

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E
PATOLOGICA



TESI DI DOTTORATO

***“Nuovi marcatori nella diagnosi citologica del nodulo
tiroideo”***

Relatore
Ch.mo Prof.
Giancarlo Troncone

Candidato
Dr. Antonino Iaccarino

ANNO ACCADEMICO 2010 / 2011

Indice

Primo capitolo:

IL PROBLEMA CLINICO DEL NODULO TIROIDEO _____ Pag.3

- La clinica del nodulo tiroideo.....Pag.4
- La diagnostica del nodulo tiroideo..... Pag.5
- La citologia “*indeterminata*” o “*sospetta*”del nodulo tiroideo..... Pag.6
- Le metodiche ancillari di immunocitochimica nella diagnosi citologica del nodulo tiroideo..... Pag.7
- Il ciclo cellulare e la carcinogenesi..... Pag.8

OBIETTIVI DELLA TESI _____ Pag.9

Secondo capitolo:

CICLINA D3: UN NUOVO MARCATORE NELLA DIAGNOSI DELLA VARIANTE A CELLULE OSSIFILE DEL CARCINOMA FOLLICOLARE DELLA TIROIDE (HCC) _____ Pag.11

Terzo capitolo:

UBCH10 NELLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA DEL NODULO TIROIDEO ____ Pag.15

Quarto capitolo:

LA PERDITA DI ESPRESSIONE DI CBX7 SI ASSOCIA AD UN FENOTIPO AGGRESSIVO NEL CARCINOMA TIROIDEO _____ Pag.20

CONCLUSIONI _____ Pag.24

Bibliografia _____ Pag.30

Primo capitolo:

IL PROBLEMA CLINICO DEL NODULO TIRODEO

Le patologie a carico della ghiandola tiroidea sono molto diffuse e i tumori della tiroide rappresentano le più frequenti neoplasie nell'ambito del sistema endocrino e costituiscono l'oggetto di studio di numerose branche della medicina quali l'endocrinologia, l'oncologia, la diagnostica per immagini, la chirurgia e l'anatomia patologica. Solo negli USA vengono diagnosticati 20000 nuovi casi ogni anno e di questi circa l'1% sono maligni con un tasso di mortalità di oltre il 10%. (1, 2) In Italia vi è una particolare presenza di patologie a carico della tiroide soprattutto nelle aree con forte carenza di apporto di iodio e la frequenza di patologie neoplastiche è altresì elevata. L'ampio spettro delle patologie tiroidee comprende: forme infiammatorie su base autoimmunitaria quali la tiroidite di Hashimoto (HT) e il morbo di Basedow; lesioni proliferative di tipo benigno quali il gozzo nodulare (HNG) e l'adenoma follicolare (FTA); neoplasie maligne in forme ben differenziate quali il carcinoma capillifero (PTC) e follicolare (FTC) e forme meno differenziate quali il carcinoma poco differenziato (PDC) ed anaplastico (ATC). Il management chirurgico-farmacologico ed il follow up dei pazienti legato alle diverse patologie tiroidee è chiaramente molto diversificato.

La clinica del nodulo tiroideo

Negli ultimi 5 anni molte pubblicazioni scientifiche testimoniano lo sforzo comune multidisciplinare teso alla formulazione di linee guida per il trattamento delle neoplasie benigne e maligne della tiroide anche alla luce della moderna pratica di Evidence-Based Medicine (EBM) per una corretta gestione socio-economica e delle moderne tecniche di diagnosi e terapia. L'EBM non è semplicemente ciò che deriva da ricerche, bensì prevalentemente da Studi clinici (Clinical Trials) controllati e linee-guida di pratica clinica. Gli enormi passi avanti condotti nel campo della ricerca biomedica mettono oggi a disposizione sempre nuove informazioni sui meccanismi biochimici che sono alla base del processo di carcinogenesi. E' oggi imperativo basare le proprie decisioni, diagnostiche e terapeutiche, sulla valutazione critica dei risultati reperibili dalla letteratura scientifica. In campo anatomo-patologico la semplice diagnosi morfologica di una lesione neoplastica è oggi sempre più rafforzata e coadiuvata da indagini ancillari legate a nuovi marcatori. Lo sviluppo di nuovi farmaci e, soprattutto, delle terapie "target", rendono altresì necessario l'identificazione del profilo genico e fenotipico della specifica lesione per ottimizzare il trattamento chirurgico-farmacologico. Il conseguente aumento della spesa sanitaria obbliga però alla selezione sempre più accurata del giusto percorso diagnostico per ogni paziente.

La diagnostica del nodulo tiroideo

La manifestazione clinica di esordio di una disfunzione della tiroide è spesso accompagnata dalla comparsa di un nodulo tiroideo, sebbene trattasi di un segno piuttosto aspecifico. Il 4-8% della popolazione presenta, infatti, almeno un nodulo individuabile alla semplice palpazione e tale percentuale incrementa notevolmente se si considerano i dati incidentali che emergono da esami ecografici (eco carotide o parotide) ed ancor più se si analizzano riscontri medico-legali che ne evidenziano la presenza nel 50 % dei reperti autoptici. Soltanto una piccola percentuale (5%) di tali noduli nasconde però lesioni maligne ed è pertanto fondamentale individuare ma soprattutto caratterizzare i noduli della tiroide ancor più in fase preoperatoria (3). Esiste attualmente un algoritmo sistematico per la valutazione del nodulo tiroideo, basato sulla storia clinica, l' esame obiettivo locale, la misura dell' ormone TSH, l' ecografia del collo e l' agoaspirato (FNC) con e senza guida ecografica. L' FNC ha sicuramente un ruolo centrale nel management del paziente con noduli alla tiroide essendo una procedura poco invasiva, e particolarmente utile per determinare l' entità' dell' approccio chirurgico (lobectomia o tiroidectomia).

La citologia “*indeterminata*” o “*sospetta*” del nodulo tiroideo

L' esame citologico presenta però delle limitazioni diagnostiche legate alla natura del campione ed è per questo che il sistema di classificazione dei criteri è in continua evoluzione anche sulla base della valutazione del rischio di malignità (MR) necessitando di sempre nuovi marcatori molecolari di supporto alla diagnosi morfologica. Nell' attuale classificazione Bethesda (National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference) esiste ancora una zona grigia nella diagnosi citologica tiroidea costituita dalle categorie diagnostiche del TIR3 e TIR4. (4) In tali categorie è ancor più importante individuare nuovi marcatori che ci permettano di meglio definire la diagnosi citologica e discernere tra lesioni maligne e benigne per evitare una chirurgia in due tempi con aggravio della spesa sanitaria e maggior impatto clinico per il paziente. Ad oggi una diagnosi citologica di TIR3 e TIR4 rappresenta una chiara indicazione alla chirurgia con intervento di lobectomia. (4)

Cellule follicolari disposte in gruppi affollati e/o micro-follicoli vengono oggi diagnosticate in citologia come TIR3 ovvero “neoplasia follicolare o sospetto di neoplasia follicolare”. (4) Il riscontro istologico di lesioni diagnosticate citologicamente come “*undeterminate*” evidenzia semplici noduli iperplastici di un gozzo adenomatoso o proliferazioni benigne quali l' adenoma follicolare ma può anche nascondere carcinomi papilliferi a variante follicolare (FV-PTC) o carcinomi follicolari (FTC). (4) Statisticamente in questa categoria diagnostica MR=20% e ciò a dire che una lesione

su cinque risulta essere maligna e richiede pertanto la radicalizzazione chirurgica con un successivo intervento. (4)

Cellule raggruppate in strutture papillari il cui nucleo ha anomalie nucleari evidenti non sufficienti a definire una diagnosi certa di carcinoma papillifero (PTC) rientrano nella categoria di diagnosi di TIR4. L' esame istologico dei noduli con diagnosi citologica "*sospetta*" rivela nella maggioranza dei casi la presenza di un carcinoma papillifero con un MR=66% con necessità di prosieguo dell' iter chirurgico. (4)

In citologia pertanto, informazioni aggiuntive alla diagnosi morfologica sono particolarmente richieste nelle categorie TIR3 e TIR4 e sempre nuovi marcatori sono allo studio per meglio definire la diagnosi citologica. (5)

Le metodiche ancillari di immunocitochimica nella diagnosi citologica del nodulo tiroideo

Numerosi marker immunocitochimici sono studiati in letteratura e si è ormai abbandonata l' idea di un marker unico capace di identificare la malignità di una lesione sospetta ponendo sempre più l' attenzione alla identificazione di un "panel" di anticorpi in grado di apportare informazioni aggiuntive. (5) L' insieme di più marcatori fenotipici ci permette di migliorare l' accuratezza diagnostica ed i valori predittivi di malignità nelle lesioni citologiche dubbie ma può anche fornire importanti informazioni prognostiche e terapeutiche. Particolare interesse nella letteratura scientifica attuale è rivolto ai geni ed alle molecole coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, ritenute in primis coinvolte nei processi di carcinogenesi. (6)

Il ciclo cellulare e la carcinogenesi

La regolazione del ciclo cellulare è un meccanismo estremamente complesso che richiede la comprensione di numerosi pathway molecolari finemente regolati, basilari per l' accrescimento e la sopravvivenza degli organismi pluricellulari. Lo studio di tali meccanismi può fornire sicuramente nuovi strumenti di conoscenza e di controllo della cancerogenesi. (6) Il ciclo cellulare è costituito fondamentalmente da due parti: l' interfase e la mitosi. L' interfase, nelle cellule eucariotiche, è essenzialmente il periodo di tempo del ciclo di divisione cellulare che intercorre tra due mitosi. (6) È suddiviso in quattro fasi successive: la fase G1 in cui la cellula provvede alla sintesi di tutti i componenti da ripartire alle cellule figlie e dei complessi enzimatici necessari alla progressione; la fase S in cui avviene la duplicazione del materiale genetico del nucleo; la fase G2 in cui continua l' accrescimento cellulare e la sintesi di nuove molecole necessarie nella fase mitotica. Eccetto il comparto germinale, al di là di processi fisio-patologici, la stragrande maggioranza delle cellule del nostro organismo permane per gran parte del tempo in uno stato di non proliferazione che prede il nome di fase G0. (6) L' ingresso e la progressione lungo il ciclo cellulare sono regolati da oscillazioni nei livelli di concentrazione e nella attività di specifiche molecole che prendono il nome di cicline. La sintesi e la degradazione delle specifiche cicline segue una precisa sequenza temporale. La regolazione delle diverse fasi del ciclo cellulare dipende da specifiche cicline ed è regolata a livello di trascrizione genica ma, soprattutto, in fase post-trascrizionale mediante meccanismi di degradazione proteosomica ubiquitina-dipendente. (6)

OBIETTIVI DELLA TESI

Questa Tesi si è proposta di validare nella diagnostica citologica del nodulo tiroideo alcuni marker di malignità come schematicamente indicato:

1) CICLINA D3 UN NUOVO MARCATORE NELLA DIAGNOSI DELLA VARIANTE A CELLULE OSSIFILE DEL CARCINOMA FOLLICOLARE DELLA TIROIDE (HCC).

Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato su campioni istologici operatori (tiroidectomie totali e lobectomie), come nel HCC si verifichi l'iper-espressione di un importante regolatore della transizione G1/S del ciclo cellulare: la ciclina D3; ciò ha come conseguenza l'accumulo e l'inattivazione della proteina p27, importante inibitore del ciclo cellulare. Tale meccanismo molecolare è esclusivo dell'HCC, mentre non è stato evidenziato nelle neoplasie benigne a cellule di Hurthle (HCA), che mostrano su campione operatorio bassi livelli di espressione della ciclina D3 senza accumulo di p27. La ciclina D3 e p27 rappresentano quindi marcatori specifici dell'HCC. Nel corso di questa Tesi abbiamo validato le cicline D1 e D3 nella diagnosi citologica dell' HCC. Tale argomento costituisce il secondo capitolo di questa Tesi.

2) UBCH10 NELLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA DEL NODULO TIROIDEO.

UbcH10 è uno dei componenti del sistema ubiquitina/proteosoma da cui dipende la degradazione di diverse molecole target, tra cui le cicline mitotiche. L'espressione di questa proteina è scarsamente rilevabile nei tessuti normali della tiroide, nei gozzi e negli adenomi, mentre è stato osservato un suo aumento di espressione in carcinomi papillari e follicolari tiroidei, fino al raggiungimento di livelli più alti nei carcinomi anaplastici. E' stato, inoltre, ampiamente dimostrato che UbcH10 rappresenti un marker di proliferazione, in particolar modo della fase G2/M. Nello svolgimento della Tesi è stato valutato l'impiego di UbcH10 come marker diagnostico molecolare da associare alla tecnica dell'ago aspirato nella diagnosi di patologie tiroide. Tale argomento costituisce il terzo capitolo di questa Tesi.

3) LA PERDITA DI ESPRESSIONE DI CBX7 SI ASSOCIA AD UN FENOTIPO AGGRESSIVO NEL CARCINOMA TIROIDEO

Uno studio di espressione genica svolto preliminarmente alla stesura di questa Tesi ha messo in rilievo che il gene CBX7 è sottoespresso in sei linee cellulari di carcinoma tiroideo rispetto alle linee cellulari di controllo. CBX7 codifica per una proteina di 251 aa che sembra essere coinvolta nella compattazione cromatinica e pertanto nel controllo del normale ciclo cellulare. Lo scopo di una sezione di questa Tesi è stato di valutare l'espressione di CBX7 nei diversi istotipi tumorali tiroidei e valutare la possibilità di utilizzo quale marker diagnostico e prognostico del cancro tiroideo. Tale argomento costituisce il quarto capitolo di questa Tesi.

Secondo capitolo:

Ciclina D3: un nuovo marcatore nella diagnosi della variante a cellule ossifile del carcinoma follicolare della tiroide (HCC)

Le cicline del tipo D (D1, D2, e D3) sono cruciali per la transizione G1-S e la loro sintesi, a seguito di stimoli mitogenici, è fondamentale per l' innesco della proliferazione cellulare e la fuoriuscita dalla fase di quiescenza G0. (7,8) L'attuale panel immunocitochimico di riferimento in letteratura per la caratterizzazione delle lesioni tiroidee è costituito da Gal3, HMBE-1 e Ck19 che risulta però poco applicabile alle lesioni oncocitarie a cellule di Hurthle soprattutto per le difficoltà interpretative del segnale citoplasmatico, essendo le cellule ossifile costituite da un ampio citoplasma ricco di biotina endogena che spesso produce un segnale aspecifico. (5) La ciclina D1 è molto studiata in letteratura nelle lesioni tiroidee e la sua overespressione è ormai ampiamente riconosciuta quale indicatore di maggiore aggressività tumorale e capacità metastatica. La ciclina D3 sembra essere coinvolta soprattutto nella trasformazione neoplastica delle cellule tiroidee ed essendo un importante check-point di controllo della fase G1 delle cellule follicolari tiroidee potrebbe avere un ruolo oncogenetico ed è espressa a livello nucleare. (8) In un precedente lavoro effettuato su campioni istologici, cui ho partecipato, era emerso che nelle varianti ossifile del carcinoma papillifero (HC-PTC) e follicolare (HCC) vi è un inaspettato accumulo della proteina p27Kip1 in associazione ad over-espressione di ciclina D3. (9) Non vi sono studi precedenti su campioni citologici ma, dal momento che le neoplasie a cellule di Hurthle nelle categorie diagnostiche TIR3 e

TIR4 hanno un maggiore indice di malignità, diventa cruciale distinguere tra lesioni benigne e maligne per ottimizzare il management chirurgico del paziente.

Nel corso del dottorato in Morfologia Clinica e Patologica ci siamo proposti di valutare se la ciclina D3 potesse essere utile quale marker di malignità delle lesioni a cellule di Hurthle ed applicabile in citologia. Abbiamo raccolto numerosi casi di FNC della tiroide nell'ambulatorio di Citopatologia della Università degli Studi di Napoli Federico II ed in collaborazione con il San Luigi Hospital di Ordassano presso l'Università di Torino. Per ogni campione citologico è stato preventivamente collezionato un prelievo dedicato in formalina non tamponata per l'allestimento di un cell-block cellulare (CB) mediante il kit cytoblock (Shandon). Soltanto i casi TIR3 e TIR4 sospetti per neoplasie ossifile, dei quali avevamo a disposizione la diagnosi istologica definitiva, sono stati selezionati ed avviati alla caratterizzazione immunocitochimica. L'immunocitochimica per ciclina D3 e ciclina D1 è stata effettuata su sezioni paraffinate di una casistica di 51 CB ottenuti da FNC ritenuti rappresentativi, previa valutazione con colorazione Ematossilina/Eosina (Figure 1, 2). Al follow up istologico 10 casi si sono rivelati semplici noduli iperplastici con aspetti a cellule di Hurthle; 4 tiroiditi di Hashimoto (HT); 18 adenomi follicolari a cellule ossifile; 4 carcinomi papilliferi a variante oncocitaria; 15 carcinomi follicolari a cellule di Hurthle (HCC). I risultati dell'immunocitochimica hanno evidenziato una aumentata espressione di entrambe le cicline nelle lesioni maligne rispetto ai noduli iperplastici e all'adenoma a cellule di Hurthle (Figure 1, 2). L'incremento della ciclina D3 ha confermato i nostri dati istologici preliminari ed ha mostrato una applicabilità ai campioni di FNC. L'

analisi statistica dei dati ha evidenziato una notevole variabilità di accuratezza nella diagnostica delle lesioni ossifile della tiroide con notevole incremento di sensibilità e specificità in relazione al cutoff scelto ed all' utilizzo singolo o combinato dei due marcatori. Un cutoff $> 25\%$ è stato precedentemente utilizzato in lavori istologici per lo score dell' espressione della ciclina D1 in lesioni a cellule di Hurthle. Dapprima abbiamo analizzato i dati applicando gli stessi criteri alla ciclina D3 e calcolato il valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) del test immunocitochimico nell' utilizzo esclusivo (D1 o D3) dei marcatori ottenendo il massimo della specificità (100%) ed una migliore sensibilità diagnostica (89%) rispetto ai marcatori considerati singolarmente (D1=32% e D3=79%). Pertanto nessun campione di FNC con diagnosi sospetta di neoplasia oncocitica e follow up istologico benigno è risultato positivo. Ciononostante due campioni con istologia maligna sono risultati negativi al test Ciclina D1-D3 anche con l' utilizzo esclusivo dei marcatori. Nel tentativo di migliorare le performance del test immunocitochimica, allo scopo ridurre i falsi negativi ed inviare correttamente alla terapia chirurgica tutti i pazienti con carcinoma tiroideo, abbiamo calcolato il cutoff maggiormente predittivo di malignità utilizzando l' analisi ROC. Un valore soglia più restrittivo (6,5 per ciclina D1 e 7,5% ciclina D3) ci ha permesso di ottenere una sensibilità assoluta (100%) e valori soddisfacenti in termini di predittività negativa (NPV) in un utilizzo combinato (D1 e D3) dei due marcatori (PPV=90%) con una buona accuratezza diagnostica del 96%. La ciclina D3 sicuramente aumenta il sospetto diagnostico di malignità nelle lesioni oncocitiche TIR3 e TIR4 in relazione al cutoff scelto e soprattutto se utilizzata in combinazione alla ciclina D1.

La overespressione di ciclina D3 è sicuramente associata ad un fenotipo maligno delle lesioni a cellule ossifile della tiroide e i meccanismi post-trascrizionali che portano al suo accumulo sono significativamente associati ad una prognosi peggiore. La ciclina D3 aumenta la proliferazione delle cellule neoplastiche sequestrando la proteina p27Kip1 (inibitore ciclino-dipendente chinasi) in un complesso enzimatico inattivo. (10) L'indagine immunocitochimica per ciclina D3 e D1, alla luce dei dati ottenuti, suggerisce che questi marcatori possano essere inseriti quali nuovi componenti del panel Gal3, HMBE1 e Ck19 per meglio caratterizzare le lesioni a cellule ossifile in fase preoperatoria mediante FNC (11, 12). L'utilità diagnostica fornita dall'inserimento delle cicline quali nuovi componenti del panel immunocitochimico è inoltre favorito dall'essere un marker nucleare, che è sicuramente più adatto alla valutazione delle cellule di Huthle, riducendo drasticamente errori interpretativi del risultato.

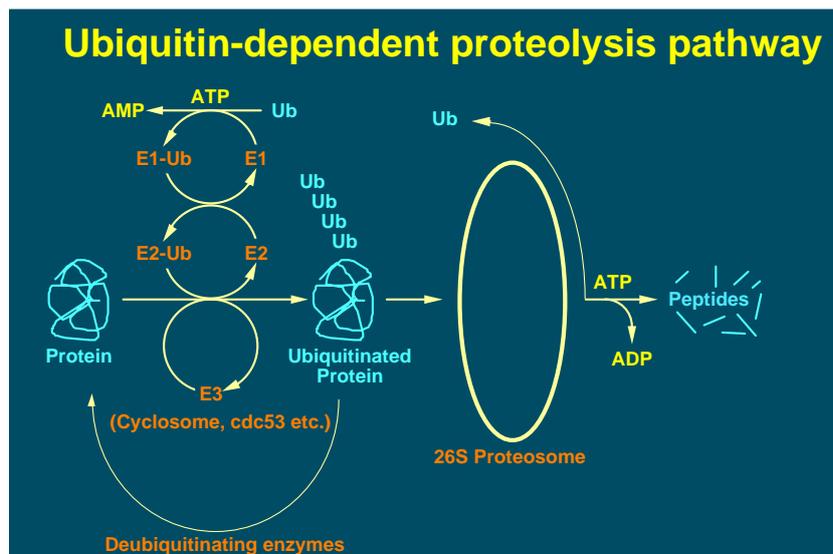
Terzo capitolo:

Ubch10 nella diagnostica citologica del nodulo tiroideo

Nel corso della ricerca svolta durante il Dottorato ho valutato il possibile utilizzo dell' anticorpo anti-Ubch10 in campioni di FNC di lesioni tiroidee diagnosticate come TIR3 e TIR 4 quale indicatore di proliferazione e possibile nuovo marker aggiuntivo del panel immunocitochimico utilizzato per la caratterizzazione delle lesioni tiroidee.

Il gene UBch10 è stato identificato mediante una tecnologia di screening di microarray dal gruppo di ricerca del Prof Fusco su lisato di linee cellulari di carcinomi della tiroide in cui è risultato significativamente up-regolato rispetto al tessuto normale di controllo. (13, 14) Ubch10 appartiene alla famiglia dei geni E2 e codifica per una proteina di 19.6 kDa ed è un carrier selettivo della ciclina B coinvolto nella sua degradazione ubiquitina-dipendente indispensabile nella transizione G2-M del ciclo cellulare. (12) A livello post-trascrizionale tre diversi enzimi cooperano alla degradazione della proteina target e nello specifico l' enzima E2, coniugante l' ubiquitina, trasferisce l'ubiquitina attiva attraverso l' enzima attivante l' ubiquitina E1 a residui di lisina delle proteine target in cooperazione con l' ubiquitina ligasi E3. (13) Le proteine poliubiquitinate vengono poi riconosciute dal proteosoma 26S e rapidamente degradate. Studi recenti evidenziano un ruolo centrale svolto da Ubch10 in tale sistema sia nella degradazione delle cicline mitotiche A e B che di importanti complessi enzimatici coinvolti nella progressione nelle fasi tardive del ciclo cellulare. La sua

attività enzimatica in associazione all' APC (anaphase promoting complex)-E3 innesca la degradazione della ciclina B, consentendo alla cellula di completare la mitosi, di intraprendere una nuova divisione e di incrementare il ritmo della proliferazione cellulare.



L' anticorpo anti Ubch10 (Boston Biochem, Cambridge, Mass) già utilizzato dallo stesso gruppo di ricerca, è stato da me testato in immunocitochimica in un precedente lavoro svolto su sezioni istologiche di linfoma, (13) da cui è emersa una maggiore espressione nei tumori di alto grado con maggior indice proliferativo. Per valutare la possibilità di applicazione in citologia abbiamo raccolto 84 casi di FNC tiroidei sospetti per neoplasie maligne (TIR3 e TIR4). Una valutazione on-site su strisci citologici colorati mediante Diff Quick ci ha permesso di selezionare i casi utili al nostro progetto di studio, raccogliendo preventivamente un prelievo dedicato in formalina per l' allestimento del citoincluso. Il CB è stato ottenuto con la tecnica del

coagulo utilizzando il sistema plasma-trombina. La colorazione Ematossilina/ Eosina di una sezione paraffinata ha permesso di selezionare ulteriormente i campioni ritenuti rappresentativi tra quelli di cui avevamo a disposizione il follow up istologico. Il criterio di adeguatezza del cell-block considerato, in accordo con Sancez e Selvaggi, è stata la presenza di almeno 3 gruppi di cellule follicolari o 2 frammenti tessutali. Nella serie selezionata 30 campioni sono risultate lesioni maligne al controllo istologico e nello specifico: 23 carcinomi papilliferi (PTC); 4 carcinomi follicolari (FTC); 1 variante follicolare di carcinoma papillifero (FV-PTC); 1 carcinoma anaplastico (ATC); 1 carcinoma a cellule di Hurthle (HCC). Tra le lesioni benigne vi erano soprattutto noduli iperplastici (HN) ed adenomi follicolari (FTA). Su tutti i campioni è stata effettuata la valutazione immunoistochimica utilizzando sia l' anticorpo anti-Ubch10 che anti-Ki67, acclarato marker di proliferazione cellulare, ampiamente studiato in letteratura. L' immunocitochimica su CB ottenuti da FNC diagnosticati come TIR3 e TIR4 è stata effettuata utilizzando un sistema di rivelazione biotina-streptavidina in perossidasi (Dako). Le sezioni sparaffinate ed idratate hanno subito smascheramento antigenico (tampone citrato pH 6) in forno a microonde (3 cicli da 5 min.) a 750W e successivo blocco delle perossidasi endogene in metanolo-perossido al 3%. L' anticorpo policlonale rabbit anti-Ubch10 è stato utilizzato ad una diluizione di 1:1000 mentre l' anticorpo monoclonale mouse anti-Ki67 clone MIB1(Dako, Glosrup, Denmark) ad una diluizione 1:100. La reazione colorimetrica è stata sviluppata utilizzando il cromogeno diaminobenzidina (DAB) della Dako. Una sezione paraffinata ottenuta da CB di FNC diagnosticato istologicamente come linfoma di alto grado, recuperato dal nostro archivio, ci ha

fornito il controllo positivo; una sezione analoga è servita come controllo negativo (omettendo l'anticorpo primario). La positività delle singole cellule è stata valutata con un sistema computerizzato (Ibas 2000, Kontron, Zeiss, Monaco, Germania) sia per Ubch10 che per Ki67. Il Mann-Whitney U test è stato utilizzato per determinare la diversa espressione di Ubch10 e Ki67 tra gli FNC associati alle lesioni istologiche benigne e maligne ed un $p < .05$ ha confermato la significatività statistica dei dati. Nelle lesioni con follow up istologico di malignità, l'immunocitochimica approntata sui CB di FNC tiroidei TIR3 e TIR4 ha mostrato un incremento di espressione di Ubch10 rispetto alle lesioni benigne. L'analisi statistica dei dati ha evidenziato un significativo aumento di accuratezza diagnostica (dal 93% al 96%) nell'uso combinato di Ubch10 e Ki67. Il cutoff più predittivo di malignità calcolato sullo score dei CB citologici sospetti è però troppo basso ($>1,25\%$) per avere un significato clinico valido. Conseguentemente l'immunocitochimica per Ubch10 non incrementa specificità ed accuratezza diagnostica e non migliora le performance di KI67 quale marker proliferativo. Il basso cut off utilizzato per Ubch10 rende però poco applicabile tale marker immunocitochimico ai campioni citologici di per se poco cellulati. (Fig. 3)

Un' applicazione futura di Ubch10 potrebbe essere invece quale marker molecolare di proliferazione anche in considerazione del fatto che l' anticorpo anti-Ki67 trova ampia applicazione quale marker fenotipico di proliferazione ma ben poco si conosce sulla molecola target. (Fig. 3) Per tale motivo, i livelli di mRNA di Ubch10 sono stati valutati sugli stessi campioni di FNC di CB sospetti per neoplasie follicolari mediante analisi quantitativa in Real Time PCR (QRT-PCR). Per estrarre l' RNA è stato utilizzato

un prelievo dedicato, preventivamente raccolto in TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, Calif) e subito congelato a -80°C . La concentrazione e la qualità dell' RNA ottenuto è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del) in dotazione al Dipartimento Di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell' Università degli Studi di Napoli Federico II. Un microgrammo di RNA totale è stato retrotrascritto seguendo le indicazioni del kit QuantiTect Reverse Transcription (QUIAGEN, Valencia, Calif). La QRT-PCR è stata eseguita, in collaborazione con il Prof Fusco, utilizzando l' apparecchiatura 7900 HT SDS (Applied Biosystems). L' espressione di Ubch10 a livello proteico fornita dall' immunocitochimica è stata paragonata ai livelli di mRNA calcolati con QRT-PCR. L' analisi statistica comparativa dei dati ha mostrato che la determinazione di Ubch10 mediante QRT-PCR è meno accurata (Sens=72%, Spec=67%, PPV=94%, NPV=26% ed Acc=71%) rispetto al test immunofenotipico. La determinazione dei livelli di mRNA di Ubch10 può essere utilizzata come test diagnostico molecolare rientrando in un panel di gene-assay. Nei campioni citologici analizzati, sospetti per neoplasie maligne, Ubch10 è risultato significativamente più espresso nelle lesioni con follow up istologico maligno. Abbiamo pertanto eseguito un' analisi quantitativa di mRNA anche per Ciclina D2 (CCND2) e proteina convertasi 2 (PCSK2) sui campioni di CB citologici TIR3 e TIR4 . La valutazione statistica dei dati dimostra che Ubch10 migliora l' accuratezza dignostica dei marcatori molecolari già utilizzati in letteratura, soprattutto in associazione a CCND2.

Quarto capitolo:

La perdita di espressione di CBX7 si associa ad un fenotipo aggressivo nel carcinoma tiroideo

L'ampio spettro di neoplasie che originano dalle cellule follicolari della tiroide costituisce un buon modello di studio per i processi biomolecolari che intervengono nella carcinogenesi. Il potenziale maligno dei carcinomi tiroidei varia da forme con fenotipo ben differenziato a lesioni completamente indifferenziate. Il carcinoma papillifero classico (PTC) è una forma ben differenziata con buona prognosi ma la sua variante a cellule alte "*tall cell*" (TCV-PTC) ha una prognosi sicuramente peggiore. Il carcinoma poco differenziato (PDC) ha un indice di sopravvivenza di 5 anni mentre il carcinoma anaplastico (ATC), fenotipicamente indifferenziato ha un comportamento ancor più aggressivo e risulta spesso fatale. (14) Il gruppo del Prof Fusco, con cui ho collaborato nel corso del dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica, ha individuato un possibile indicatore di aggressività tumorale delle neoplasie tiroidee: CBX7. Per individuare nuovi geni coinvolti nella cancerogenesi della ghiandola tiroidea è stata effettuata un'analisi basata sulla tecnologia di screening di microarray (U95Av2 Affimetrix) contenente 12.625 trascritti. È stato estratto l'RNA dal lisato di sei colture cellulari di differenti neoplasie tiroidee: carcinoma papillifero (TPC-1 e FB-2), carcinoma follicolare (WRO), carcinoma poco differenziato (NPA), carcinoma anaplastico (ARO e FRO). (15)

Dall' ibridazione è emerso che il gene CBX7 è fortemente deregolato in tutte le neoplasie tiroidee rispetto alle linee cellulari di controllo maggiormente nelle forme più indifferenziate ed a comportamento più aggressivo come confermato da successive analisi di qRT-PCR. Il gene CBX7 appartiene alla famiglia delle proteine Polycomb, è situato sul cromosoma 22q13.1 e codifica per una proteina di 28.4 kDa che possiede un dominio di controllo del rimodellamento cromatinico definito *Chromodomain* (**chr**omatin **o**rganization **m**odifier). (16) CBX7 modula la compattazione cromatinica e pertanto sembra essere coinvolto nel controllo della normale proliferazione cellulare delle cellule eucariotiche, permettendo la trascrizione genica delle molecole regolatrici durante le diverse fasi del ciclo cellulare. Questi dati preliminari indicano che CBX7 possa avere un ruolo di oncosoppressore e la sua perdita di espressione nelle linee cellulari di carcinoma tiroideo maggiormente indifferenziate potrebbe correlare con il grado di aggressività tumorale. In citologia, nelle categorie diagnostiche TIR3 e TIR4, l'indicazione di un marcatore del grado di aggressività tumorale potrebbero fornire un contributo aggiuntivo all' attuale panel immunocitochimico di riferimento. Per valutare se CBX7 possa essere utilizzato come marcatore fenotipico su campioni citologici di FNC di tiroide è stato inizialmente testato in immunocitochimica l' anticorpo utilizzato dal gruppo di lavoro del Prof Fusco.

Le linee cellulari di impiegate nello screening di microarray, sono state incluse in paraffina mediante la tecnica del cell-block cellulare con il kit cytoblock Shandon utilizzato routinariamente in citologia per i preparati diagnostici di FNC. Le flask con le cellule in sospensione in mezzo di coltura DMEM contenente 10% di siero

bovino fetale (Gibco Laboratories) sono state centrifugate a 1000 RPM per 5 minuti in provette coniche falcon ottenendo così la sedimentazione del pellet. Tre lavaggi successivi con soluzione fisiologica sono stati sufficienti ad allontanare residui contenuti nel mezzo di coltura che interferissero con la polimerizzazione della resina utilizzata nel kit. Le cellule sedimentate sono state risospese in 5 ml di formalina e lasciate over-nigth per la fissazione. Seguendo le indicazioni fornite nel kit ed avvalendoci della nostra esperienza abbiamo preparato un CB per ogni linea cellulare di carcinoma papillifero (TPC-1 e FB-2), carcinoma follicolare (WRO), carcinoma poco differenziato (NPA), carcinoma anaplastico (ARO e FRO). Una linea cellulare di tireociti normali è stata ugualmente processata ed utilizzata come controllo. Sono state tagliate a microtomo a rotativa delle sezioni paraffinate di 4 micron per allestire l' immunocitochimica per CBX7 ed una sezione colorata con Ematossilina/Eosina è servita per valutare la congruità dei preparati. La colorazione immunocitochimica per CBX7 (diluizione 1:1000) è stata effettuata utilizzando un sistema di rivelazione in polimero ad elevata sensibilità applicato all'immunocoloratore automatizzato BenchMark (Ventana Medical Systems, Inc) in dotazione all' area funzionale di Citopatologia. La positività nucleare di CBX7 si è sviluppata nella quasi totalità delle cellule tireocitarie normali del CB di controllo; nei citoinclusi ottenuti da colture TPC-1, NPA, WRO e FB-2 solo una percentuale delle cellule è risultata positiva; le cellule ARO e FRO sono risultate completamente negative.

Dall' archivio del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell' Università degli Studi di Napoli Federico II sono stati selezionati campioni istologici rappresentativi delle diverse

neoplasie tiroidee, insieme a campioni citologici su cell-block. I blocchetti inclusi in paraffina sono stati ritagliati per colorazione Ematossilina/Eosina e rivalutati selezionando 55 casi così suddivisi: 20 Adenomi follicolari (FTA), 30 carcinomi papilliferi classici (PTC), 6 carcinomi papilliferi variante follicolare (TCV-PTC), 32 carcinomi follicolari (FTC), 12 carcinomi poco differenziati (PDC) e 12 carcinomi anaplastici (ATC). Come tessuto di controllo sono stati utilizzati blocchi in paraffina ottenuti dal lobo controlaterale in pazienti tiroidectomizzati per PTC. L'immunocolorazione per CBX7 è stata eseguita come precedentemente descritto per i CB da coltura cellulare ottimizzando la procedura ai campioni istologici di archivio. La valutazione del segnale di positività nucleare è stata effettuata con un sistema computerizzato (Ibass 2000, Kontron, Zeiss). I campioni istologici in cui la percentuale di cellule positive è risultata $> 50\%$ sono stati classificati come ad elevata espressione di CBX7; i campioni con una positività di cellule $< 50\%$ come a bassa espressione. Una classificazione dei campioni tenendo conto della riduzione di espressione del segnale immunocitochimico, alla luce dei dati ottenuti, ha dato i seguenti risultati: nessun (0/20) FTA; il 57% (17/30) dei PTC classici; l' 83% (5/6) dei TCV-PTC; il 66% (21/32) dei FTC; il 75% dei PDC; il 100% (12/12) degli ATC. Risultati analoghi sono stati ottenuti sui corrispondenti campioni citologici inclusi in paraffina

CONCLUSIONI

Questa Tesi ha dimostrato:

1) l'efficacia di una nuova applicazione clinica delle Cicline tipo D nella diagnosi pre-operatoria del nodulo tiroideo; la valutazione della espressione di tali proteine può essere utile per distinguere in prima istanza, su campione pre-operatorio, le neoplasie a cellule di Hurtle maligne da quelle benigne senza ricorrere ad un intervento chirurgico diagnostico di lobectomia tiroidea.

2) la possibilità di includere UbcH10 come componente del panel immunocitochimico per la diagnosi citologica del nodulo tiroideo. Abbiamo dimostrato come l'espressione di questa proteina sia scarsamente rilevabile nei tessuti normali della tiroide, nei gozzi e negli adenomi, mentre è stato osservato un suo aumento di espressione in carcinomi papillari e follicolari tiroidei. Tale caratteristica biologica è particolarmente utile dal punto di vista diagnostico utilizzando di UbcH10 come marker molecolare da associare ad altri geni come PCSK2 e CCND2 in analisi effettuate mediate qQRT-PCR.

3) la possibilità di includere CBX7 come componente del panel immunocitochimico per la diagnosi citologica del nodulo tiroideo. I risultati hanno evidenziato un progressivo decremento nella espressione di CBX7 con l'aumentare del grado di malignità e lo stadio patologico della neoplasia. Inoltre, tale decremento è riscontrabile in una percentuale di casi sempre maggiore dall'adenoma al carcinoma papillifero (PTC), follicolare ed anaplastico (ATC), suggerendo che esiste una significativa correlazione tra la perdita di espressione di CBX7 e malignità, correlazione utile per utilizzare CBX7 come marker di malignità su ago-aspirato.

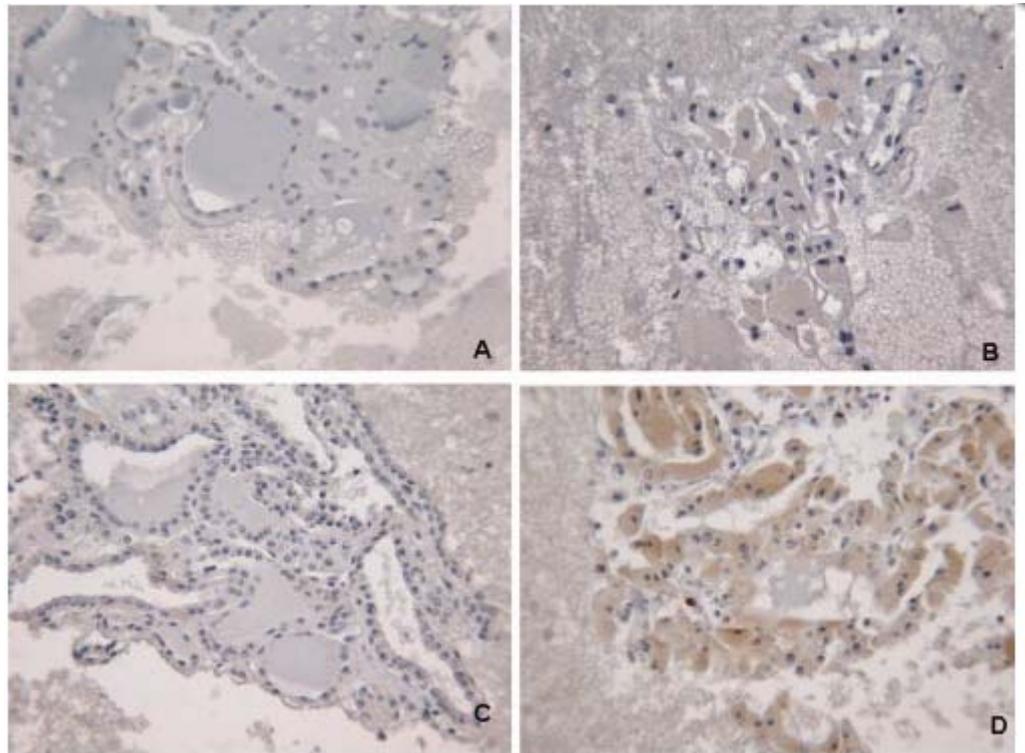


Fig.1. L' espressione di Ciclina D3 (A,C) e D1 (B,D) in cell-block ottenuti da ago aspirati di lesioni oncocitarie benigne

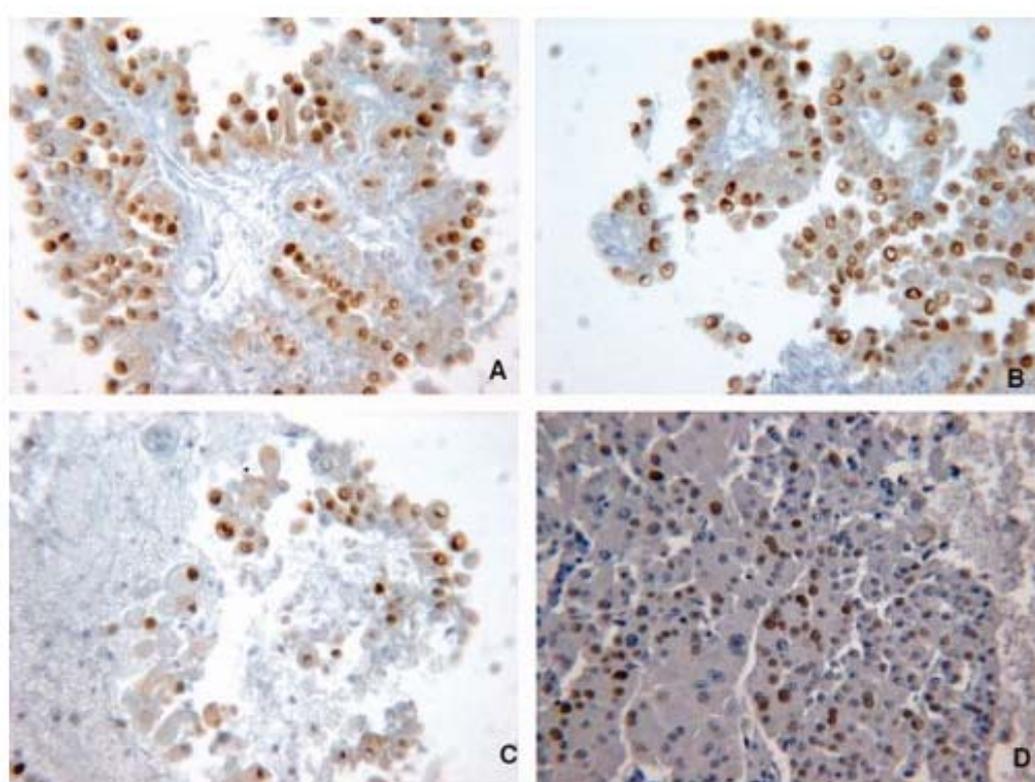


Fig.2. L' espressione di Ciclina D3 (A,C) e D1 (B,D) in cell-block ottenuti da ago aspirati di lesioni oncocitarie maligne

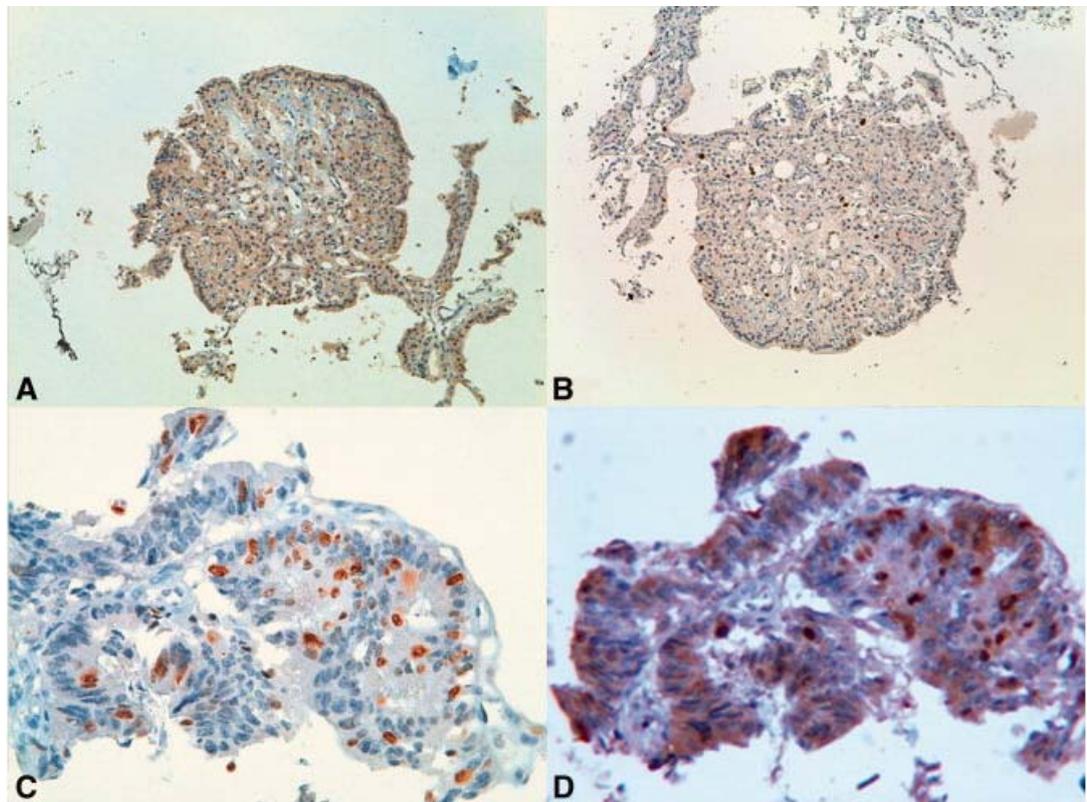


Fig 3. Ubch10 e Ki-67 in ago aspirati ottenuti da lesioni benigne (A-B) e maligne (C-D)

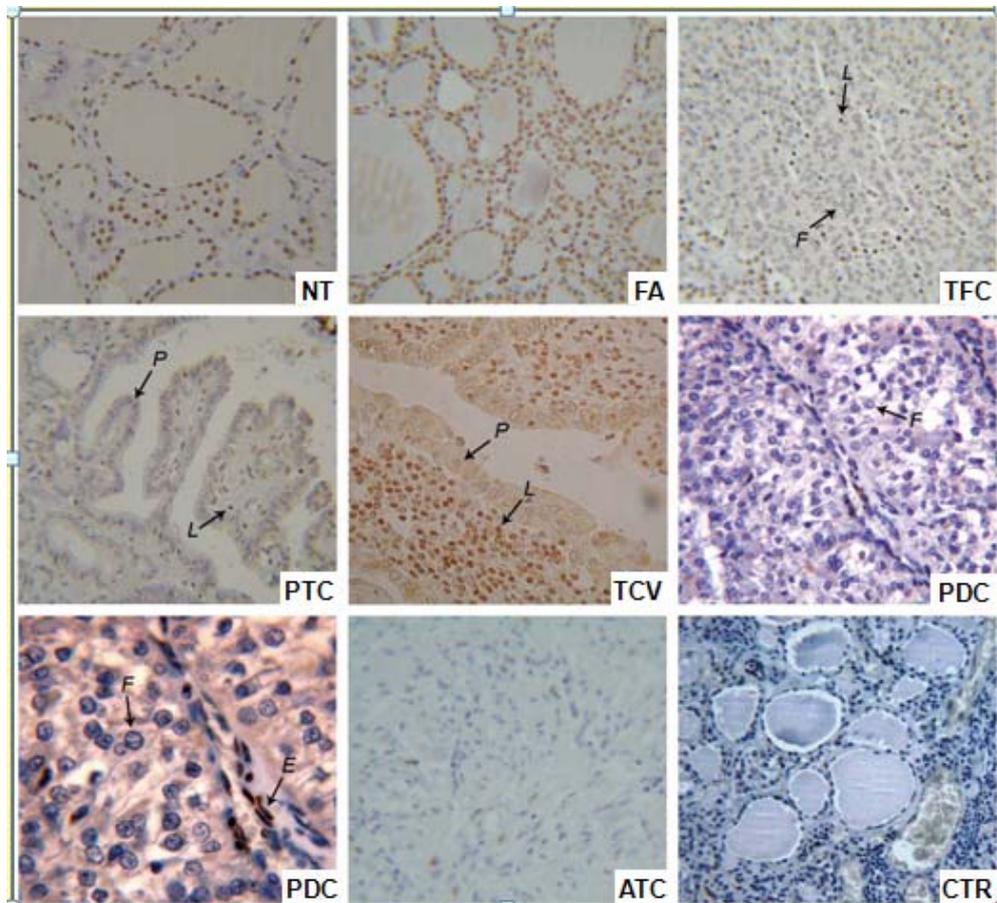


Fig 4. L'espressione di CBX7 nello spettro della cancerogenesi tiroidea

Bibliografia:

- 1) Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report. Lyon: IACR Press; 2003.
- 2) Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2007. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/
- 3) Burgess JR, Tucker P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid* 2006;16:47-53.
- 4) Ali, Syed Z.; Cibas, Edmund S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, Springer US; 1 edizione (6 febbraio 2010)
- 5) Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, *et al.* Characterization of thyroid ‘‘follicular neoplasms’’ in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12:305-317.
- 6) Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*. 2000;60:3689-3695
- 7) Khoo ML, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1810-1813.
- 8) Khoo ML, Beasley NJ, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1814-1818.
- 9) Troncone G, **Iaccarino A**, Russo M, *et al.* Accumulation of p27(kip1) is associated with cyclin D3 overexpression in the oxyphilic (Hurthle cell) variant of follicular thyroid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:377-381.
- 10) Depoortere F, Van Keymeulen A, Lukas J, *et al.* A requirement for cyclin D3-cyclin-dependent kinase (cdk)-4 assembly in the cyclic adenosine monophosphate-dependent proliferation of thyrocytes. *J Cell Biol*. 1998;140:1427-1439
- 11) Erickson LA, Jin L, Goellner JR, *et al.* Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *Mod Pathol*. 2000;13:186-192
- 12) Lukas J, Bartek J. Cell division: the heart of the cycle. *Nature*. 2004;432:564-567
- 13) Troncone G, Guerriero E, Pallante P, *et al.* UbcH10 expression in human lymphomas. *Histopathology*. 2009;54: 731-740.
- 14) Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, Bianco M, Ferraro A, Forzati F, **Iaccarino A**, Russo M, Pierantoni GM, Leone V, Sacchetti S, Troncone G, Santoro M, Fusco A. Loss of the CBX7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer. *Cancer Res*. 2008 Aug 15;68(16):6770-8.
- 15) Gil J, Bernard D, Martinez D, Beach D. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 67–72
- 16) Bernard D, Martinez-Leal JF, Rizzo S, *et al.* CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene* 2005; 24: 5543–51.