



Rimini, 5-8 novembre 2015



# Immunocitochimica e biologia molecolare tiroidea nella pratica clinica

## **IMMUNOCITOCHIMICA**

Anna CRESCENZI  
Policlinico Universitario Campus Bio-Medico



Rimini, 5-8 novembre 2015

# Conflitti di interesse



ITALIAN CHAPTER



Ai sensi dell'art. 3.3 sul conflitto di interessi, pag 17 del Regolamento Applicativo Stato-Regioni del 5/11/2009, dichiaro che negli ultimi 2 anni non ho avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario.



Rimini, 5-8 novembre 2015

# Utilizzo della immunocitochimica



- Per **caratterizzazione** di patologia (calcitonina, tireoglobulina, TTF1, etc)
- Come **marcatore prognostico** di malignità (Gal3, HBME1, CK19, etc)
- Come **marcatore predittivo** (VE1, SP174)



# CARCINOMA MIDOLLARE

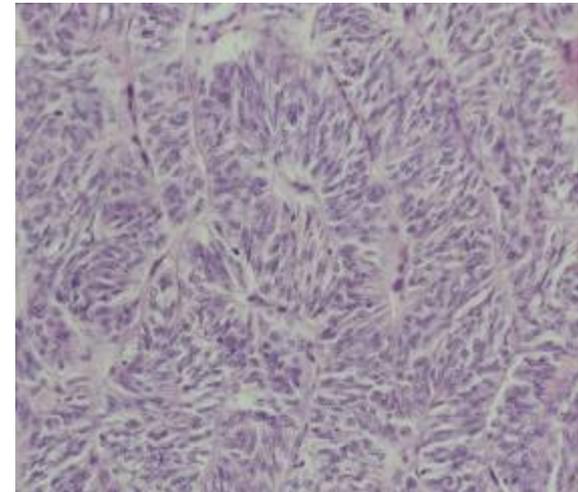


ITALIAN CHAPTER



Rimini, 5-8 novembre 2015

- Cellule singole epitelioidi o fusate
- Nuclei ovali eccentrici
- Citoplasma granuloso
- Positività citoplasmatica alla reazione immunocitochimica per **calcitonina**





# Citologia Indeterminata

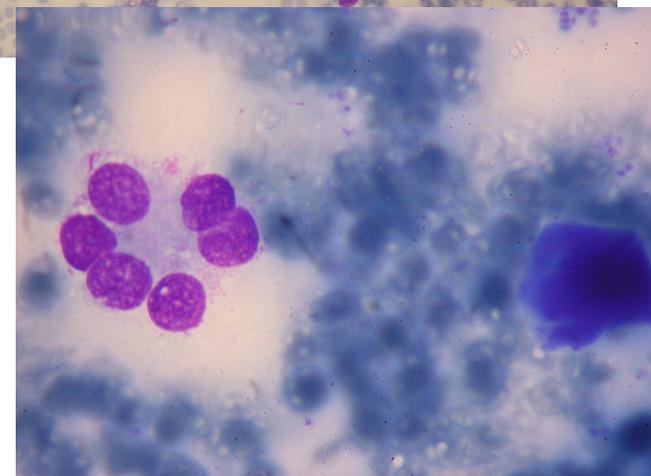
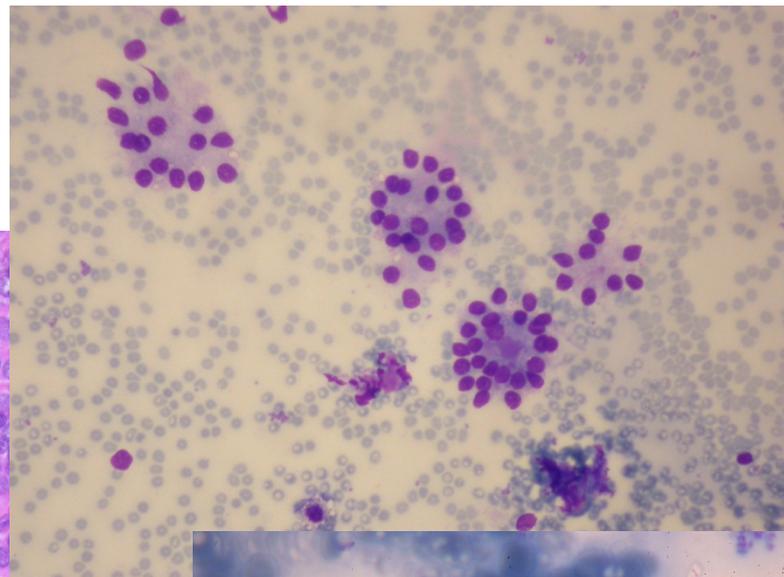
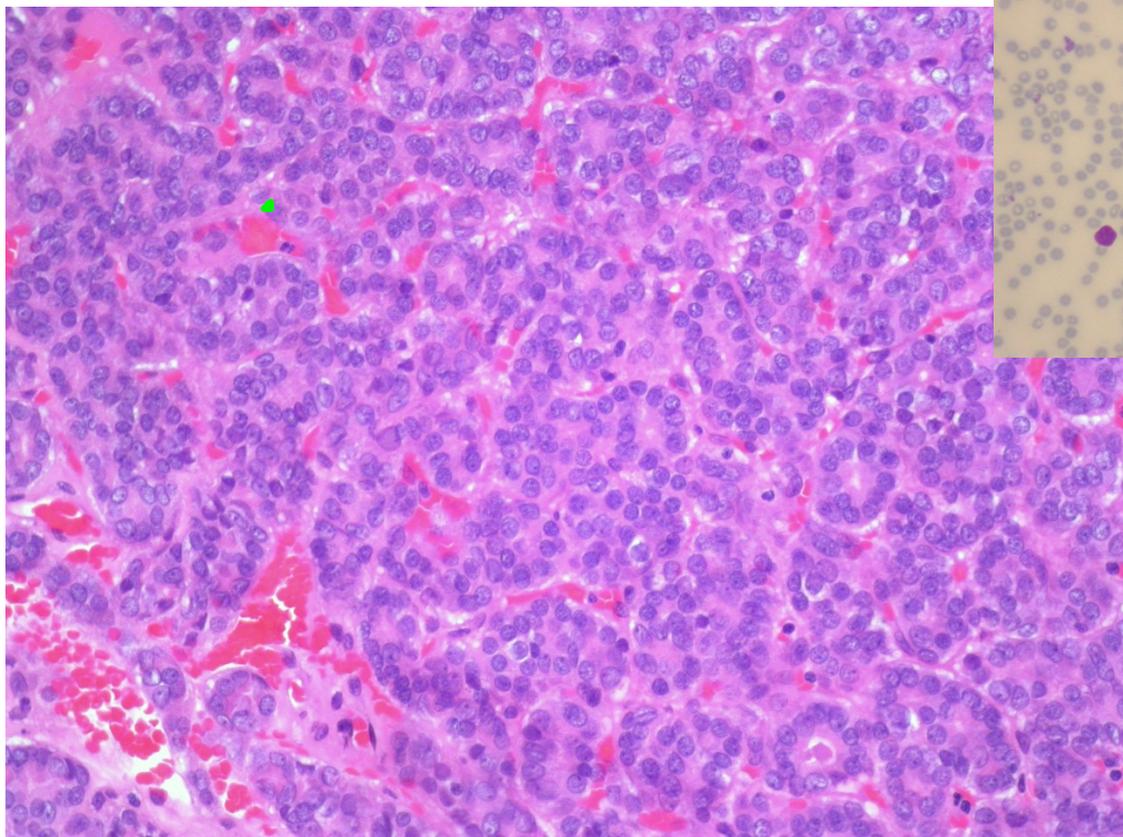


ITALIAN CHAPTER



Rimini, 5-8 novembre 2015

**Atipia architetturale**  
**Atipia citologica**





## Panels of immunohistochemical markers that best support the diagnosis of malignancy

- **PTC and FVPTC:** Gal-3, HBME-1, CK19
- **FTC:** Gal-3, HBME1
- **Progression to poorly differentiated:** CyclinD1, p53, Ki67



# Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer.

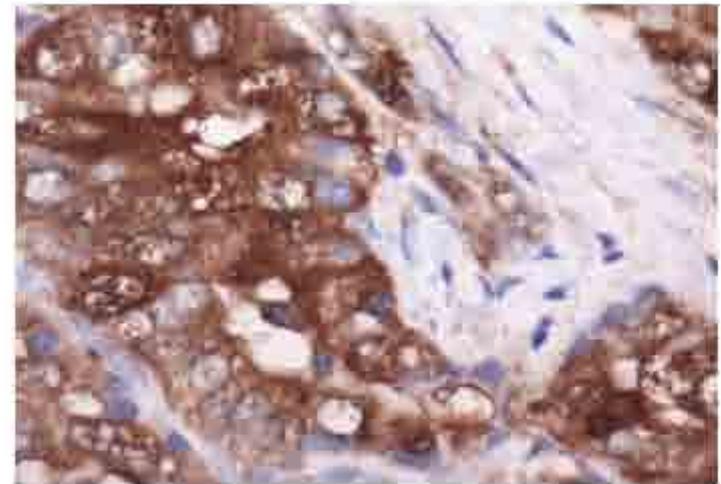


**Chiu CG, Strugnelli SS, Griffith OL, Jones SJ, Gown AM, Walker B, Nabi IR, Wiseman SM.  
Am J Pathol. 2010 May;176(5):2067-81.**

- Sensitivity 74% - 83% - 100%
- Specificity 75% - 81% - 100%
- Accuracy 78%

There is accumulating evidence in the current literature that suggest clinical utility of Gal-3 as a thyroid cancer diagnostic markers.

The variability in reported study results highlights the need for the development of standardized protocols and criteria for evaluation of Gal-3 expression.



**Figure 2.** Sample tissue immunohistochemistry exhibiting increased Galectin-3 expression in thyroid papillary carcinoma.

# Reliability of methodology



CHAPTER

**Table 1.** Description of methodology for Immunohistochemical Studies of Lectin-3 Expression in Cytologic Specimens

Study	Year	Specimen type/FNAB needle	Cytologic diagnosis	Antibody	Source	Antigen retrieval	Biotin handling	Criterion pattern of staining	Cut-off for positivity (negative versus positive)*
Orlandi <sup>45</sup>	1998	Cell block/22G	Various	Rat monoclonal, M3/38	Boehringer	n.s.	Direct strep-ABC detection	Cytoplasmic	Intensity, distribution
Gasbarr <sup>46</sup>	1999	n.s./n.s.	n.s.	Rat monoclonal, M3/38	Boehringer	Microwave heating	Indirect ABC complex	n.s.	<50% vs. ≥50%
Irohara <sup>47</sup>	1999	n.s./n.s.	Various	Rat monoclonal, M3/38 (†)	ATCC	n.s.	Direct ABC detection	n.s.	n.s.
Bartolozzi <sup>48</sup>	2001	Cell block, smear/n.s.	n.s.	Monoclonal	Novocastra	Microwave heating	Indirect ABC complex	n.s.	<10% vs. 11% to 49%, >90%
Saggiolato <sup>49</sup>	2001	Cell block/22G	Follicular	Clone 9C4	Novocastra	Microwave heating	Direct strep-ABC detection	Cytoplasmic	Intensity, distribution
Arstein <sup>50</sup>	2002	Smear/n.s.	Various	Clone 9C4	Medac diagnostika	n.s.	n.s.	n.s.	Neg, weak vs. mod, strong
Papoti <sup>51</sup>	2002	Cell block/22G	Various	Clone 9C4	Novocastra	Microwave heating	Direct strep-ABC detection	Cytoplasmic	Nuclear vs. cytoplasm ± nuclear
Maruta <sup>52</sup>	2004	n.s./n.s. (‡)	Follicular	Monoclonal	Medac diagnostika	n.s.	Block (Bio Genex)	Membranous	<50% vs >50%
Saggiolato <sup>53</sup>	2004	Cell block/22G	Follicular	Mouse monoclonal, Clone 9C4	Novocastra	Microwave heating	Biotin-free detection (EnVision System)	Cytoplasmic or cytoplasmic and nuclear	Intensity, distribution
Collet <sup>54</sup>	2005	Smear/26G, 27G	Indeterminate	Mouse monoclonal, NCL-GAL3	Novocastra	n.s.	Block (30% AB serum), n.s.	Cytoplasmic and/or membranous	<20% vs. 20% to 50%, >50%
Mills <sup>55</sup>	2005	Cell block/21G, 23 G	Various	Clone 9C4	Novocastra	Heat	n.s.	Cytoplasmic or membranous or nuclear	n.s.
Saggiolato <sup>56</sup>	2005	Cell block/22G	Follicular	Clone 9C4	Novocastra	Microwave heating	Biotin-free detection (EnVision System)	Cytoplasmic	<10% vs. >10%
Anon <sup>57</sup>	2006	Smear/23 G	n.s.	Monoclonal	Novocastra	Microwave heating	Direct strep-ABC detection	Cytoplasmic and nuclear	Neg vs. weak, mod, strong
Cerpi <sup>58</sup>	2006	Cell block/18G, 20 G	Follicular	Rat monoclonal	Mabtech	Microwave heating	Biotin-free detection	n.s.	Distribution
Kim <sup>59</sup>	2006	Cell block/n.s.	Follicular	Monoclonal	Novocastra	n.s.	n.s.	n.s.	Intensity, distribution
Torres-Cabala <sup>60</sup>	2006	Cell block/n.s.	n.s.	Mouse monoclonal	Novocastra	Microwave heating	Blocking solution (Dako)	n.s.	0% vs. <10%, 11% to 60%, >50%
Sapin <sup>61</sup>	2007	Cell block/n.s.	Indeterminant or suspicious (††)	Rat monoclonal	Mabtech	Pressure cooking	Biotin-free detection (Vector)	n.s.	<10% vs. ≥10%
Hocht <sup>62</sup>	2008	n.s./n.s.	Follicular	n.s.	n.s.	n.s.	Direct ABC detection	Cytoplasmic	Neg versus weak, mod, strong
Erosz <sup>63</sup>	2008	n.s./n.s.	n.s.	Clone 9C4	Neomarkers	Microwave heating	Indirect ABC complex	Cytoplasmic	n.s.
Bartolozzi <sup>64</sup>	2008	Cell block/n.s.	Follicular†	Rat monoclonal	Mabtech	Microwave heating	Biotin-free detection (EnVision System)	Cytoplasmic	<5% vs. ≥5%
Franco <sup>65</sup>	2009	Cell block/n.s.	Indeterminant or suspicious	n.s.	Novocastra	n.s.	Direct strep-ABC detection	Membranous and cytoplasmic	<10% vs. ≥10%

\*By percent of cell stained or degree of staining; †follicular lesions or suspected follicular tumors; ††western blot; ‡aspiration from excised tissue; G indicates needle gauge; n.s., not specified; neg, negative; mod, moderate.



Rimini, 5-8 novembre 2015

## Il panel triplo positivo dell'immunoistochimica ha la migliore resa



ITALIAN CHAPTER



- Combined positivity of CK-19, Gal-3 and HBME-1:
- sensitivity 85%,
- specificity 97%
  
- Altre combinazioni sono di non univoca valenza.

# L'accuratezza dipende da diversi fattori



Rimini, 5-8 novembre 2015

- Fase pre-analitica correttamente eseguita
- Accessibilità degli antigeni
- Cellularità rappresentativa
- Metodo di analisi corretto e standardizzato
- Valutazione secondo parametri definiti
- Controlli periodici di qualità



Rimini, 5-8 novembre 2015

# Materiale per l'immunocitochimica



- Striscio convenzionale
- Strato sottile
- Citoincluso o cell-block
- FNA con schiume sterili

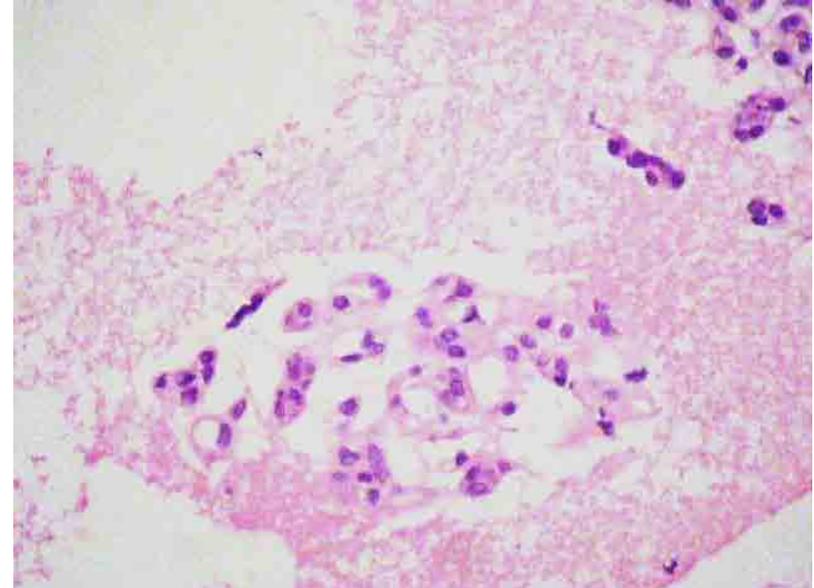
**Immunohistochemical stains require the availability of a cell block to perform the staining.** 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules



# Cell Block o Citoincluso

Rimini, 5-8 novembre 2015

- E' un metodo per ottenere inclusioni in paraffina da prelievi citologici.
- Il materiale viene sospeso in una soluzione di fissativo invece di essere strisciato su vetrino.
- La sospensione viene centrifugata ed in sedimento incluso in una goccia di gel che solidifica e trasforma in preparato in una biopsia.
- Fornisce sezioni in paraffina su cui effettuare colorazioni istochimiche ed immunoistochimiche.





# Cell Block o Citoincluso



Rimini, 5-8 novembre 2015

- **A favore:**

La fissazione e pertanto la morfologia sono sovrapponibili a quella dei preparati istologici (es. chiarificazione dei nuclei).

Il taglio delle sezioni comporta il taglio delle cellule ed espone gli antigeni citoplasmatici per le reazioni immunoistochimiche.

I protocolli di immuno sono quelli standardizzati per l'istologia.

- **Contro:**

Richiede tempi di lavorazione più lunghi della citologia su striscio, impegna il personale tecnico manualmente.

Si perdono i dettagli relativi al materiale di fondo.

I vari passaggi di lavorazione causano perdita di materiale cellulare.



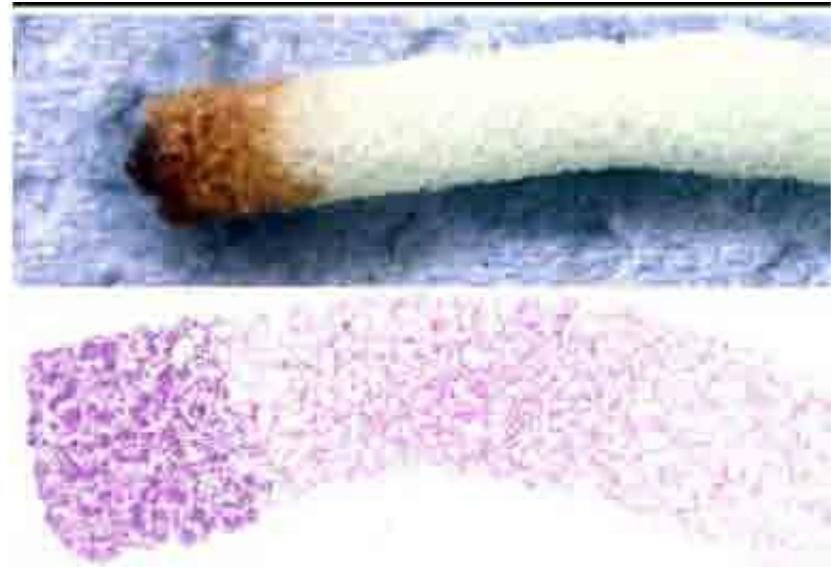
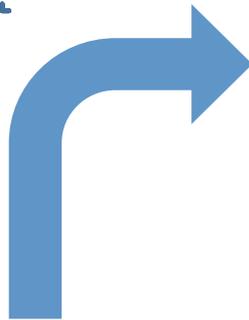
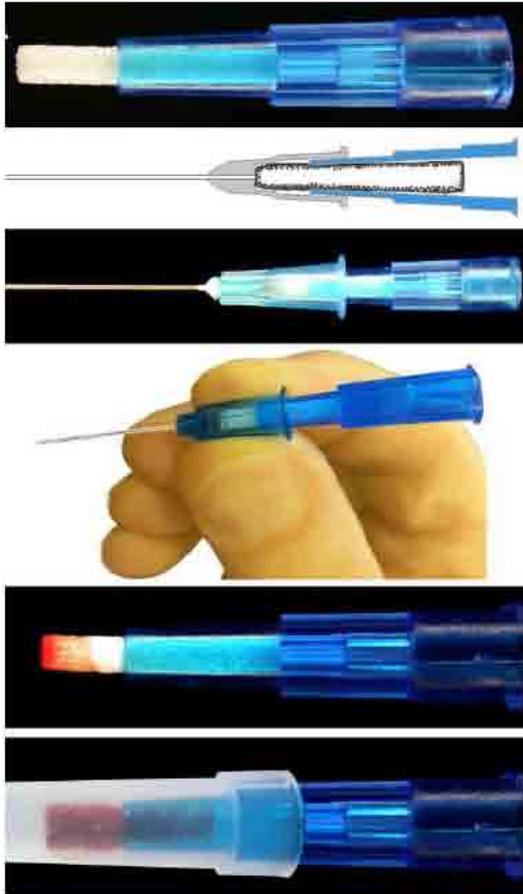
# Aghi a schiuma (Cytofoam)



ITALIAN CHAPTER



Rimini, 5-8 novembre 2015



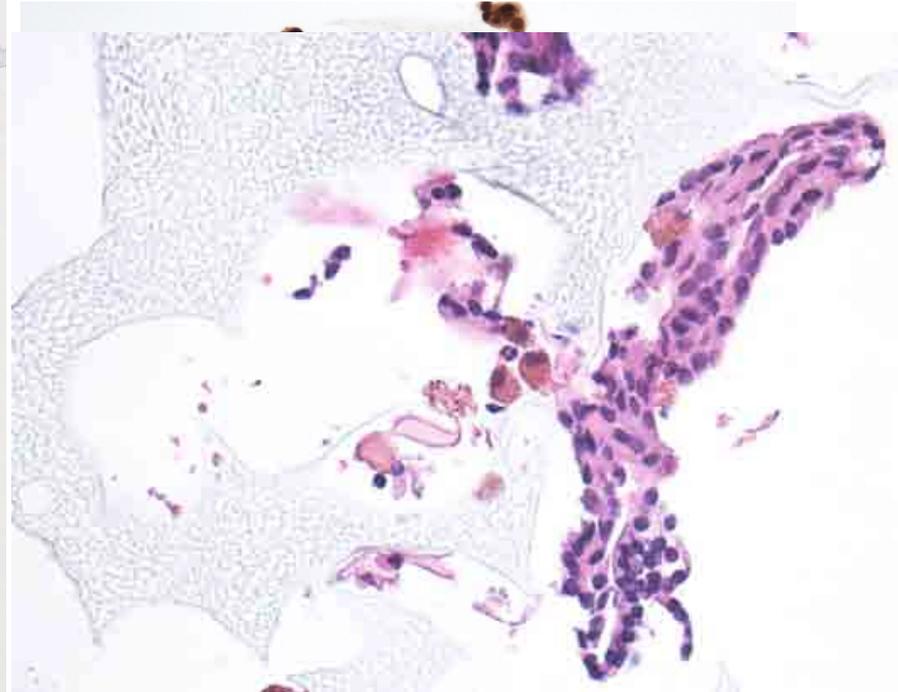
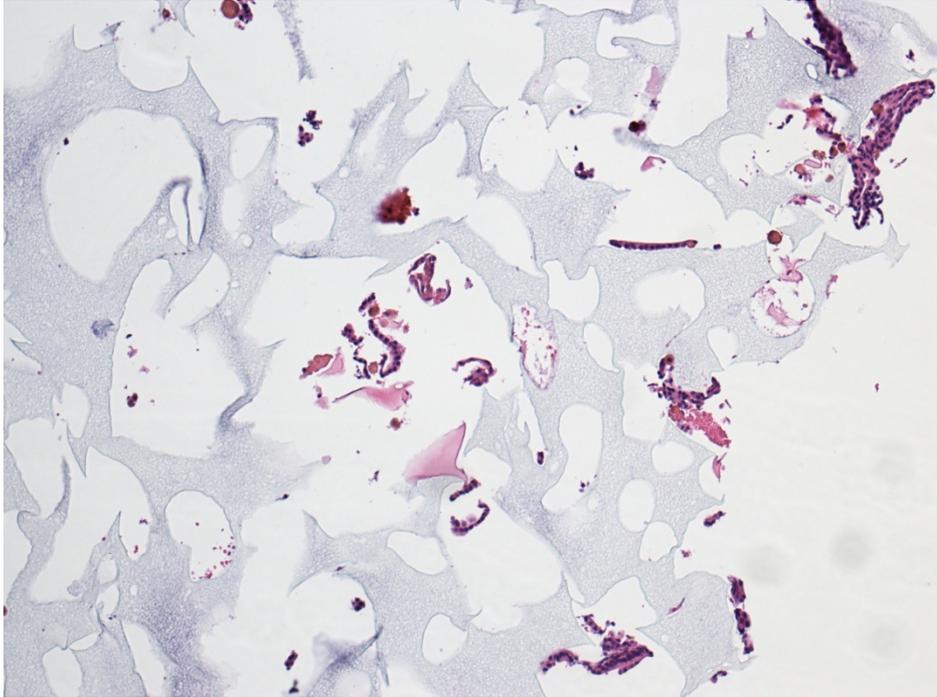


# Aghi a schiuma



ITALIAN CHAPTER

Rimini, 5-8 novembre 2015



- Schiuma secca di polivinil-alcol fissata in formalina ed inclusa in paraffina



# Pitfalls Immunocitochimica



ITALIAN CHAPTER



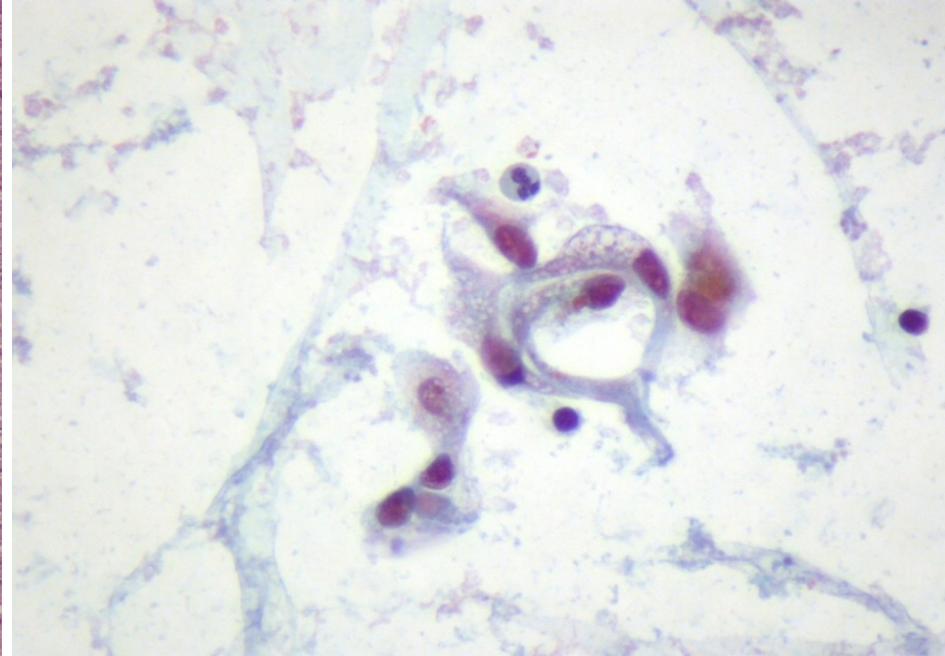
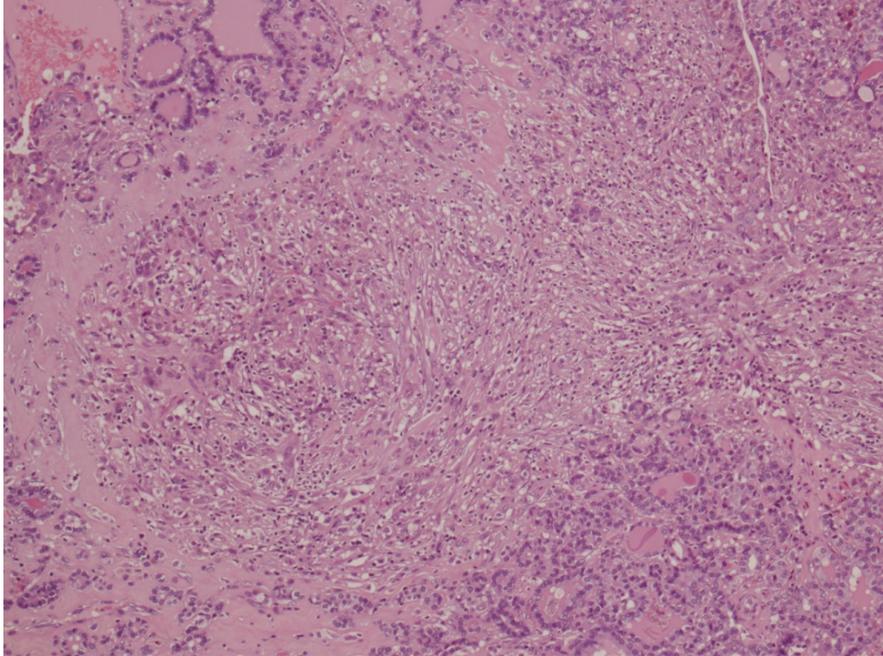
Rimini, 5-8 novembre 2015

- La positività per i marcatori del pannello non è selettiva per il carcinoma tiroideo
- Gal3 è presente fisiologicamente in istiociti e macrofagi
- CK19 è positiva in vari epiteli e si positivizza nei tireociti sotto stimoli di stress cellulare (tiroiditi, fibrosi)
- HBME1 è positiva in vari epiteli benigni e neoplastici
- La positività dei marcatori immunocitochimici nel carcinoma tiroideo non è omogenea



# Gal3 e istiociti

Rimini, 5-8 novembre 2015



Nelle ripetizioni di FNA gruppi di istiociti possono assumere aspetto epitelioide e essere misinterpretati come atipie tireocitarie.  
In tale cellule la Gal3 risulta positiva e contribuisce all'errore interpretativo.



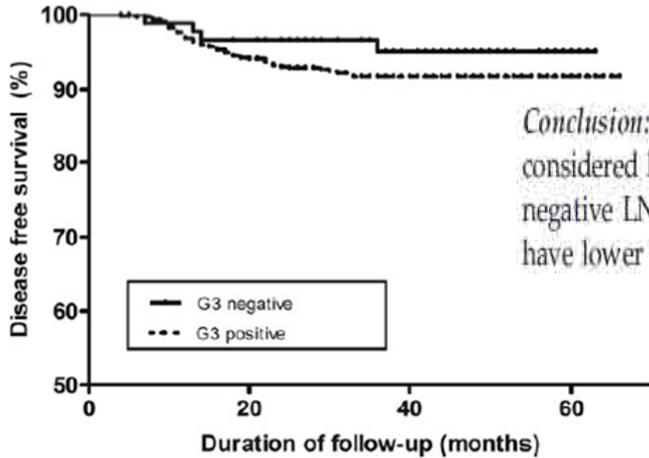
# La negatività per Gal3 non esclude il carcinoma



THYROID  
Volume 22, Number 12, 2012  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/thy.2011.0166

## Absence of Galectin-3 Immunostaining in Fine-Needle Aspiration Cytology Specimens from Papillary Thyroid Carcinoma Is Associated with Favorable Pathological Indices

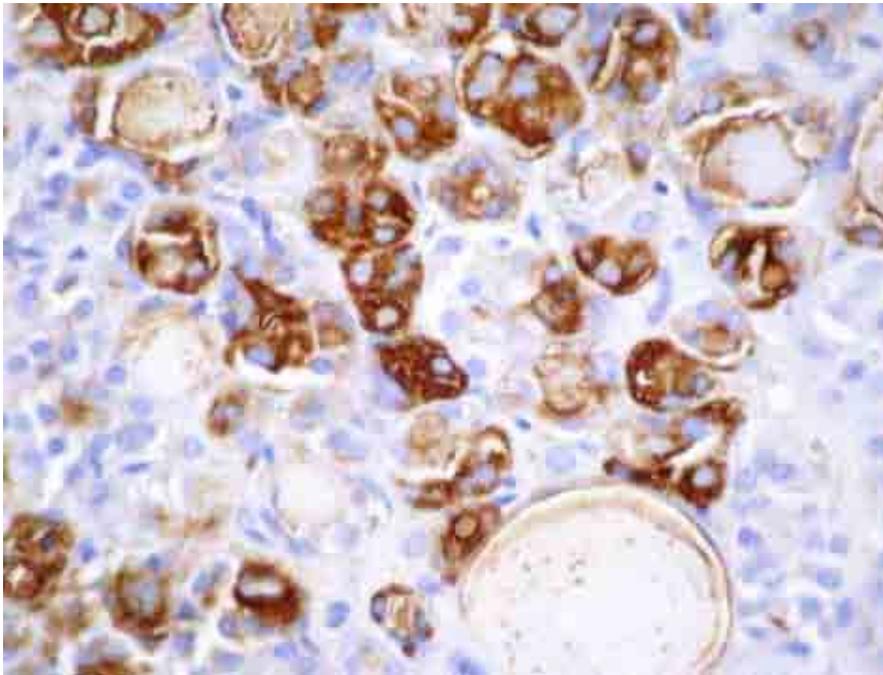
Eun Sook Kim,<sup>1,2</sup> Dong Jun Lim,<sup>1,2</sup> Kyungji Lee,<sup>3</sup> Chan Kwon Jung,<sup>3</sup> Ja Seong Bae,<sup>4</sup> So Lyung Jung,<sup>5</sup> Ki Hyun Baek,<sup>1,2</sup> Jong Min Lee,<sup>1,2</sup> Sung Dae Moon,<sup>1,2</sup> Moo Il Kang,<sup>1,2</sup> Bong Yun Cha,<sup>1,2</sup> Kwang Woo Lee,<sup>1,2</sup> and Ho Young Son<sup>1,2</sup>



*Conclusion:* The absence of G3 expression in FNA samples from PTC is associated with pathological parameters considered less aggressive than is the case for PTCs with G3 expression, including being a negative predictor of negative LN involvement. Long-term follow-up studies, however, are needed to verify whether G3N patients have lower recurrence and mortality rates.



# GAL3 eterogenea



Pattern disomogeneo di positività nell'ambito della lesione.

E' indispensabile che il campione citologico contenga un adeguato numero di cellule.

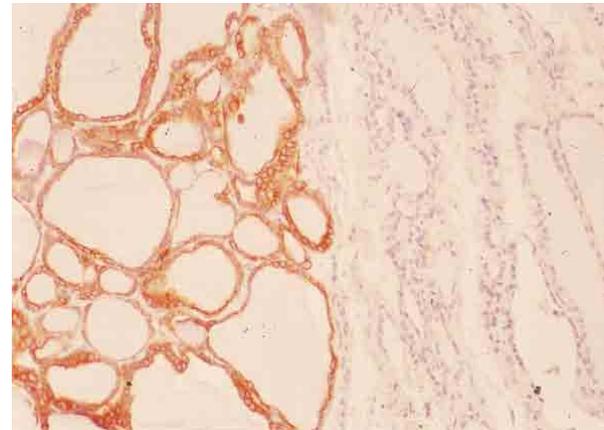


**Nuove entità modificheranno la prevalenza di carcinoma nelle categorie diagnostiche e queste entità sono spesso positive per il panel immunoistochimico**



If **NFVPTC** were no longer termed carcinoma, this would not only impact the rate of malignancy for AUS and SFN, but also the rate for the SUS and even the malignant category.

ND	- 10%
BN	- 59%
AUS/FLUS	- 45%
FN	-18%
SP	- 48%
POS	- 5%



Kyle C. Strickland, Brooke E. Howitt, Ellen Marqusee, Erik K. Alexander, Edmund S. Cibas, Jeffrey F. Krane, and Justine A. Barletta. The Impact of Noninvasive Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma on Rates of Malignancy for Fine-Needle Aspiration Diagnostic Categories. *Thyroid*. September 2015, 25(9): 987-992



## L'immunocitochimica per proteine mutate individua accuratamente i casi con le due mutazioni per le quali si dispone dell'Ab

- VE1 for **BRAF V600E**  
Sensitivity of 82% specificity of 93.8-100% in patients with thyroid cancer.
- The anti-NRAS Q61R antibody (SP174) accurately identifies the **NRAS Q61R** mutation in patients with metastatic melanoma. 100% sensitivity 92% specificity.



# Poter evidenziare BRAF e NRAS con immunocitochimica rappresenta un utile supporto alla diagnosi.

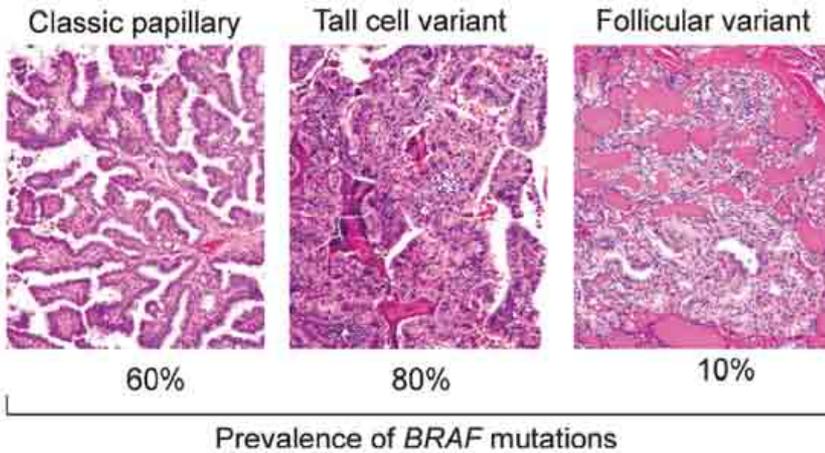
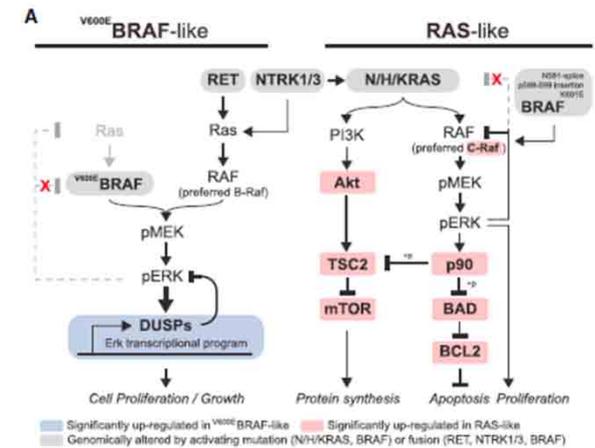


Figure 2. Prevalence of BRAF mutations in different histologic variants of thyroid papillary carcinoma, based on the data reported in the literature and summarized by Xing<sup>18</sup> (hematoxylin-eosin, original magnification  $\times 100$ ).



### Box 11.1: Characteristics of Papillary Carcinoma Harboring BRAF Mutation

- Classic papillary and tall cell presentation
- Extrathyroidal extension
- Lymph node and/or distant metastases
- Advanced tumor stage at presentation
- Tendency for dedifferentiation
- Resistance to radioactive iodine therapy

### Box 11.3: Characteristics of Papillary Carcinoma with RAS Mutation

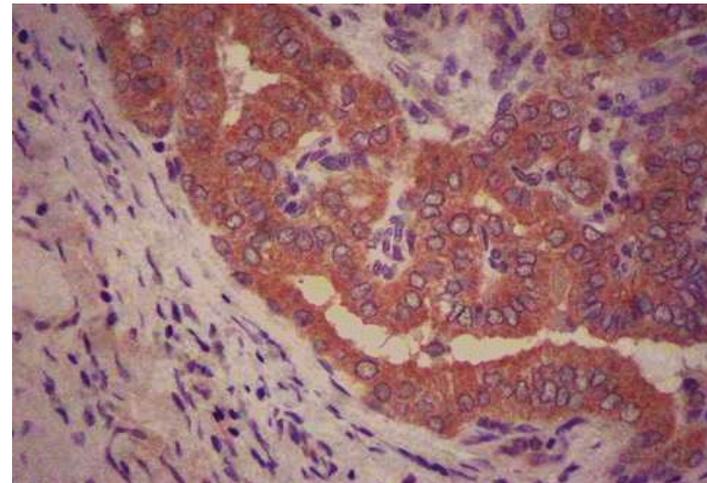
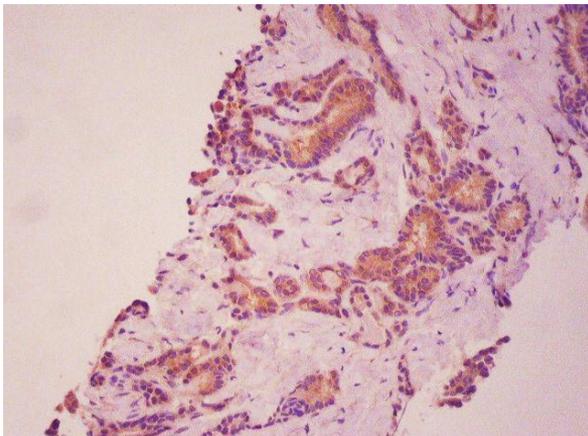
- Follicular variant of papillary carcinoma
- Less-prominent nuclear features
- More frequent distant metastasis

Both prognostic and genotype–phenotype correlations have also been reported for several genetic DTC markers.



## BRAF analysis by immunohistochemistry

- VE1 antibody can be used on core thyroid specimens to detect BRAF(V600E) mutated PTC at the preoperative time.
- VE1 immunohistochemistry performed on thyroid CNB samples matches with genetic analysis of BRAF(V600E) status.
- These data should greatly improve the widespread diffusion of BRAF test.





# Conclusioni



ITALIAN CHAPTER



Rimini, 5-8 novembre 2015

- L'indagine immunocitochimica è un test diffuso, economico e facilmente accessibile.
- La qualità ed affidabilità dei risultati dipende dalla corretta standardizzazione di tutto il processo.
- Nuovi supporti possono migliorare la resa tecnica e la riproducibilità.
- L'interpretazione dell'immunocitochimica non può prescindere dal dato morfologico.
- L'uso come fattore di caratterizzazione e marcatore prognostico si è arricchito della possibilità di utilizzare l'immunocitochimica come marcatore predittivo.



Rimini, 5-8 novembre 2015



ITALIAN CHAPTER



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

