

## La diagnostica molecolare nelle neoplasie tiroidee

P.E. Macchia

Dipartimento di Endocrinologia ed Oncologia Molecolare e Clinica, Università "Federico II", Napoli

Negli ultimi anni, gli studi genetici hanno fornito un gran numero di informazioni sui meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle neoplasie tiroidee. L'applicazione delle nuove metodologie molecolari alla diagnostica ha notevolmente migliorato la possibilità di un più preciso inquadramento delle neoplasie tiroidee primitive o secondarie, come già successo in campi differenti, quali la diagnostica delle malattie infettive o di altre neoplasie.

La maggior parte delle tecniche di diagnostica molecolare parte dalla preparazione dell'acido ribonucleico (RNA) dai campioni, segue un passaggio di retrotrascrizione in DNA complementare (cDNA), e quindi l'amplificazione logaritmica di quest'ultimo attraverso la reazione di polimerizzazione a catena (PCR). Il passaggio di PCR consente di ottenere una sensibilità eccellente, decisamente superiore a quella di altre tecniche quali il Northern blot per l'analisi dell'RNA o i saggi radioimmuno metrici o l'ELISA per lo studio delle proteine. Questo vantaggio consente di partire anche da campioni che contengono un limitato numero di cellule, come quelli ottenuti da un'aspirazione con ago sottile (FNA). La citologia su ago sottile è diventata una delle principali tecniche diagnostiche pre-operatorie nel caso di neoplasie tiroidee. L'esame citologico fornisce sufficienti elementi per la diagnosi delle lesioni benigne o delle neoplasie papillifere, ma per le neoplasie follicolari solamente l'esame istologico consente oggi una diagnosi di precisione. Le tecniche molecolari potrebbero aiutare nel completamento diagnostico, con l'identificazione di geni che sono espressi esclusivamente dai carcinomi e non dalle neoplasie benigne.

Gli studi di biologia molecolare hanno permesso di definire almeno in parte le tappe essenziali della tumorigenesi tiroidea grazie all'identificazione di oncogeni implicati nelle varie tappe del processo di trasformazione neoplastica.

I geni coinvolti nei processi di trasformazione neoplastica sono in genere classificati in gruppi funzionali. Gli *oncogeni* risultano da mutazioni che determinano overespressione di proteine normalmente

presenti nelle cellule, i proto-oncogeni. Queste sono proteine che codificano per recettori di membrana o sono coinvolte nelle vie di trasmissione del segnale. Gli *oncosoppressori*, anche noti come "tumor suppressor genes" sono in genere stati identificati in seguito a fenomeni di perdita di eterozigosi (loss of heterozygosity, LOH). Il DNA del tessuto tumorale presenta un allele mancante rispetto al DNA genomico di controllo. La mancanza di un gene in questa regione determina lo sviluppo del tumore. E' questo, ad esempio, il caso di geni come *PTEN*, coinvolto nella patogenesi delle neoplasie endocrine multiple di tipo I (MEN-I).

La maggior parte delle mutazioni descritte nelle neoplasie tiroidee sono mutazioni somatiche, che si presentano esclusivamente nel DNA del tumore. Le mutazioni germinali si riscontrano invece nelle forme di neoplasie familiari, come le MEN-II. In alcune di queste neoplasie la presenza di una mutazione germinale predispone l'individuo allo sviluppo di un particolare tipo di tumore.

Infine la crescita del tumore può essere infuocata dalla presenza di particolari fattori di crescita, come - ad esempio - la tireotropina (TSH), l'insulin-like growth factor (IGFs), o il transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ).

La trasformazione neoplastica delle cellule dell'epitelio follicolare della tiroide rappresenta un modello utile per comprendere i meccanismi molecolari della trasformazione neoplastica in generale. In particolare, è stato osservato che il processo di trasformazione tumorale avviene con l'accumulo di successive mutazioni geniche all'interno della cellula, con un meccanismo denominato "multi-step". Questo meccanismo determina l'esistenza di forme tumorali più o meno differenziate in rapporto agli eventi mutageni accumulatisi, ed il risultato finale è un progressivo sdifferenziamento della cellula tiroidea con conseguente perdita di espressione di geni tipici della differenziazione cellulare. Le mutazioni descritte nelle neoplasie tiroidee coinvolgono tutti i gruppi funzionali di proteine indicate sopra, e nella tabella sono riportate le principali neoplasie tiroidee con le alterazioni molecolari descritte in letteratura.

**Tabella I.** Principali tipi di neoplasie tiroidee e mutazioni descritte.

<b>Tipo di neoplasia tiroidea</b>	<b>Gene</b>	<b>Note</b>
Adenoma autonomo	<i>Gsα/gsp</i> <i>TSH-R</i>	Mutazioni che attivano costitutivamente la cascata dell'Amp ciclico e determinano aumento della proliferazione cellulare e della produzione ormonale
Adenoma follicolare	<i>Gsα</i> <i>Ras</i> <i>PTEN</i> <i>PAX8/PPRγ1</i>	Mutazioni riscontrate negli eventi iniziali di trasformazione neoplastica Mutazioni o delezioni nel 26% dei casi Riarrangiamento recentemente descritto in carcinomi follicolari, ma successivamente trovato anche in adenomi
Carcinoma follicolare	<i>Ras</i> <i>TP53</i> <i>3p, 17p, 10q</i>  <i>PTEN</i> <i>PAX8/PPRγ1</i>	Prevalenza delle mutazioni superiore rispetto agli adenomi Coinvolta nei processi di differenziazione La perdita di eterozigosi (LOH) a questi loci è stata associata a progressione del tumore Mutazioni o delezioni nel 6% dei casi Riarrangiamento recentemente descritto in carcinomi follicolari, ma successivamente trovato anche in adenomi
Tumori a cellule di Hürtle		Fenotipicamente e geneticamente differenti dalle neoplasie follicolari
Carcinomi papilliferi della tiroide (PTC)	<i>RET/PTC</i>  <i>TRK</i> <i>MET</i> <i>Ras</i>  <i>TP53</i>	Attivato in un significativo numero di carcinomi, probabilmente in relazione all'irradiazione, e con possibili implicazioni sul comportamento della neoplasia Attivato in alcuni PTC Sovraespresso Coinvolto nelle tappe iniziali della tumorigenesi, soprattutto in caso di neoplasie con metastasi Coinvolta nei processi di differenziazione
Carcinoma anaplastico	<i>TP53</i>	Sovraespressione con o senza mutazioni in alcuni tumori
Carcinomi midollari della tiroide (MTC)		
- Forme sporadiche	<i>RET</i>	La mutazione somatica a carico del codone 918 può avere implicazioni prognostiche
- Forme familiari	<i>RET</i>	Mutazioni che attivano costitutivamente il recettore o alterano il substrato specifico. Ruolo essenziale nello screening genetico per le forme di MEN-I

Diversi oncogeni ed almeno un gene oncosoppressore sono coinvolti nella patogenesi di vari tipi di neoplasia tiroidea, come illustrato nella tabella I. Alcune mutazioni sono associate principalmente con neoplasie benigne funzionanti (*GsP*, *TSH-R*) mentre altre sono associate con neoplasie non-funzionanti sia benigne che maligne (*Ras*). Alcune mutazioni sono rilevabili in tutti gli istotipi (*Myc*, *Fos*) ma altre sono riscontrate principalmente nel PTC (*Ret/PTC*, *Met*, *TRK*) ed una esclusivamente nel carcinoma anaplastico (*p53*).

I primi eventi della trasformazione della cellula tiroidea sembrano essere la conseguenza dell'attivazione o dell'espressione "de novo" di protooncogeni o recettori per fattori di trascrizione quali *ras*, *ret*, *NTRK*, *met*, *gsp* o il recettore per il TSH. Alterazioni nell'espressione di questi geni sono associate allo sviluppo di varie neoplasie tiroidee, dall'adenoma tossico (*gsp*, recettore del TSH), ai carcinomi follicolari (*ras*) o papilliferi (*ret/PTC*, *NTRK*, *met*). Mutazioni a carico di geni oncosoppressori ("tumor suppressor gene") quali *p53* o *Rb* sono invece state riscontrate in forme più aggressive e meno differenziate di neoplasie tiroidee, suggerendo che, nel processo di tumorigenesi tiroidea questi sono eventi genetici tardivi.

E' di notevole interesse l'osservazione che un numero significativo di lesioni genetiche responsabili di neoplasie tiroidee derivano da riarrangiamenti genici e traslocazioni cromosomiche (*ret/PTC*, *NTRK*, *Pax-8/PPRγ*). Questo è un evento raro nelle altre forme di neoplasie, che rende la tumorigenesi tiroidea un processo alquanto particolare.

Infine, anche specifici fattori ambientali (carenza iodica, radiazioni ionizzanti) possono giocare un ruolo nel processo neoplastico della tiroide, promuovendo lo sviluppo del cancro o influenzandone le caratteristiche genotipiche o fenotipiche.

Lo studio degli oncogeni e dei geni oncosoppressori è fondamentale per comprendere i meccanismi della patogenesi delle neoplasie. Anche se vari aspetti devono ancora essere chiariti, molte delle osservazioni recenti hanno fornito un importante supporto clinico nella diagnosi.

Gli aspetti di maggior rilievo per quanto riguarda la diagnostica molecolare delle neoplasie tiroidee implicano i risultati che si sono ottenuti nella diagnostica delle neoplasie follicolari e quella del carcinoma midollare familiare (MTC).

Molti oncogeni e geni oncosoppressori sono caratteristici di determinati istotipi tumorali. Per questo motivo, un notevole sforzo nella ricerca è stato fatto

per cercare di identificare marcatori molecolari in grado di differenziare l'adenoma follicolare dal carcinoma follicolare partendo da campioni di aghi- spirati tiroidei. Purtroppo i vari studi effettuati fino ad oggi non hanno portato ad identificare alcun marcatore che consenta tale differenziazione.

Lo screening per il MTC familiare rappresenta un altro campo di estrema importanza della applicazione delle tecniche di biologia molecolare. Quando in un paziente viene posta la diagnosi di MTC, la sua famiglia deve essere sottoposta a screening per la malattia. Classicamente lo screening veniva effettuato mediante dosaggio della calcitonina dopo test di stimolo effettuati con somministrazione di pentagastrina e/o calcio gluconato, ma il limite di tali metodiche era rappresentato dalla positività solo dopo lo sviluppo di iperplasia delle cellule C o della neoplasia stessa. Per tale motivo il test veniva ripetuto periodicamente in tutti i familiari del paziente. Attualmente, il test genetico per la ricerca di mutazioni a carico dell'oncogene *RET* viene effettuato in tutti i familiari del paziente partendo dai linfociti del sangue periferico. Ha una sensibilità del 99% e permette la diagnosi alla nascita tramite una singola esecuzione.

L'ultimo aspetto della diagnostica molecolare applicata alle neoplasie tiroidee riguarda le possibili appli-

cazioni per quanto concerne prognosi e trattamento. La prognosi dello maggior parte delle neoplasie tiroidee è generalmente benigna, e la malattia non modifica sostanzialmente l'aspettativa di vita dei pazienti. Tuttavia, alcune forme di neoplasie presentano recidiva locale e metastasi a distanza con possibili mortalità. Attualmente la prognosi si basa sull'applicazione di criteri clinici ed anatomo-patologici, ma in futuro l'analisi molecolare della lesione tumorale primitiva o secondaria potrà consentire una valutazione prognostica più accurata.

La terapia del carcinoma tiroideo si avvale di chirurgia, ablazione del residuo tramite radioiodio e somministrazione di dosi soppressive di l-tiroxina. A tutt'oggi, sono ancora aperte varie controversie circa l'estensione ottimale dell'intervento chirurgico, sulle dosi di radioiodio, e sul grado di soppressione del TSH richiesto per trattamento. La diagnosi molecolare potrà offrire vantaggi nella pianificazione terapeutica, mentre la valutazione dell'espressione di alcuni oncogeni potrà fornire un supporto circa la valutazione predittiva sulla risposta ad un dato trattamento. Infine la conoscenza di alcune mutazioni espresse dalla neoplasia consentirà di adottare specifici agenti immunologici o chimici mirati, in grado di distruggere la cellula tumorale o di promuovere la sua differenziazione verso fenotipi meno aggressivi.