

GENETICA MOLECOLARE DEL NODULO TIROIDEO INDETERMINATO: *UPDATE* 2019

Coordinatore
Vincenzo Toscano
Editors
Marco Caputo & Renato Cozzi

INTRODUZIONE

L'ago-aspirato (FNA) è la metodica che consente, nella maggior parte dei casi, una diagnosi certa circa la natura del nodulo tiroideo. Tuttavia, nel 20% circa dei casi, l'FNA non permette questa distinzione: è il caso dei noduli con **citologia indeterminata (TIR3A o TIR3B)** secondo la classificazione SIAPEC 2014). In questi noduli "indeterminati" solo l'asportazione chirurgica consente la diagnosi definitiva, che risulterà maligna nel 20% dei casi. Il restante 80% dei pazienti, invece, sarà stato sottoposto a intervento chirurgico per un nodulo benigno. Oggi esistono metodiche di genetica molecolare che possono essere d'aiuto, perché le alterazioni genetiche del tumore tiroideo differenziato sono ormai quasi tutte note: dalle più conosciute (*BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPAR γ*), ad altre meno frequenti, solo il 3.5% dei tumori tiroidei rimane senza alterazioni geniche note. Anche per questo motivo, nemmeno le più avanzate tecniche molecolari consentono la certezza assoluta pre-operatoria (100% di benignità o malignità di un nodulo indeterminato), ma permettono una stratificazione del rischio di malignità.

METODICHE DISPONIBILI

Attualmente, oltre ad alcune metodiche non commerciali eseguite a scopo di ricerca e quindi ancora da validare, esistono quattro metodiche in commercio, a livello mondiale:

- **Afirma GSX X Atlas** (2012, Veracyte, San Francisco, California);
- **Thyraseq V3** (2014, CBLPath, New York e Università di Pittsburgh, Pennsylvania);
- **ThyGeNeXT+ThyraMIR** (2015, Interpace Diagnostics, Parsippany, New Jersey);
- **Rosetta GX Reveal** (2017, Rosetta Genomics, Inc, Philadelphia, Pennsylvania; recentemente acquisita da Interpace Diagnostics).

Per completezza descrittiva, sono disponibili anche altri due test non statunitensi, **Plus ThyroPrint** (GeneproDX, Santiago, Chile) e **Mir-THYpe** (ONKOS Diagnosticos LDTA molecolare, Ribeirao Preto, Brasile), non ancora certificati dall'*American College of Pathologists* e su cui non vi è letteratura scientifica.

In tutti questi casi, l'analisi molecolare è eseguita sempre in modo centralizzato, spedendo i campioni allo specifico laboratorio di riferimento.

FINALITÀ DEL TEST

Nella citologia indeterminata, i test molecolari fungono da test di esclusione (*rule out*) o inclusione (*rule in*).

Un **test di esclusione** è in grado di affermare che un nodulo è sicuramente benigno, di escluderne la malignità ed evitare l'intervento chirurgico. Richiede un valore predittivo negativo (NPV) elevato (almeno paragonabile a quello dell'FNA *standard* per i noduli TIR2).

Un **test di inclusione**, invece, è in grado di identificare un nodulo sicuramente maligno e, quindi, di suggerirne fortemente l'asportazione chirurgica. Richiede un valore predittivo positivo (PPV) elevato (almeno paragonabile a quello dell'FNA *standard* per i noduli TIR5).

Tra i test commerciali al momento disponibili, Afirma e Rosetta sono ottimi test di esclusione, ThyGeNeXT è un test di inclusione, mentre Thyraseq V3 e ThyGeNeXT+ThyraMIR funzionano sia come test di esclusione che di inclusione.

BASI MOLECOLARI

Le metodiche molecolari possono indagare il DNA o l'espressione genica.

Le alterazioni geniche del tumore tiroideo prese singolarmente hanno sensibilità e specificità troppo basse per essere clinicamente rilevanti nel nodulo indeterminato. Per questo nel 2009 è stato proposto il primo test molecolare commerciale su DNA con PCR (miRInform), successivamente rinominato e sostituito dall'attuale **ThyGeNext**, che valutava sette alterazioni geniche (*BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPAR γ*). L'avvento di tecnologie di sequenziamento di ultima generazione (*Next Generation Sequencing*,



Massimiliano Andrioli (andrioli@endocrinologiaoggi.it)
EndocrinologiaOggi, Roma

NGS), ha permesso poi lo sviluppo di **Thyroseq** in cui, oltre alle sette alterazioni di "miRInform", sono identificati anche nuovi *driver* mutazionali (*PIK3CA*, *TP53*, *TSH-R*, *PTEN*, *RET*, *AKT1*, *CTNNB1*, *TERT*) e altre fusioni geniche (*BRAF*, *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, *AKT1*, *PPAR γ* , *THADA*).

Le metodiche molecolari che indagano, anziché il DNA, l'espressione genica (in altre parole come i geni sono diversamente espressi) utilizzano la bio-informatica, modelli artificiali e algoritmi proprietari in grado di creare dei Classificatori Molecolari, capaci di descrivere il rischio di malignità (o benignità) di un nodulo tiroideo. Queste tecnologie, basate sul *micro-array*, valutano l'RNA messaggero (mRNA), nel caso di **Afirma**, o il micro-RNA (miRNA, piccoli RNA non codificanti), nel caso di **ThyraMIR** e **Rosetta GX Reveal**.

Afirma

È il test molecolare più studiato dalla sua pubblicazione (2012), confermato da studi successivi, e **il più applicato nella pratica clinica** in anni di consolidata commercializzazione. Dalla sua prima versione ha subito nel tempo miglioramenti e implementazioni.

La prima versione, **Afirma GEC** (*Gene Expression Classifier*), basata su *micro-array*, utilizza un algoritmo proprietario che prevede l'analisi preliminare con alcune cassette di espressione genica (specifiche per profili di mRNA associati a carcinoma midollare tiroideo, tessuto paratiroideo o altri tumori metastatici). In assenza di alterazioni, il campione passa poi al classificatore principale, che valuta il profilo di espressione di altri 142 geni. Se anche in quest'ultimo non si riscontrano profili di espressioni alterati, il campione sarà classificato come benigno; in caso contrario come sospetto. Afirma GEC **è un test di esclusione, con elevato NPV (96%) che permette di riclassificare il 47% dei noduli in benigni, evitandone l'asportazione chirurgica**.

Un limite di GEC è l'alta percentuale di lesioni ossifile che possono, erroneamente, essere classificate come sospette, che è stato superato dall'**Afirma GSC** (*Genomic Sequencing Classifier*). Questo combina il sequenziamento classico di GEC con un sequenziamento di nuova generazione di RNA, che consente di analizzare i profili di espressione di RNA di oltre 1000 geni, identificando alterazioni precedentemente non rilevabili. Inoltre, valuta la presenza di varianti del DNA, fusioni, varianti del numero di copie e altre informazioni potenzialmente predittive di tumore tiroideo. **Afirma GSC, rispetto a GEC, riclassifica come benigno un numero ancora maggiore di noduli indeterminati (66%)**. L'aumento della *performance* diagnostica è a tutti i livelli, ma soprattutto a carico delle lesioni ossifile, che subiscono un miglioramento in termini di specificità dall'11.8% al 58.8%, con conseguente aumento delle formazioni ossifile correttamente riclassificate come benigne.

L'ultima versione, **Afirma GSC X Atlas**, rispetto a GSC, in caso di nodulo classificato come sospetto, descrive anche le eventuali alterazioni riscontrate (761 varianti, 130 fusioni, 511 geni unici, ecc) e soprattutto il rispettivo rischio di malignità (ROM) in funzione dei dati riportati in letteratura.

Il materiale da analizzare si preleva dal nodulo mediante FNA ed è inserito in provette specifiche (*Afirma Collection Tube*). Afirma GSC X Atlas **è da anni disponibile in Italia**.

Thyroseq V3

È un test multigenico, basato su NGS per lo studio del DNA. La sua ultima versione (ThyroSeq V3) studia il DNA di 56 geni (mutazioni puntiformi, piccole inserzioni/delezioni in 14 geni e 42 tipi di fusioni geniche) e i livelli di espressione di 16 geni. È molto affidabile in caso di riscontro di alcune mutazioni (*BRAF V600E*, *TERT*), mentre fornisce meno certezze per altre (*RAS* o fusione *PAX8/PPAR γ*) e sembra avere una *performance* migliore nei noduli Bethesda IV. Viene proposto con NPV (97%) e PPV (66%), che lo rendono **contemporaneamente un test di esclusione e di inclusione**. Tuttavia, in letteratura, sono ancora pochi gli studi clinici indipendenti e multicentrici su ThyroSeq.

Il materiale da analizzare è prelevato dal nodulo mediante FNA e preferibilmente inserito in provette specifiche (*ThyroSeq Preserve Solution*). In alternativa, è possibile anche prelevare il materiale direttamente dai vetrini di un precedente FNA. ThyroSeq V3 **è attualmente eseguibile in Italia**.

ThyGeNEXT-ThyraMIR

ThyGeNEXT è un test di sequenziamento NGS mirato alla ricerca di mutazioni in 5 geni (*BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*) e di 3 tipi di fusione (*RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPARγ*). Per migliorarne l'efficienza, è stato associato ThyraMIR, un classificatore che misura i livelli di espressione di 10 miRNA mediante PCR. **Le metodiche associate riclassificano il nodulo come "ad alto rischio" o "a basso rischio"**. Viene proposto con NPV (94%) e PPV (74%), ma in letteratura vi sono ancora pochissimi dati in merito.

Il materiale da analizzare è prelevato dal nodulo mediante FNA e inserito in provette specifiche (*RNA Retain*). In alternativa, è possibile prelevare il materiale direttamente dai vetrini di un precedente FNA. ThyGeNEXT-ThyraMIR è attualmente eseguibile in Italia.

Rosetta Gx Reveal

Indaga 24 miRNA (6 dei quali sovrapponibili a quelli di ThyraMIR). Sulla base dell'analisi dei *pattern* d'espressione dei miRNA, la metodica è in grado di **classificare le lesioni indeterminate come "benigne" o "sospette" per il profilo miRNA**. Rosetta GX Reveal è stato clinicamente validato analiticamente in uno studio multicentrico retrospettivo, su materiale cellulare recuperato da strisci citologici. Pertanto, l'analisi molecolare è effettuata solo su materiale ricavato direttamente da vetrini. Viene proposto con NPV (92%) e PPV (43%), ma in letteratura è pubblicato solo lo studio pilota.

Infine, *Rosetta Genomics*, la società che ha lanciato la metodica è stata recentemente acquisita da *Interpace Diagnostics*, società che commercializza ThyGeNEXT+ThyraMIR. Pertanto, al momento, Rosetta **non è disponibile in commercio** né in Italia, né all'estero.

CONCLUSIONI

Il valore predittivo dei test varia a seconda della prevalenza del tumore tiroideo nella specifica popolazione studiata. Quindi, **per una corretta interpretazione** dello stesso, sarebbe auspicabile **conoscere il rischio pre-test** o stratificarne il rischio di neoplasia, mediante la valutazione di:

- anamnesi positiva per cancro alla tiroide o esposizione a radiazioni;
- descrizione citologica;
- caratteristiche ecografiche.

Questa analisi pre-test, oltre a fornire una linea di riferimento per una corretta indicazione ai test, consente anche di sfruttare al meglio le potenzialità di ciascun metodo molecolare, garantendone una maggior affidabilità nell'interpretazione dei risultati.

Non è semplice confrontare tra loro queste metodiche in quanto:

- spesso i risultati di ciascun test vengono espressi in categorie intrinsecamente diverse tra loro e quindi mal confrontabili;
- gran parte degli studi in letteratura è sulle prime versioni di queste metodiche, oramai superate e sostituite da versioni con *performance* migliori;
- su alcune metodiche vi è scarsa letteratura.

L'autore ritiene che Afirma sia una delle metodiche più avanzate e consolidate, attualmente disponibili a livello mondiale per la diagnostica pre-operatoria dei noduli TIR3. Stratificando il rischio di neoplasia di un nodulo tiroideo indeterminato, è possibile individuare i pazienti a bassissimo rischio (< 4%) di avere un tumore, che possono ragionevolmente evitare l'intervento chirurgico.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander EK, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* [2012, 367: 705-15](#).
2. Alexander EK, et al. Multi-center clinical experience with the Afirma Gene Expression Classifier. *J Clin Endocrinol Metab* [2014, 99: 119-25](#).
3. Angell TE, et al. Afirma benign thyroid nodules show similar growth to cytologically benign nodules during follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* [2015, 100: E1477-83](#).
4. Harrell RM, et al. Statistical comparison of Afirma GSC and Afirma GEC outcomes in a community endocrine surgical practice: early findings. *Endocr Pract* [2019, 25: 161-4](#).

5. Angell TE, et al. Independent comparison of the Afirma genomic sequencing classifier and gene expression classifier for cytologically indeterminate thyroid nodules. *Thyroid* [2019, 29: 650-6](#).
6. Nikiforova MN, et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* [2013, 98: E1852-60](#).
7. Nikiforov YE, et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer* [2014, 120: 3627-34](#).
8. Nikiforova MN, et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer* [2018, 124: 1682-90](#).
9. Steward DL, et al. Performance of a multigene genomic classifier in thyroid nodules with indeterminate cytology: a prospective blinded multicenter study. *JAMA Oncol* [2019, 5: 204-12](#).
10. Nikiforov YE, et al. Clinical validation of the ThyroSeq v3 genomic classifier in thyroid nodules with indeterminate FNA cytology. *Cancer Cytopathol* [2019, 127: 225-30](#).
11. Wylie D, et al. Molecular classification of thyroid lesions by combined testing for miRNA gene expression and somatic gene alterations. *J Pathol Clin Res* [2016, 2: 93-103](#).
12. Partyka KL, et al. Utilization of direct smears of thyroid fine-needle aspirates for ancillary molecular testing: a comparison of two proprietary testing platforms. *Diagn Cytopathol* [2018, 46: 320-5](#).
13. Walts AE, et al. A retrospective analysis of the performance of the RosettaGX® Reveal™ thyroid miRNA and the Afirma Gene Expression Classifiers in a cohort of cytologically indeterminate thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* [2018, 46: 901-7](#).
14. Nishino M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: a review of methodology and test performance. *Cancer Cytopathol* [2016, 124: 14-27](#).
15. Nishino M, et al. Update on molecular testing for cytologically indeterminate thyroid nodules. *Arch Pathol Lab Med* [2018, 142: 446-57](#).
16. Ferraz C. Can current molecular tests help in the diagnosis of indeterminate thyroid nodule FNAB? *Arch Endocrinol Metab* [2018, 62: 576-84](#).
17. Cremonini N, Tallini G. Utilità della genetica nella gestione delle neoplasie tiroidee. [Endowiki](#).