

NUOVE TECNOLOGIE PER LA CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DEL CARCINOMA TIROIDEO

Roberto Virgili¹, Martina D'Angelo²

ABSTRACT

In the last decades the epidemiology of the nodular thyroid pathology has been modified, with a progressive increase in the finding of nodules in the adult population associated with a similar tendency to the growth of the incidence of thyroid tumors.

Nowadays, the fine-needle aspiration cytology (FNAC) is the most used diagnostic procedure to investigate the nature of thyroid nodules, however the success rate is varying between 70-95% of cases.

The remaining 5-30% results in an indeterminate diagnosis, that needs to be followed by a diagnostic surgery, unnecessary for about the 70% of the cases, since the histological examination demonstrates its benign nature.

BRAF V600E in papillary thyroid carcinoma (PTC) and NRAS Q61R in the follicular variant, can provide not only a diagnosis, but also a targeted therapeutic approach.

The aim of the work, is to reduce the indeterminate cases of FNA (Fine Needle Aspiration) through the use of biomarkers by comparing routine cytology with molecular diagnostics.

But usually this is quite insufficient and technically not optimal for in-depth investigations. From these limits CytoMatrix is born.

It is a synthetic matrix that above all has the property of capturing and preserving the primitive aspirative cells within a three-dimensional structure, optimizing the management of lacking biological material such as the thyroid needle aspiration.

The results were compared with the traditional cytology and then confirmed by the post-surgery histological examination: 83% diagnosed with Papillary carcinomas, falling within the estimate of Thyroid Carcinomas, which predicts the PTC between 80-90% , with mutational expression BRAF (V600E) between 45-80% and NRAS (Q61R) between 0-15%.

The research of mutational markers with IHC, FISH and PCR Real-Time, shows an increase of success rate of 67%.

This demonstrates not only the compatibility of the matrix with this type of examination, but also the potential application of CytoMatrix to support the differential diagnosis in Thyroid Pathology, for reducing the percentage of indeterminate cases.

A more accurate diagnosis can steer the patient toward therapeutic follow-up or clinical surgery, thanks to the predictability of lesions associated with usage of molecular markers.

¹ Anatomia Patologica, Campus Bio-medico, Roma

² S.S. Anatomia Patologica, Regina Apostolorum, Albano Laziale

Parolechiave:

laboratorio, istocitopatologia, diagnostica biomolecolare, carcinoma, tiroide

Keywords:

lab tests, pathology, diagnostics, thyroid carcinoma

This article was published on September 20, 2018, at SIMEDET.EU.

doi.org/10.30459/2018-12
Copyright © 2018 SIMEDET.

BACKGROUND

Tra le tecnologie a disposizione dei laboratori di istocitopatologia per le caratterizzazioni tumorali vi sono già da tempo tecniche biomolecolari.

L'agoaspirazione, tecnica di approccio a minima invasività per il paziente, ha manifestato dei limiti in laboratorio riguardo alla possibilità dell'utilizzo del materiale citologico in relazione alle necessità di ulteriori approfondimenti diagnostici.

Si è così ricorsi alla tecnica della citoinclusione che però comporta vari step di lavorazione con possibile perdita di piccole quantità di materiale citologico.

La sperimentazione proposta in questa tesi di una "matrice" da utilizzare al momento del prelievo con agoaspirato che catturi direttamente le cellule e le renda direttamente disponibili per un processo istologico è sicuramente il gold standard anche in relazione alla eventualità di scarsità di materiale prelevato.

In questo lavoro tratto dalla tesi di specializzazione della Dr.ssa D'Angelo si evidenziano tutti i benefici di tale metodica a vantaggio di una più razionale ed efficace gestione del materiale citologico.

METODO

Nelle ultime decadi l'epidemiologia della patologia nodulare tiroidea si è modificata, con un aumento progressivo del riscontro di noduli nella popolazione adulta associata ad un'analoga tendenza alla crescita dell'incidenza dei tumori della tiroide.

L'ago-aspirato con esame citologico è considerato ad oggi il metodo d'elezione per definire la natura dei noduli tiroidei, tuttavia tra il 5-30% dei casi comporta un risultato indeterminato a cui segue una chirurgia a scopo diagnostico che si rivela inutile circa il 70% delle volte in quanto l'esame istologico successivamente ne dimostra la natura benigna.

La rimozione totale o parziale della tiroide implica una terapia sostitutiva con rischio di complicanze legate a disordini ormonali e metabolici più o meno

evidenti, per questo nasce la necessità di indagini più accurate che permettano una diagnosi differenziale di patologie tiroidee.

La rilevazione preoperatoria di mutazioni molecolari può fornire sia una conferma diagnostica che un approccio terapeutico mirato, in quanto alcune mutazioni genetiche possono essere definite caratteristiche e specifiche per un particolare tipo di tumore tiroideo.

Il carcinoma papillifero ad esempio, rappresenta più dell'80% dei carcinomi tiroidei ed è associato ad una mutazione BRAF fino all'80% dei casi, 90% dei quali a carico del codone V600E.

Tale mutazione è indice di aggressività ed invasività del tumore e non essendo mai stata riscontrata in carcinomi follicolari, midollari e noduli benigni, viene considerata tipica del carcinoma papillifero.

Lo scopo del lavoro è volto a ridurre la percentuale di indeterminati dell'FNA (Fine Needle Aspiration) mediante utilizzo di biomarcatori come BRAF V600E nel carcinoma papillare della tiroide (PTC) ed NRAS Q61R nella variante follicolare, confrontando l'esame citologico di routine con la diagnostica molecolare.

Tuttavia lo striscio citologico convenzionale con allestimento di cell block è spesso insufficiente e tecnicamente non ottimale per indagini approfondite privando così la possibilità di abbinare tecniche genetico/molecolari di approfondimento.

Da questi limiti nasce CytoMatrix, una matrice sintetica che annovera tra le sue varie caratteristiche intrinseche, la proprietà di captare e conservare all'interno della sua struttura tridimensionale cellule provenienti da prelievi agoaspirativi, permettendo di gestire in maniera "razionale" il materiale biologico non abbondante come l'agoaspirato tiroideo.

La matrice brevettata permette l'allestimento del campione a partire dal prelievo agoaspirativo, senza intervenire o alterare il materiale durante il processo poiché non subisce alcun intervento tecnico negli step

di lavorazione, ottenendo così una metodica semplice e standardizzata.

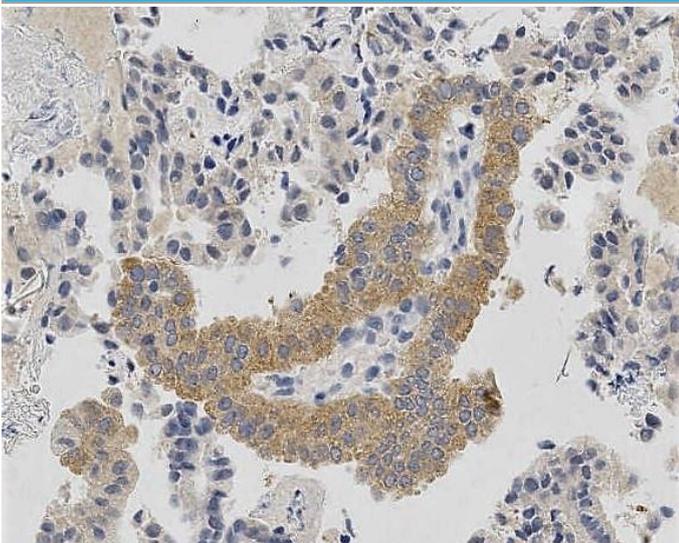
Il fluido citologico altamente trattenuto, grazie alla carica delle maglie sintetiche ad alta muco adesività, simula un vero e proprio tessuto istologico che consente anche al materiale non corpuscolato come la colloidale di essere trattenuto.

In microscopia ottica il preparato assume colorazione nitida, con cellule non sovrapposte racchiuse in maglie fine (eosinofile) di colore rosa che rendono il preparato di facile osservazione.

In immunistochemica CytoMatrix, grazie alla validazione di controlli interni, genera risultati assolutamente sovrapponibili all'istologia e citologia classica, mantenendo le stesse procedure di allestimento del preparato senza subire trattamenti particolari.

L'esame pertanto può essere eseguito assieme alla routine e non richiede personale dedicato e tempi sottratti.

FIG. 1 - REAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA PER BRAF

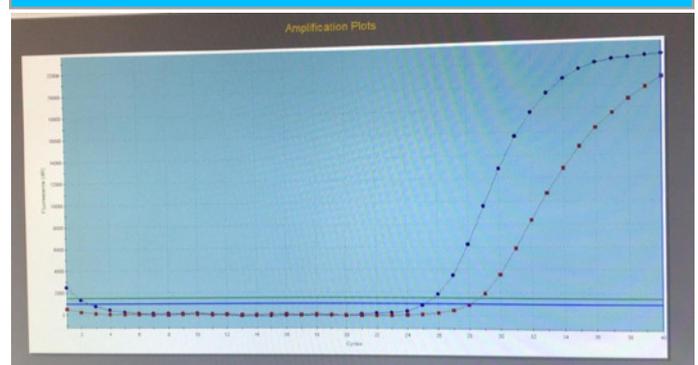


La possibilità di ricerca di marcatori molecolari come BRAF (V600E) ed NRAS (Q61R) in ausilio al pannello di ricerca CK19, GAL-3 ed HBME1 e CD56, genera una risposta dal valore diagnostico e prognostico in patologia tiroidea.

I risultati ottenuti sono stati testati anche biologia molecolare mediante tecnica di PCR Real-Time, tecnica d'elezione per la ricerca e l'amplificazione del materiale genetico per la sua alta sensibilità e specificità.

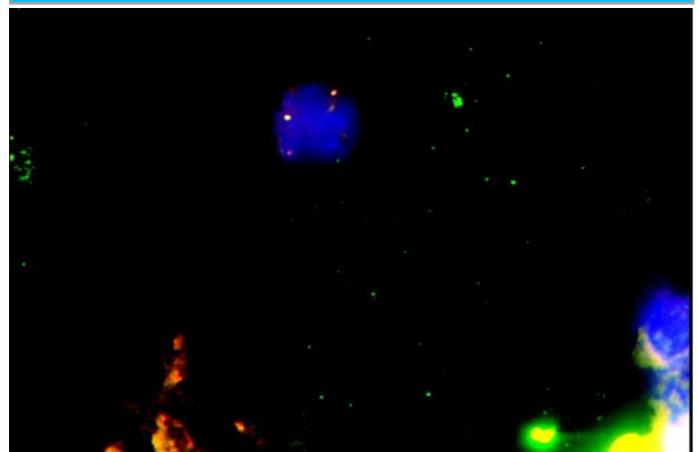
Spesso i materiali inclusi in paraffina presentano un DNA altamente degradato, non sempre valutabile: CytoMatrix ha permesso di rilevare mutazioni sia ad alte che a basse concentrazioni di DNA, confermando gli esami di immunistochemica che apparivano debolmente positivi.

FIG. 2 - CURVA DI AMPLIFICAZIONE IN REAL TIME PER BRAF



Studi recenti ne hanno dimostrato l'applicabilità anche in tecnica F.I.S.H. (Fluorescence In Situ Hybridization) aiutando la caratterizzazione del Carcinoma Midollare (MTC) mediante la ricerca di mutazioni RET.

FIG. 1 - F.I.S.H. (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION) PER RET



RISULTATI

▪ L'83% dei campioni analizzati presenta Carcinoma Papillifero, rientrando nella stima dei Carcinomi Tiroidei che vede il PTC tra l'80-90%, con espressione mutazionale BRAF (V600E) tra il 45-80% ed NRAS (Q61R) tra lo 0-15%.

▪ Il 14,2% dei casi analizzati con CytoMatrix erano risultati Indeterminati alla Diagnosi Citologica Convenzionale, ma grazie alla possibilità di ricercare Biomarcatori Molecolari caratteristici e specifici, ad oggi abbiamo ottenuto diagnosi certa nel 67% dei casi in più.

Tutte le diagnosi ottenute sono state comparate con la citologia tradizionale e confermate poi dall'esame istologico post-operatorio.

In conclusione possiamo affermare che:

▪ La possibilità di poter discriminare tra tumore benigno e tumore maligno in sede pre-operatoria riduce il numero di sovradiagnosi, indirizzando il paziente verso una terapia "personalizzata".

▪ Ampliare il pannello di marcatori mutazionali di indagine può perfezionare la diagnostica, anche in termini di predittività ed aggressività.

Prevedere l'aggressività della neoplasia, consente di riservare i trattamenti chirurgici più estesi e demolitivi, nonché la somministrazione di iodio radioattivo, solo ai tumori a maggiore rischio di recidiva locale o di metastasi a distanza.

▪ Tali marcatori sono ancora oggetto di studio, ma tutti i dati ottenuti confermano la possibilità di usare CytoMatrix per la loro ricerca a supporto della diagnosi differenziale in patologia tiroidea, riducendo la percentuale di indeterminati provenienti dall'FNA di routine.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs, Edited by Ricardo V.Lloyd, Robert Y.Osamura, Günter Klöppel, Juan Rosai, 2017.
- 2017 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules .
- <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/120814001.PDF>
- Italian Thyroid Cancer Observatory Foundation, Thyroid cancer repository, <https://www.thyroidcancer.policlinicoumberto1.it/>
- Cell Block: preparazione ed uso per immunoistochimica, EXPOSANITA' 2018, PATOLOGIA NODULARE DELLA TIROIDE: focus sugli approcci diagnostici, Valentina Bartolucci , UOC Anatomia Patologica, Università Campus Biomedico Roma.
- https://www.bio-optica.it/ftp/technical_datasheet/CFC1.pdf
- https://www.bio-optica.it/ftp/technical_datasheet/CFD1.pdf
- Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates, Sanchez NI, Selvaggi SM, Pubmed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16514670> .
- Codice della Proprietà Industriale, Sez IV e V, invenzioni Biotecnologiche.
- Diagnostica in Endocrinologia Clinica, Manuale per la Valutazione e l'inquadramento delle patologie della tiroide, 2011, Roberto Attanasio, Giorgio Borretta, Luana Buonomo, Nadia Cremonini, Romolo Dorizzi, Enrico Papini, Vincenzo toscano.
- Molecular diagnostics of thyroid tumors, Nikiforov YE1, pubmed .
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21526955> .
- <https://www.qiagen.com/it/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/#orderinginformation> .
- Patologia nodulare della tiroide: focus sugli approcci diagnostici, I MARKERS IMMUNOCITOCHIMICI: valore diagnostico e riproducibilità, EXPOSANITA' 2018, Dott.ssa Silvia Taccogna .
- PROTOCOLLO OTTIMIZZATO DELLE MATRICI POLIMERICHE, Roberto Virgili, Daniele Nicoletti, Federica Cascone , Policlinico universitario campus Biomedico di Roma.
- <https://www.ucsdagnostic.com/news/6/CytoMatrix>
- <http://www.itcofoundation.org/perche/il-carcinoma-tiroideo-oggi> .
- Utilizzo di matrici a polimeri per l'allestimento dell'agoaspirato tiroideo: valutazione comparativa tecnica di matrici commerciali e sperimentali, Daniele Nicoletti .
- Pub Med: Medicine (Baltimore). 2015 May;94(21):e760. doi: 10.1097/MD.0000000000000760.Prediction Table and Nomogram as Tools for Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma: Combined Analysis of Ultrasonography, Fine-Needle Aspiration Biopsy, and BRAF V600E Mutation. <http://entrogen.com/web3/b-raf-codon-600-mutation-analysis-kit/>
- Pub Med: Pathol Res Pract. 2018 Feb;214(2):303-307. doi: 10.1016/j.prp.2017.09.001. Epub 2017 Sep 29. Investigation of BRAF V600E detection approaches in papillary thyroid carcinoma. Chen D1, Qi W1, Zhang P1, Zhang Y2, Liu Y2, Guan H3, Wang L4.Surgery.
- Pub Med: 2017 Jan;161(1):168-175. doi: 10.1016/j.surg.2016.04.054. Epub 2016 Nov 15. Preoperative detection of RAS mutation may guide extent of thyroidectomy. Patel SG1, Carty SE1, McCoy KL1, Ohori NP2, LeBeau SO3, Seethala RR2, Nikiforova MN2, Nikiforov YE2, Yip L4.Int J Mol Sci.
- Pub Med: 2017 Apr 12;18(4). pii: E806. doi: 10.3390/ijms18040806. Diagnostic Limitation of Fine-Needle Aspiration (FNA) on Indeterminate Thyroid Nodules Can Be Partially Overcome by Preoperative Molecular Analysis: Assessment of RET/PTC1 Rearrangement in BRAF and RAS Wild-Type Routine Air-Dried FNA Specimens.
- Pub Med: Nat Rev Endocrinol. 2017 Jul;13(7):415-424. doi: 10.1038/nrendo.2017.24. Epub 2017 Mar 31. Molecular profiling of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology. Eszlinger M1,2, Lau L3, Ghaznavi S3, Symonds C3, Chandarana SP1,4, Khalil M5, Paschke R1,2,3,6,7.