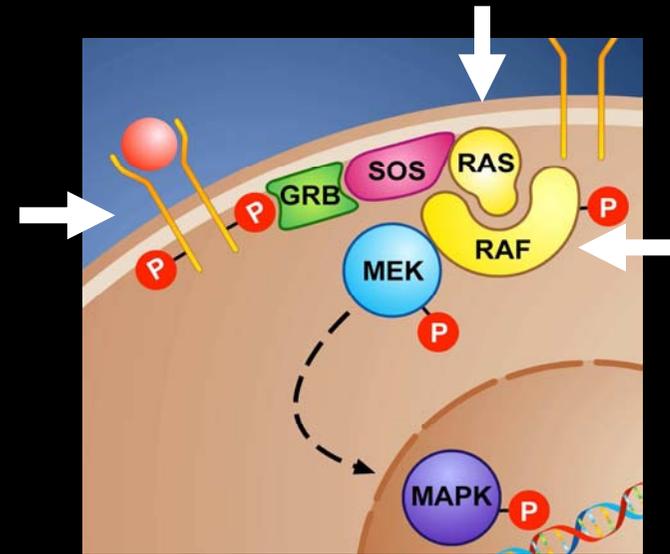


BRAF^{V600E} Mutation and Outcome of Patients with Papillary Thyroid Carcinoma: A 15-Year Median Follow-Up Study

Rossella Elisei, Clara Ugolini, David Viola, Cristiana Lupi, Agnese Biagini, Riccardo Giannini, Cristina Romei, Paolo Miccoli, Aldo Pinchera, and Fulvio Basolo



Non c'e'
sovrapposizione delle
alterazioni molecolari
nella via delle MAPK
(RET/PTC, Ras, Braf)



Lack of overlap among BRAF, RAS, and RET/PTC mutations in papillary carcinomas

	Mutation prevalence	BRAF	RAS	RET/PTC
BRAF	32.8%	22/67	0	0
RAS	16.4%	0	11/67	0
RET/PTC	16.4%	0	0	11/67
Total	65.6%			

Kimura et al, *Ca Res* 63:145-147, 2003