

Lezione 10: Carcinomi della Tiroide, Diabete Mellito

Prof. Stefania Catalano – 09/11/2023- Autori: Galluccio, Fazari - Revisionatori: Galluccio, Fazari

CARCINOMI TIROIDEI: ISOTOPO

I tumori della tiroide non sono neoplasie frequenti se paragonati alle altre forme neoplastiche ma, sono le neoplasie più frequenti a origine dal sistema endocrino.

Negli ultimi anni si è registrato un progressivo aumento della prevalenza e dell'incidenza a livello internazionale; ciò, è in parte dovuto alle migliori tecniche diagnostiche che si hanno oggi a disposizione, soprattutto tecniche diagnostiche strumentali che permettono l'identificazione precoce.

Quello che ne è conseguito è, appunto, una maggiore incidenza e prevalenza dei carcinomi della tiroide. Sono, oltretutto, aumentati una serie di fattori di rischio che sicuramente hanno contribuito sull'incidenza e la prevalenza di queste patologie.

I dati variano notevolmente da Paese a Paese, e l'Italia è tra i Paesi con i tassi d'incidenza più elevati (13,5 per 100.000 persone/anno).

Sono tumori che colpiscono soprattutto il sesso femminile, piuttosto che il sesso maschile, secondo un rapporto di 3:1 (ricordiamo che, un po' tutte le patologie tiroidee si manifestano prevalentemente nel sesso femminile); in genere sono tumori che si manifestano in età adulta, oltre i 40 anni, ma dipende dall'istotipo tumorale.

Per quanto riguarda l'istotipo tumorale, è possibile distinguere neoplasie derivanti dalle:

- **Cellule follicolari.**

Da queste derivano due istotipi ben differenziati (la morfologia delle cellule neoplastiche è molto simile alle cellule di origine) e un istotipo indifferenziato.

- **Carcinoma papillifero** (a incidenza maggiore, rappresenta circa il 70-80% di tutti i tumori tiroidei) → tumore ben differenziato.
- **Carcinoma follicolare** (5-15%) → tumore ben differenziato.
- **Carcinoma anaplastico** (1-5%) → tumore indifferenziato.

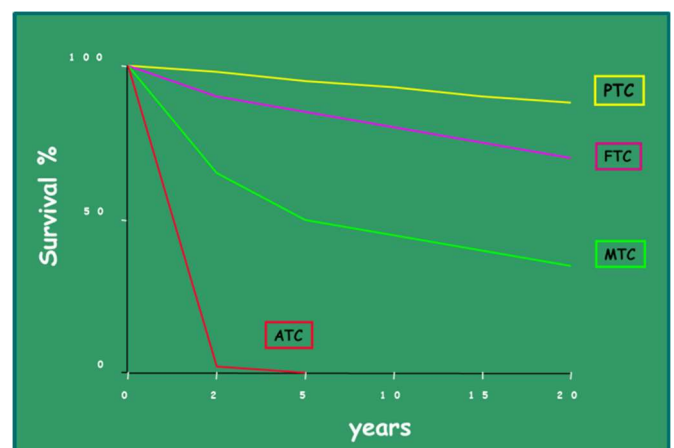
- **Cellule parafollicolari.**

Di dividono in:

- **Carcinoma midollare** (5-10%)
- Altri (1%) come: linfomi, eventuali metastasi.

Dunque, il carcinoma papillifero e il carcinoma follicolare rappresentano le forme più frequenti di tumori tiroidei e, allo stesso tempo, sono le forme a prognosi migliore (*prognosi ottimale*). Sono ossia legati a una sopravvivenza altissima che va da 5 a 10 anni; naturalmente, la sopravvivenza è determinata anche dalla stadiazione del tumore.

In questo grafico è rappresentata la sopravvivenza ai diversi istotipi di carcinomi tiroidei riportata in anni.



- **PTC** (Carcinoma papillifero) → Prognosi ottimale
- **FTC** (Carcinoma follicolare) → Prognosi ottimale
- **MTC** (Carcinoma midollare) → Prognosi intermedia fra quella dei tumori ben differenziati e il carcinoma anaplastico.
- **ATC** (Carcinoma anaplastico) → Prognosi fortemente infausta.

In quanto, al momento della diagnosi in genere sono presenti già metastasi a livello locale e anche a distanza. Tuttavia, la prognosi infausta è compensata dal fatto che questo tipo di tumore è a percentuale piuttosto bassa (5-10% rispetto ai carcinomi papillifero e follicolare) e, inoltre, tende a essere presente soprattutto in una fase più avanzata rispetto all'insorgenza dei carcinomi papillifero e follicolare che insorgono più precocemente (intorno ai 40-50 anni).

La tiroide è costituita dalle cellule follicolare che delimitano il follicolo, accanto ai follicoli all'interno della ghiandola tiroidea si trovano le cellule parafollicolari secernenti calcitonina e, che, intervengono nella regolazione calcio-fosforo. Essendo le cellule parafollicolari localizzate internamente alla ghiandola tiroidea, una neoplasia che ha origine da queste stesse cellule rientra chiaramente nella classe delle neoplasie tiroidee.

Per quanto riguarda i **fattori di rischio** relativi ai carcinomi derivanti dalle cellule follicolari, soprattutto quelli ben differenziati, è noto che concorrono all'aumento del rischio di sviluppo tumorale:

- **Familiarità positiva.**
- **Sesso** → il sesso femminile è quello maggiormente colpito.
- **Radiazioni ionizzanti** → rappresentano il fattore di rischio principale.

Questa consapevolezza deriva da una serie di studi epidemiologici eseguiti negli anni, in cui si è vista un'aumentata incidenza nei soggetti esposti a radiazioni ionizzanti. La bomba atomica di Hiroshima e Nagasaki, ad esempio, ha portato a un incremento notevole dei carcinomi della tiroide, o ancora l'incidente di Chernobyl.

La risposta all'esposizione a radiazioni ionizzanti è strettamente correlata alla dose di radiazioni a cui è sottoposto il soggetto e, in parte, dall'età (l'età giovane è quella maggiormente vulnerabile).

- **Radiazioni esterne** → rappresentano un fattore di rischio, basti pensare a coloro i quali devono essere sottoposti a radioterapia nella regione del collo.
- **Carenza di iodio** → di per sé non rappresenta un fattore di rischio ma, l'apporto di iodio può influenzare gli istotipi.
 - Lì dove c'è un adeguato apporto di iodio prevale l'istotipo a prognosi migliore (*carcinoma papillifero*).
 - Lì dove c'è carenza di iodio prevale il *carcinoma follicolare*, a prognosi positiva ma un po' meno ottimale rispetto al carcinoma papillifero.

CARCINOMA MIDOLLARE

Il carcinoma midollare della tiroide (CMT) si sviluppa dalle cellule parafollicolari (o cellule C) che producono calcitonina; nella maggior parte dei casi (80%) insorge come forma sporadica, mentre insorge come forma ereditaria nel restante 20%, per mutazione dell'**oncogene RET**.

La forma ereditaria può manifestarsi come **forma familiare**, ossia è solo presenta il carcinoma midollare della tiroide ereditario; oppure, può trovarsi nell'ambito delle cosiddette **MEN** (*neoplasie endocrine multiple*), cioè, avviene il riscontro in uno stesso soggetto di più neoplasie che riguardano il sistema endocrino. Si distinguono:

- **MEN IIA:**
 - Il carcinoma midollare della tiroide (CMT) può essere associato al **feocromocitoma** (40%) – tumore della midollare del surrene, si tratta di un adenoma che determina una

maggior secrezione di paratormone – oppure, può essere associato a **iperparatiroidismo** (35%).

- **Mutazione RET.**
- **MEN IIB:**
 - Il carcinoma midollare della tiroide (CMT) può essere associato al **feocromocitoma** (50%), ai **ganglioneuromi** (100%), a **habitus marfanoide**.
 - Nelle forme ereditarie è presente la **mutazione dell'oncogene RET**, alterazione che può essere presente anche nelle forme sporadiche.

Tale mutazione è importante nell'ambito della forma ereditaria; una volta fatta diagnosi di carcinoma midollare bisogna stabilire innanzitutto di quale forma si tratta (ereditario o sporadico), successivamente, se si dovesse trattare di una forma ereditaria, si dovrà procedere con lo screening sui familiari al fine di evidenziare l'eventuale mutazione dell'oncogene RET. In tal caso, viene effettuata a livello preventivo una **tiroidectomia totale** per scongiurare l'insorgenza del carcinoma midollare della tiroide.

Il carcinoma midollare della tiroide, dunque, si presenta nelle seguenti forme:

- Sporadico (80%)
- Ereditario (20-25%) → in questo caso bisogna effettuare lo screening sui familiari.

Inoltre, di fronte a un carcinoma midollare della tiroide bisogna sempre escludere che sia presente nell'ambito di una MEN. Perciò, va effettuato l'iter diagnostico per individuare eventuali altre neoplasie associate al carcinoma midollare della tiroide.

ITER DIAGNOSTICO IN CASO DI SOSPETTO CARCINOMA TIROIDEO

1) **Valutazione clinica del paziente**, questa si basa su:

- **Corretta anamnesi** → viene valutata l'eventuale familiarità positiva per tumori tiroidei e l'eventuale avvenuta esposizione a fattori di rischio (radiazioni ionizzanti, radioterapia).
- **Valutazione di segni e sintomi** → in realtà, il tumore della tiroide decorre in maniera asintomatica nella gran parte dei casi. Si manifesta come un nodulo interno alla ghiandola tiroidea e, poiché la patologia decorre pressoché in modo asintomatico, la diagnosi viene effettuata occasionalmente. Può accadere che il paziente avverta il nodulo e, a quel punto, si procede con l'esame ecografico.

La maggior parte dei noduli della ghiandola tiroidea sono benigni (> 90%); quindi, solo in una piccolissima percentuale dei casi si tratta di noduli maligni (legati a un tumore tiroideo).

Dinanzi a un tumore aggressivo, quale è il carcinoma anaplastico, che cresce in modo progressivo e accelerato, i sintomi possono essere legati alla compressione esercitata dalla massa sulle strutture circostanti; dunque, i sintomi potranno essere: **disfagia** (per compressione dell'esofago con conseguente difficoltà nella deglutizione), **dispnea** (per compressione della trachea), **disfonia** (per interessamento del nervo ricorrente).

Tuttavia, questa sintomatologia è piuttosto rara; infatti, si è già precedentemente detto che i carcinomi ben differenziati sono assolutamente più frequenti dei carcinomi indifferenziati. È chiaro che, questi sintomi, saranno presenti qualora il tumore ben differenziato sarà ormai a uno stadio avanzato oppure in presenza di un tumore indifferenziato.

- **Esame obiettivo** → consiste nella palpazione della ghiandola tiroidea, può essere rilevato la presenza di un nodulo che richiederà poi eventuali accertamenti diagnostici.

Ulteriore elemento importante che deve essere ricercato durante l'esame obiettivo è la presenza di eventuali **linfonodi laterocervicali ingrossati**; in quanto, la diffusione massima del carcinoma papillifero (il più frequente in assoluto) avviene proprio per via linfatica e il primo interessamento è rappresentato proprio dai linfonodi laterocervicali ingrossati.

Naturalmente, il riscontro di linfonodi laterocervicali ingrossati non vuol dire necessariamente che sia presente un tumore tiroideo. Il rigonfiamento dei linfonodi può essere legato a diverse cause,

quali: problemi dentali, infezione delle vie aeree, linfonodo reattivo, ecc. Perciò, i linfonodi laterocervicali **non sono un sintomo caratteristico** dei tumori tiroidei.

Il problema dei tumori tiroidei è quello che nella gran parte dei casi decorrono in modo asintomatico.

2) Diagnostica per immagini:

- **Ecografia** → esame fondamentale che può essere d'aiuto nella diagnosi dei tumori tiroidei.

Si tratta di un esame innocuo che non comporta alcun danno al paziente; dall'esame ecografico è possibile estrapolare una serie di informazioni relative alla ghiandola e all'eventuale nodulo, quali:

- ~ Morfologia generale della ghiandola.
- ~ È possibile comprendere se si tratta di un **nodulo solido o cistico**.
- ~ **Contorni** del nodulo, che potranno essere **regolari o sfrangiati**.
- ~ **Vascolarizzazione** del nodulo, che potrà essere **perivascolare o intravascolare**.
- ~ Eventuale presenza di **calcificazioni**.

La presenza di calcificazioni può far pensare a un nodulo datato ma, bisogna tener conto che, i carcinomi papilliferi ad esempio sono caratterizzati da calcificazioni intranodulari.

È possibile quindi notare alcuni segnali che possono fornire una prima idea rispetto alla possibile benignità del nodulo. Tuttavia, il semplice esame ecografico non può essere utile nel porre diagnosi in quanto si hanno solo informazioni relative alla presenza o meno del nodulo, e sulle caratteristiche di quel nodulo.

3) Diagnostica strumentale invasiva:

- **Agoaspirato** → unico esame strumentale che permette, con una buona sensibilità e specificità, di porre diagnosi di tumore tiroideo; perciò, è solo l'esame citologico del nodulo a permettere di evidenziare la morfologia del nodulo e quindi a individuare il rischio di tumore tiroideo.

L'agoaspirato è effettuato su tutti i noduli della tiroide? La maggior parte delle volte si ha il riscontro di noduli benigni; tuttavia, per correttezza diagnostica, l'agoaspirato dovrebbe essere effettuato su tutti i noduli di dimensione **superiore a 1 cm**, proprio per la caratteristica dei tumori tiroidei di decorrere in modo asintomatico e anche perché l'esame ecografico non fornisce informazioni certe.

I noduli di dimensione inferiore a 1 cm vengono monitorati nel tempo; mentre, sui noduli di dimensione superiore a 1 cm è richiesto almeno una volta l'agoaspirato.

In caso di agoaspirato completamente negativo, si procede con il monitoraggio dei noduli tramite esame ecografico annuale. Si può ripetere l'agoaspirato se il nodulo ha la tendenza a crescere eccessivamente.

4) Diagnostica di laboratorio → si basa innanzitutto su TSH, FT4 e FT3 e quindi sulla funzionalità della ghiandola tiroidea.

È utile in quanto, ad esempio, in presenza di un nodulo in un soggetto con ipertiroidismo allora si può pensare a un Adenoma di Plummer o a un Gozzo multinodulare tossico.

AGOASPIRATO TIROIDEO – FNAB

Per conoscere la natura del nodulo, l'esame fondamentale è rappresentato dall'agoaspirato tiroideo.

La scintigrafia è utile per comprendere se il nodulo è caldo o freddo; in genere il nodulo neoplastico dovrebbe essere più freddo che caldo in quanto non ha la capacità di captare lo iodio, tuttavia, si è visto che questo non vale per tutti i noduli neoplastici.

L'agoaspirato è un esame complessivamente poco invasivo, viene eseguito in ambiente ambulatoriale e non necessita di ricovero. È necessario preparare il paziente, procedimento che prevede:

- **Anamnesi farmacologica/emocoagulativa.**

- **Consenso informato** (avvisare di non parlare/tossire/deglutire).
- **Disinfezione della parte.**
- **Inserimento dell'ago** in corrispondenza del nodulo che si intende esaminare, in assenza di anestesia locale (unico effetto collaterale, seppur raro, è la comparsa di un ematoma nella zona). Viene prelevata la quantità di materiale necessaria all'anatomo patologo per eseguire l'analisi.

Un tempo l'agoaspirato veniva effettuato senza l'uso dell'ecografia usufruendo esclusivamente della palpazione, ad oggi l'agoaspirato è **eco-guidato**.

Una volta prelevato il materiale:

- Se il **nodulo** è **solido**, il **materiale** prelevato sarà **solido/misto**:
 - Il materiale viene posto sul vetrino e strisciato sullo stesso.
 - Il vetrino viene inviato al laboratorio di anatomia patologica dove verrà esaminato dal punto di vista citologico.
- Se il **nodulo** è **cistico**, il **materiale** prelevato sarà **liquido**:
 - Il materiale viene inserito in una provetta.
 - La provetta viene centrifugata; la porzione che sedimenta viene prelevata e strisciata su un vetrino.
 - Il vetrino viene inviato al laboratorio di anatomia patologica dove verrà esaminato dal punto di vista citologico.

In definitiva, l'agoaspirato è una metodica facile, non costosa, associata a poche complicanze; naturalmente, è necessario un buon anatomo patologo.

L'agoaspirato gode poi di:

Sensibilità 83%	Specificità 92 %
Falsi positivi 2.9%	Falsi negativi 5.2%



Da qualche anno ormai, esiste una Classificazione Italiana di Citologia tiroidea che ha messo a disposizione delle sigle legate all'esito dell'esame diagnostico con le relative informazioni. Al referto si osserva quindi la descrizione fornita dall'anatomo patologo, seguita dal relativo codice.

Tabella 1. Classificazione Italiana della Citologia Tiroidea

Codice	Categoria diagnostica	Rischio atteso di malignità (%)	Suggerimento clinico
TIR1	Non diagnostico	Non definito	Ripetizione di FNA US dopo almeno un mese
TIR1 C	Non diagnostico, cistico	Basso, variabile in base al quadro clinico	Secondo il contesto clinico e/o ripetere FNA
TIR2	Non maligno / benigno	< 3	Follow – up
TIR3 A	Lesione indeterminata a basso rischio	< 10	Follow – up / ripetere FNA
TIR3 B	Lesione indeterminata ad alto rischio	15 – 30	Exeresi chirurgica
TIR4	Sospetto di malignità	60 – 80	Exeresi chirurgica / eventuale istologia intraoperatoria
TIR5	Maligno	95	Exeresi chirurgica; approfondimento diagnostico in casi selezionati

Legenda: FNA: fine-needle aspiration; US: ultrasound examination

MARCATORI

Possono essere utili alcuni marcatori: **calcitonina e tireoglobulina**.

● **Calcitonina**

Ormone polipeptidico prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide. La calcitonina rappresenta il *marcatore* del *carcinoma midollare* della tiroide e, rappresenta uno dei pochissimi marcatori tumorali che possono essere usati anche in fase diagnostica.

Dunque, è utile nella diagnosi e nel monitoraggio di recidiva, anche precoce, di carcinoma midollare della tiroide. Il dosaggio della calcitonina potrà essere:

- Dosaggio sierico: basale (< 1 ng/ml) o dopo stimolo con pentagastrina.
- Dosaggio su wash-out agoaspirato.

Quando la calcitonina risulta elevata, di fronte a un nodulo della ghiandola tiroidea, è assolutamente indicato l'intervento chirurgico in quanto esiste una forte correlazione tra incremento di calcitonina e presenza di carcinoma midollare della tiroide.

Il dosaggio di calcitonina in quei pazienti che sono stati sottoposti a tiroidectomia totale per carcinoma midollare della tiroide, è utile nell'evidenziare precocemente recidive e/o metastasi. Il dosaggio della calcitonina si utilizza, insieme all'esame genetico sull'oncogene RET, anche per lo screening familiare per carcinoma midollare della tiroide lì dove si sospetta che il carcinoma midollare sia ereditario.

● **Tireoglobulina**

Glicoproteina ad alto peso molecolare sintetizzata dall'epitelio follicolare della tiroide e immagazzinata nel lume follicolare dove partecipa alla formazione degli ormoni tiroidei. Questo tipo di marcatore tumorale viene utilizzato solo nei pazienti tiroidectomizzati per tumore ben differenziato della tiroide (carcinoma papillifero o carcinoma follicolare).

Il dosaggio della tireoglobulina può essere:

- Dosaggio sierico: basale o dopo stimolo con rhTSH (TSH ricombinante).
- Dosaggio su wash-out agoaspirato.

Se viene riscontrata tireoglobulina elevata in un paziente tiroidectomizzato, siccome la tireoglobulina è presente solo a livello tiroideo, allora si è in una situazione di recidiva e/o metastasi. Per tali motivi il dosaggio della tireoglobulina è molto sfruttato nel follow-up dei pazienti tiroidectomizzati nei primi 5 anni.

La presenza di anticorpi anti-tireoglobulina può creare interferenze nel dosaggio; quindi, è consigliabile in contemporanea anche il loro dosaggio.

Valore normale	Valore in soggetto tiroidectomizzato
< 40 ng/ml	< 1 ng/ml

Il dosaggio della tireoglobulina avviene per mezzo dei classici saggi antigene-anticorpo.

Diversamente dalla calcitonina, la tireoglobulina è impiegata esclusivamente nel monitoraggio; non può essere utilizzata nella diagnostica in quanto si osservano suoi incrementi in tutta una serie di condizioni benigne, quali: *ipertiroidismo*, *gozzo multinodulare*, *tiroiditi acute e croniche*, nonché in alcuni stati fisiologici come *gravidanza* o il *periodo neonatale*.

In presenza di noduli tiroidei si può avere, ad esempio, una tireoglobulina aumentata per aumentata dimensione della stessa ghiandola tiroidea.

Oltre quanto detto finora relativamente alla diagnosi, ad oggi è effettuata anche una diagnosi di biologia molecolare mediante l'utilizzo di tecniche avanzate.

Per quanto riguarda i carcinomi tiroidei, sono stati individuati numerosi fattori genetici e tanti altri ne vengono scoperti continuamente; si tratta di numerose alterazioni molecolari presenti a livello dei tumori tiroidei. Queste stesse alterazioni ad oggi solo piuttosto utili nella fase terapeutica, in quanto sono utilizzate come target ma, si punta a un loro impiego nella fase diagnostica.

SVILUPPO DEI CARCINOMI

Si compone di tre fasi:

- 1) **Iniziazione**: dovuta a fattori genetici e ambientali.
- 2) **Promozione**
- 3) **Progressione**

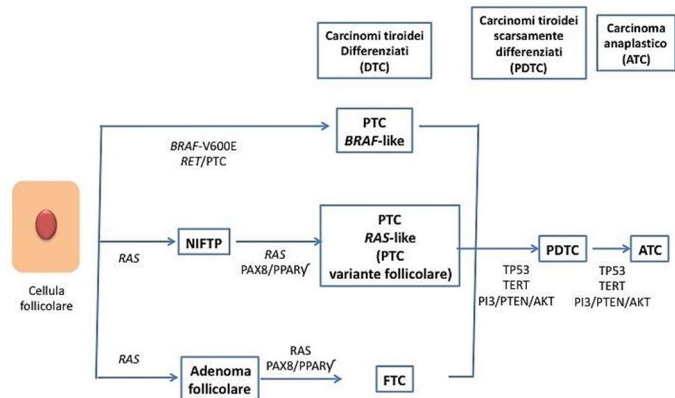
- Per quanto riguarda la terapia dei tumori tiroidei, per i tumori ben differenziati (papillifero e follicolare), si procede con la tiroidectomia totale ed eventualmente si effettua la terapia radio metabolica con Iodio 131, in base alla stadiazione del tumore.
A seguito dell'intervento, il paziente andrà in ipotiroidismo, per questo motivo sarà necessaria la somministrazione di L-Tiroxina; si effettuerà inoltre la terapia soppressiva (NON sostitutiva) perché il TSH deve essere mantenuto a valori ridotti, in quanto può rappresentare uno stimolo di crescita. Infine, si effettuerà il follow-up.
Dunque, i tumori ben differenziati rispondono bene alla terapia radio metabolica. Alcuni tumori, però, sono resistenti alla terapia radio metabolica, per questo motivo si ricorre ad una target-therapy.
- Nel **carcinoma midollare** si effettua la tiroidectomia e, poi, si valuta se è ereditario o sporadico.
- Nel **carcinoma anaplastico** si ha una prognosi infausta, in quanto è molto aggressivo.
I trattamenti sono quelli classici, chirurgico e chemioterapico.

ALTERAZIONI MOLECOLARI NEI CARCINOMI TIROIDEI

Sono state identificate numerose alterazioni molecolari nei carcinomi tiroidei che derivano dalla cellula follicolare.

Come detto in precedenza, i carcinomi ben differenziati sono il PTC (carcinoma papillifero) e il carcinoma follicolare, mentre i carcinomi indifferenziati diventano anaplastici (ATC).

Le alterazioni molecolari sono soggette a continue nuove scoperte, ma quelle più frequenti, che si conoscono ormai da anni, sono:



- 1) Nella variante dei carcinomi tiroidei differenziati (DTC), in particolare nel **carcinoma papillifero**:

- **BRAF**: la più frequente nei carcinomi papilliferi (PTC) è la **BRAF-V600E**. Questa mutazione comporta un'attivazione di tutti i signaling a valle, coinvolti nella proliferazione, nell'angiogenesi, nella motilità e, che determina quindi un fattore fondamentale nella patogenesi delle neoplasie tiroidee.
- **RET/PTC**: sono dei riarrangiamenti dei geni chimera-ibridi, formati dall'oncogene RET e dalla porzione amminoterminale di un altro oncogene, che porta anche in questo caso ad un'attivazione costitutiva. Questi riarrangiamenti sono stati riscontrati soprattutto in carcinomi papilliferi sottoposti a forti radiazioni ionizzanti (es. incidente di Chernobyl, bomba atomica di Hiroshima e Nagasaki).
- **RAS**: mutazioni dell'oncogene RAS.

- **PAX8/PPAR γ** : gene chimerico dato dall'unione del gene PAX8 e PPAR γ , che porta ad avere un effetto dominante negativo su PPAR γ (normalmente è un oncosoppressore) che lo porta a favore i processi di oncogenesi.

2) Nel **carcinoma follicolare**, si trovano invece mutazioni:

- **RAS**
- **PAX8/PPAR γ**

3) Nelle forme scarsamente differenziate, fino ad arrivare al **carcinoma anaplastico**, si trovano mutazioni relative a oncogeni o oncosoppressori, quali:

- **TERT**
- **TP53**
- **PI3/P TEN/AKT**

ALTERAZIONI MOLECOLARI NEI CARCINOMI TIROIDEI

RET gene è un oncogene, che codifica per un recettore tirosin-chinasico transmembrana localizzato sul cromosoma 10q11.2.

Come tutti i recettori di membrana possiede attività tirosin-chinasica, ed è costituito da:

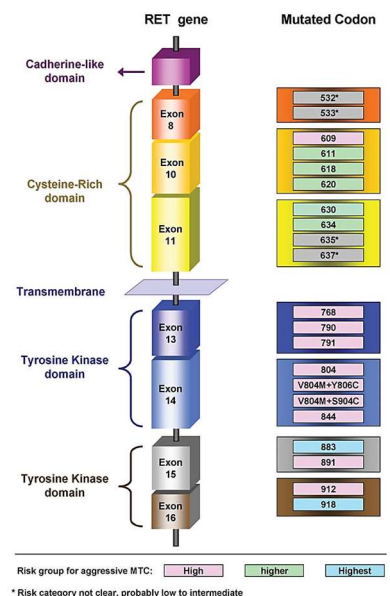
1. *Porzione extracellulare* che lega il ligando.
2. *Porzione transmembrana* che attraversa il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare.
3. *Porzione intracitoplasmatica* dotata di attività tirosin-chinasica.

In condizioni normali, quando il recettore viene attivato dal ligando, si ha l'attivazione della porzione tirosin-chinasica che attiva a valle una serie di segnali coinvolti nella proliferazione, motilità ecc.

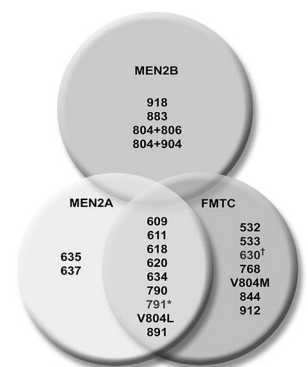
Nel carcinoma midollare della tiroide, sono state riscontrate diverse mutazioni puntiformi dell'oncogene RET; le mutazioni più frequenti riguardano:

- La mutazione **634**, presente nella forma familiare, ma anche nella **MEN2A**.
- La mutazione **918**, presente nella **MEN2B**.

Le mutazioni di RET possono essere presenti anche nel **carcinoma midollare sporadico**, che in questo caso riguardano l'exon 10, 11, 13, 14, 15,16; possono essere anche presenti nel **carcinoma ereditario**, sia nella forma familiare che nella MEN2A e nella MEN2B.



Caratteristiche	Sporadico	Familiare	MENIIA	MENIIB
	(80%)	(20%)		
Esone RET mut.(10q11.2)	10, 11, 13, 14, 15, 16	10, 11, 13, 14, 15	10, 11	16
Feocromocitoma	0%	0%	10-60%	50%
Iperparatiroidismo	0%	0%	10-25%	0%
Ganglioneuroma	0%	0%	0%	100%
Dismorfia	0%	0%	0%	100%



LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE NELLE NEOPLASIE TIROIDEE: POTENZIALITÀ

Grazie alle tecniche di diagnostica molecolare che vengono utilizzate al giorno d'oggi (PCR, Real Time, FISH, NGS) si riescono a identificare le mutazioni presenti nella cellula neoplastica.

La diagnostica molecolare nelle neoplasie tiroidee potrebbe avere diverse utilità, tra le quali:

- **Diagnosi preoperatoria**
 - FNAB
- **Identificazione di metastasi**
 - Marcatori tiroidei in linfonodi o in localizzazioni secondarie (metastasi periferiche)
- **Diagnosi familiare sul DNA genomico**
 - Carcinoma midollare
- **Valutazioni prognostiche e possibilità terapeutiche**
 - La mutazione dell'oncogene può essere sfruttata per utilizzare farmaci che bloccano il signaling che attiva il gene mutato. Utilizzato nei tumori che non rispondono alla terapia radio metabolica.

1) Diagnosi preoperatoria

Adeguatezza di un agoaspirato: con l'agoaspirato si hanno delle informazioni sulla benignità o malignità del nodulo.

Può essere utile andare a ricercare sull'esame dell'agoaspirato un eventuale mutazione di BRAF, RET/PTC o RAS?

Potrebbe essere utile perché la diagnostica molecolare è legata ad un'**elevata sensibilità, maggiore specificità e diagnosi precoce.**

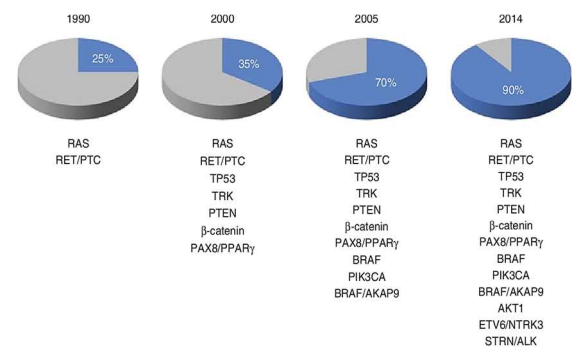
La diagnostica molecolare permette di evidenziare eventuali alterazioni anche partendo da una piccolissima quantità di materiale, che potrebbe sfuggire ad esempio ad un semplice esame morfologico; in questo caso, si può identificare la presenza di una particolare lesione in una fase di iniziazione, prima di giungere alla fase di neoplasia vera e propria.

Per effettuare la diagnostica molecolare su un agoaspirato è necessario che esso sia:

- Rappresentativo della lesione
- Adeguato per quantità di materiale (colloide e/o cellule)
- Tecnicamente ben allestito.

Questa metodica **NON** viene ancora effettuata, ma potrebbe rappresentare una potenzialità futura.

Nell'arco degli anni sono state identificate nuove mutazioni e tuttora vi è una continua scoperta di ulteriori alterazioni molecolari.



METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATE

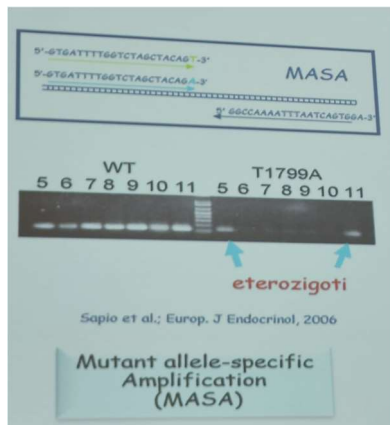
- Mutant allele-specific Amplification (MASA): è una PCR particolare che permette di identificare una specifica mutazione.
- PCR Sanger sequencing.
- PCR Real Time Melting curve analysis.
- Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).

Queste tecniche permettono:

- Diagnosi di malignità
- Prognosi di neoplasie maligne
- Individuazione della terapia farmacologica migliore

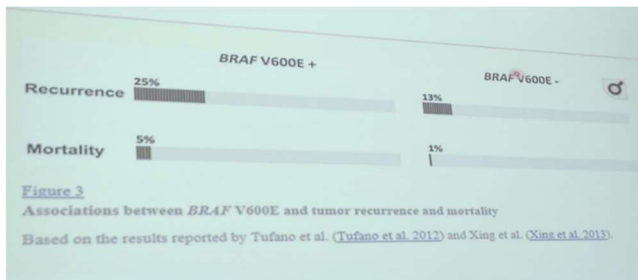
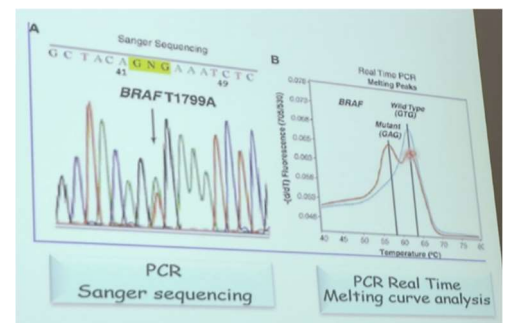
Diagnosi della predisposizione ereditaria alla patologia

ANALISI DI BRAF^{V600E}



Questo è un esempio di MASA, in cui vi è una mutazione specifica, in cui vengono utilizzati primer specifici.

Questi invece sono esempi di PCR Sanger e PCR Real Time.

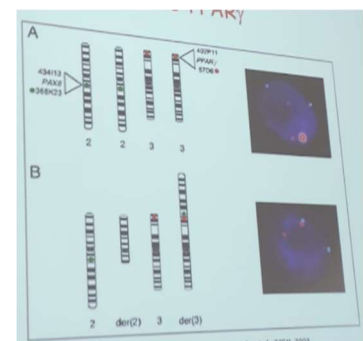
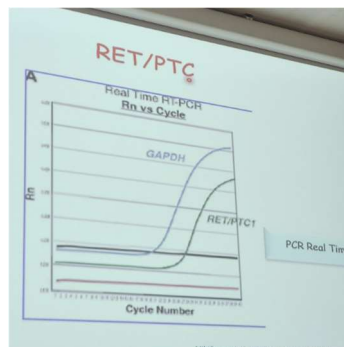


La presenza della mutazione di BRAF è importante in quanto è legata ad una maggiore mortalità e ad una maggiore ricorrenza.

Questo è un esempio di PCR Real Time per individuare un riarrangiamento RET/PTC.

Questo riarrangiamento può essere individuato anche con la FISH, in maniera più specifica.

La FISH può essere utilizzata anche per identificare il gene chimera PAX8/PPAR γ .



2) Identificazione di metastasi

La diagnostica molecolare potrebbe avere delle potenzialità maggiori nel caso dell'identificazione di metastasi.

Sarebbe possibile effettuare la biopsia su un linfonodale, in questo modo sarebbe molto più semplice effettuare una diagnostica molecolare per trovare l'eventuale presenza di mutazioni e di conseguenza fare una diagnosi più precoce rispetto a quella tradizionale.

Questo metodo NON è ancora utilizzato.

3) Diagnosi familiare sul DNA genomico

Questa metodica viene effettuata da diversi anni e riguarda il **Carcinoma midollare**.

Il carcinoma midollare può essere sporadico o ereditario e, dopo aver effettuato l'esame istologico, è necessario andare a ricercare le eventuali mutazioni di RET per capire se la mutazione è sporadica o familiare.

Fasi:

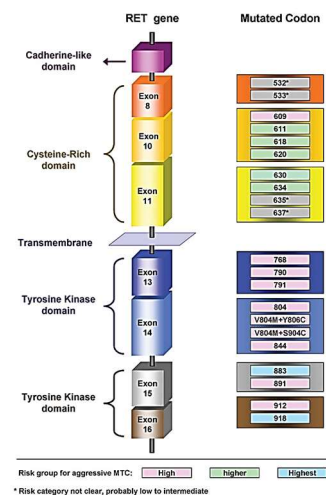
- Si estrae il DNA dal tessuto tumorale e si ricercano le mutazioni dell'oncogene RET (che codifica per il recettore transmembrana).
- Se la mutazione di RET è presente sul tessuto tumorale, si deve constatare se la mutazione è germinale o no.
- A questo punto si estrae un campione di sangue periferico dal soggetto e si ricerca quella mutazione già riscontrata sul tessuto tumorale.
- Se la mutazione è presente a livello periferico, significa che il tumore è **familiare**. Quindi il tumore è ereditario ed è necessario effettuare il **Test Genetico familiare**.
Solitamente, se il soggetto ha dei figli, il test viene effettuato su di essi e nel caso di positività viene richiesta la tiroidectomia totale prima che insorga il carcinoma midollare.

La prognosi del carcinoma midollare non è totalmente infausta, ma si sceglie sempre di ricorrere alla tiroidectomia totale e al supporto con la terapia farmacologica sostitutiva per tutta la vita.

Il test RET deve includere gli **esoni 10 e 11** (da effettuarsi per primi, per maggiore frequenza di mutazione dei codoni in questi esoni) e, se questi dovessero essere negativi, allora si ricercano mutazioni gli **esoni 8, 13, 14, 15 e 16**.

Per i pazienti con fenotipo **MEN-2B**, deve essere ricercata la mutazione del codone **M918T** (esone 16) e, se negativa, la mutazione del codone **A883F** (esone 15).

Se viene rilevata una mutazione germinale nel paziente, l'analisi genetica deve essere proposta ai familiari di primo grado, al fine di individuare i portatori della mutazione stessa, possibilmente prima dell'età raccomandata per la tiroidectomia profilattica.



Quindi:

→ Se il tumore è ereditario si ricercano le mutazioni prima sugli esoni 10 e 11, successivamente sugli esoni 8, 13, 14, 15 e 16.

Se viene rilevata su questi esoni la mutazione germinale, sia nel tumore sia su sangue periferico, l'analisi genetica si estende ai familiari per effettuare la tiroidectomia profilattica.

→ Se la mutazione di RET è presente solo a livello del tessuto tumorale e non è presente sul DNA del sangue periferico, vuol dire che la mutazione è dovuta ad una **forma sporadica** e non è necessario estendere l'analisi genetica ai familiari.

4) Valutazioni prognostiche e possibilità terapeutiche

Indica la possibilità di individuare eventuali alterazioni molecolari come possibili target terapeutici.

In realtà, i tumori tiroidei più frequenti rispondono bene alle terapie standard, ma esistono anche delle forme che diventano resistenti alla terapia radiometabolica, per cui è necessario ricorrere a terapie alternative.

	ThyroSeq	Afirma GSC	ThyGenX	ThyraMIR
Molecular test	NGS	mRNA microarray analysis	Multiple PCR + mutations (somatic and rearrangements)	mRNA analysis
NPV	High	High	High (when used with ThyraMIR)	Scant data
PPV	High	Low	High (when used with ThyraMIR)	Scant data
Sensitivity/specificity	High/High	High/High	High/High	High/High
Types of cytological material	Fresh cytological samples and/or special collection	Fresh cytological samples and/or special collection	Fresh cytological samples and/or special collection	Fresh cytological samples and/or special collection
Main relevance in their use	Rule-in test	Rule-out test	Rule-in test	Rule-in and rule-out test
Data analysis	Centralized labs and/or local labs	Centralized labs	Local labs	Local labs
Role in the cytologic categories	Useful in the indeterminate categories, including oncocytic lesions	Useful in the indeterminate categories, including oncocytic lesions	Useful in the indeterminate categories, including oncocytic lesions	Useful in the indeterminate categories, including oncocytic lesions

NGS, next-generation sequencing; GEC, gene expression classifier; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction. High values were defined when > 70%.

La tabella soprastante riporta i differenti Molecular Test che vengono utilizzati nella clinica per identificare eventuali mutazioni che possono essere presenti sui tumori tiroidei.

Ad esempio, ThyroSeq si basa sull'NGS, Afirma GSC si basa sull'mRNA microarray analysis, ThyGenX che si basa sulle multiple PCR per evidenziare eventuali mutazioni, o ancora ThyraMIR che si basa sull'mRNA analysis.

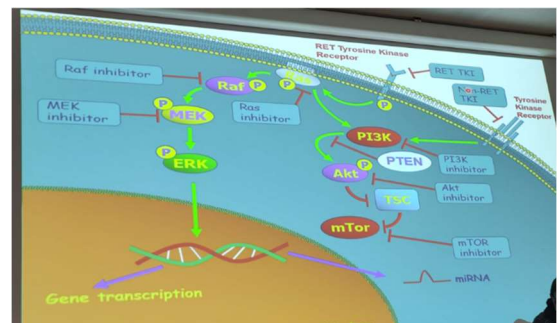
Questi sono molecular test già "preconfezionati", disponibili per diversi tipi di tumore, che permettono di identificare l'alterazione molecolare presente e l'eventuale target terapeutico.

TARGET TERAPEUTICO

I farmaci utilizzati possono essere di diverso tipo e agiscono su diversi livelli.

Ad esempio, si può bloccare direttamente l'inibitore del RET-TKI, o ancora possono essere utilizzati i Ras inhibitor, Raf inhibitor e Mek inhibitor.

Questi sono una serie di farmaci che vanno a bloccare i signaling attivati dalla presenza delle mutazioni; questi farmaci sono già a disposizione e vengono utilizzati per i tumori che non rispondono più alle terapie tradizionali.



DIAGNOSTICA TIROIDEA

- Per valutare la **funzione ghiandolare**:

- Dosaggio del TSH (ultrasensibile)
- Dosaggio frazioni libere T3 e T4

Questi due parametri danno informazioni riguardo la funzionalità della tiroide e permettono di fare diagnosi di tiroide iperfunzionante o ipofunzionante.

- Per identificare la **causa** di una **disfunzione tiroidea**:

- Scintigrafia (tecnezio o iodio radioattivi)
- Ecografia
- Esame citologico su agoaspirato con ago sottile

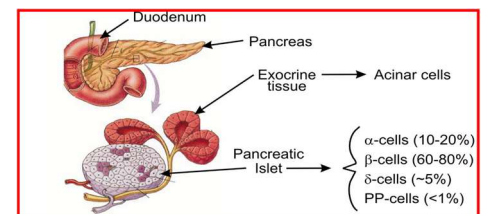
- Ricerca di anticorpi antitiroidei: antiperoxidasi per le tiroiditi autoimmuni, anti-recettori del TSH (servono per le patologie autoimmunitarie più frequenti, ossia l'ipotiroidismo che è il Morbo di Basedow e l'ipertiroidismo che è la tiroidite di Hashimoto).
- Dosaggio Iodio urinario (serve per studi epidemiologici), calcitonina, tireoglobulina
- Diagnostica molecolare.

PARAMETRI CLINICO-LABORATORISTICI NEL DIABETE MELLITO

Il laboratorio di analisi ha un ruolo fondamentale non solo nella diagnosi, ma anche per il monitoraggio, il follow-up e la prevenzione della patologia.

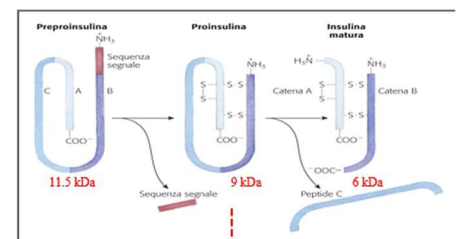
Diabete Mellito: disordine metabolico eterogeneo e complesso, che riguarda non solo il metabolismo dei carboidrati, ma anche dei lipidi e delle proteine. Ha un'eziologia multipla, ed è caratterizzato da una iperglicemia cronica conseguente ad una alterazione della secrezione o dell'azione dell'insulina.

Il pancreas presenta una porzione esocrina e una endocrina; la porzione endocrina del pancreas presenta diversi tipi di cellule (α , β , γ , δ), in particolare, le cellule beta (60-80%) secernono l'insulina.



L'insulina è un ormone proteico, formato da 2 catene polipeptidiche A (21 aa) e B (30 aa), codificate da un singolo gene presente sul braccio corto del cromosoma 11.

Questo gene, in particolare, codifica prima per un pre-ormone, la **preproinsulina**, successivamente si ha il distacco della sequenza segnale nella porzione amminoterminale con formazione della **proinsulina**.



Apparato di Golgi per assemblaggio dei granuli secretori

La proinsulina migra a livello dell'apparato del Golgi dove subisce il taglio proteolitico di un peptide di congiunzione di 33 aa, il **peptide C** (peptide di connessione), ad opera di una endopeptidasi.

L'insulina viene rilasciata dai poliribosomi come proteina globulare a catena polipeptidica unica e, successivamente, si deposita sotto forma di granuli.

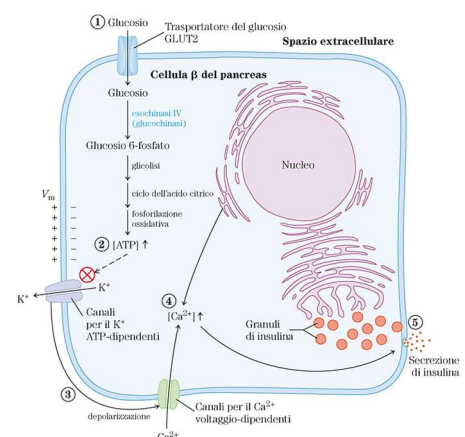
Tali granuli contengono in quantità equipolari insulina e peptide C; ciò è importante poi nel dosaggio in quanto, dosare il peptide C è come dosare la quantità di insulina. Dunque, peptide C e insulina vengono secreti in quantità uguali.

REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE DI INSULINA

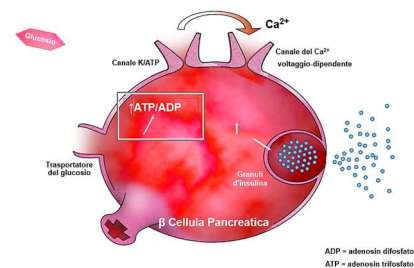
Il principale regolatore della secrezione di insulina è il **Glucosio** e i segnali che derivano dalla metabolizzazione di questo zucchero.

Fasi:

1. **Ingresso di glucosio** nelle cellule pancreatiche.
2. Questo determina un **aumento intracellulare dell'ATP**.
3. L'aumento intracellulare dell'ATP causa una depolarizzazione della membrana plasmatica, dovuta alla **chiusura dei canali per il K^+ ATP-dipendenti**.



4. La depolarizzazione causa a sua volta l'**apertura dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti**.
5. L'incremento di calcio determina infine l'**esocitosi dei granuli di insulina**.



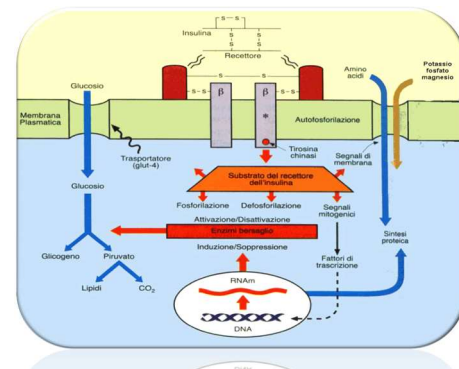
MECCANISMO D'AZIONE DELL'INSULINA

L'insulina, come tutti gli ormoni, agisce legandosi al suo specifico recettore.

Il recettore dell'insulina è un classico recettore di membrana ad attività tirosin-chinasica, costituito da due catene α e due catene β unite da ponti disolfuro.

La catena α ha un *dominio* completamente *extracellulare*, che serve per il legame con il ligando, cioè l'insulina; si ha poi la *porzione transmembrana*, che attraversa la membrana plasmatica ed infine la porzione intracitoplasmatica dotata di attività tirosin-chinasica.

Il legame dell'insulina col suo recettore comporta un'auto-fosforilazione del recettore dell'insulina, che porta all'attivazione di una serie di segnali a valle, che permettono all'insulina di svolgere le proprie funzioni.



PRINCIPALI EFFETTI DELL'INSULINA

L'effetto principale dell'insulina è quello di favorire la metabolizzazione del glucosio. Coordina il trasportatore del glucosio a livello dei tessuti periferici, il Glut-4, e tramite esso permette l'ingresso del glucosio nelle cellule e la metabolizzazione dello zucchero.

L'insulina ha inoltre un ruolo fondamentale nella sintesi proteica e, rappresenta anche un importante segnale di crescita e inoltre si comporta come un fattore di trascrizione.

L'insulina esplica le sue funzioni su tre tessuti principali: fegato, muscolo e tessuto adiposo.

- **A livello epatico:**
 - Stimola sintesi di glicogeno e dei trigliceridi
 - Inibisce glicogenolisi, gluconeogenesi e chetogenesi
- **A livello muscolare:**
 - Aumenta trasporto ed utilizzazione del glucosio per la sintesi di glicogeno
 - Aumenta captazione amminoacidi e sintesi proteica
- **A livello adiposo:**
 - Immagazzinamento dei grassi
 - Aumenta trasporto ed utilizzazione del glucosio
 - Inibisce la lipolisi

DEGRADAZIONE DELL'INSULINA

L'emivita biologica dell'ormone è compresa tra 6-10 min.

L'inattivazione dell'insulina ha luogo nei lisosomi prevalentemente a livello epatico e renale (80%, 24h).

PRINCIPALI EVENTI SELEZIONATI RELATIVI ALLA FISIOPATOLOGIA DEL DIABETE (ORDINE CRONOLOGICO):

Date																									
1869	Description of Langerhans "isulae" (islets)																								
1889	Pancreasectomised dogs develop diabetes																								
1910	Hypothesis of insulin as substance produced by pancreatic islets present in non-diabetic and lacking in diabetic subjects																								
1921	Extraction of insulin from dogs' pancreata and its purification. Injection of insulin in pancreasectomised dogs results in a reduction of blood glucose																								
1936	Description of "insulin-sensitive" and "insulin-insensitive" diabetes																								
1951	Assay developed to measure insulin. Hyperinsulinaemia in "maturity-onset" diabetes																								
1951	Renal glucose threshold higher in diabetes																								
1959	RIA to measure blood insulin and distinction in "insulin-dependent" and "non insulin-dependent" diabetes mellitus (IDDM, NIDDM)																								
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Type 1 Diabetes Mellitus</p> <tr> <td>1965</td> <td>Description of islet inflammation (insulinitis) in "juvenile" diabetes</td> </tr> <tr> <td>1974</td> <td>Human leukocyte antigen (HLA) gene region associated with IDDM</td> </tr> <tr> <td>1974</td> <td>Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus</td> </tr> <tr> <td>1979</td> <td>IDDM and NIDDM redefined as Type I and Type II Diabetes</td> </tr> <tr> <td>1984</td> <td>Insulin target of autoimmunity</td> </tr> <tr> <td>1986</td> <td>Description of natural history of T1DM</td> </tr> <tr> <td>1990</td> <td>Glutamate decarboxylase (GAD) target of autoimmunity</td> </tr> <tr> <td>1997</td> <td>The terms Type I and Type II replaced by Type 1 and Type 2</td> </tr> </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Type 2 Diabetes Mellitus</p> <tr> <td>1970</td> <td>"Standardized" technique to assess insulin "impedance"</td> </tr> <tr> <td>1990</td> <td>Natural history of T2DM: comparative role of insulin secretion/resistance</td> </tr> <tr> <td>2000s</td> <td>Obesity, visceral fat and insulin resistance</td> </tr> <tr> <td>2000s</td> <td>Beta-cell dysfunction and incretins</td> </tr> </div> </div>		1965	Description of islet inflammation (insulinitis) in "juvenile" diabetes	1974	Human leukocyte antigen (HLA) gene region associated with IDDM	1974	Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus	1979	IDDM and NIDDM redefined as Type I and Type II Diabetes	1984	Insulin target of autoimmunity	1986	Description of natural history of T1DM	1990	Glutamate decarboxylase (GAD) target of autoimmunity	1997	The terms Type I and Type II replaced by Type 1 and Type 2	1970	"Standardized" technique to assess insulin "impedance"	1990	Natural history of T2DM: comparative role of insulin secretion/resistance	2000s	Obesity, visceral fat and insulin resistance	2000s	Beta-cell dysfunction and incretins
1965	Description of islet inflammation (insulinitis) in "juvenile" diabetes																								
1974	Human leukocyte antigen (HLA) gene region associated with IDDM																								
1974	Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus																								
1979	IDDM and NIDDM redefined as Type I and Type II Diabetes																								
1984	Insulin target of autoimmunity																								
1986	Description of natural history of T1DM																								
1990	Glutamate decarboxylase (GAD) target of autoimmunity																								
1997	The terms Type I and Type II replaced by Type 1 and Type 2																								
1970	"Standardized" technique to assess insulin "impedance"																								
1990	Natural history of T2DM: comparative role of insulin secretion/resistance																								
2000s	Obesity, visceral fat and insulin resistance																								
2000s	Beta-cell dysfunction and incretins																								
T1DM, type 1 diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus.																									

- In particolare, la prima identificazione dell'azione dell'insulina la si deve ai due ricercatori canadesi *Banting e Best*, nel 1921. Essi effettuarono una pancreasectomia in un cane, somministrarono successivamente insulina e, notando la riduzione del glucosio nel sangue, compresero il ruolo di quest'ormone.
- Successivamente, nel 1936, si scoprirono le due forme di diabete, parlando per la prima volta di insulino-dipendente e insulino-indipendente.
- Nel 1959-60, grazie alle nuove metodiche diagnostiche come il **RIA** (permetteva di misurare l'insulina nel sangue), ci fu una distinzione ufficiale di queste due forme di diabete (IDDM= diabete mellito insulino dipendente e NIDDM= diabete mellito non insulino dipendente).
- Nel 1979 fu effettuata una prima classificazione del diabete mellito, che prevedeva:
 - 1) **Diabete mellito insulino-dipendente (IDDM)** o di tipo I o giovanile.
 - 2) **Diabete mellito non insulino-dipendente (NIDDM)** o di tipo II o diabete dell'età adulta.
 - 3) **Diabete mellito della malnutrizione.**
 - 4) **Altri** tipi di diabete.
 - 5) **Diabete mellito gestazionale.**

CLASSIFICAZIONE DEL DIABETE MELLITO ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION) 1997, REVISION 2004

L'ultima revisione, del 2004, prevede l'esistenza delle seguenti forme di DM:

- **Diabete mellito tipo 1** (ex IDDM distruzione B-insulare con deficit insulinico assoluto):
 - Immuno-mediato
 - Idiopatico
- **Diabete mellito tipo 2** (ex NIDDM insulino resistenza con deficit insulinico relativo)
- **Altri specifici tipi di diabete:**
 - Difetti genetici delle beta-cellule
 - Difetti genetici dell'azione insulinica
 - Patologie del pancreas esocrino
 - Endocrinopatie
 - Da farmaci o da sostanze chimiche
- **Diabete mellito gestazionale**