



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE,
ODONTOIATRICHE E DELLE IMMAGNI MORFOLOGICHE E
FUNZIONALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
TRANSLATIONAL MOLECULAR MEDICINE AND SURGERY

XXXV CICLO

Coordinatore: Ch.mo Prof. Gaetano Caramori

**PROFILO DI ESPRESSIONE DI microRNA SU CAMPIONI
CITOLOGICI TIROIDEI PROCESSATI CON LIQUID-BASED
CYTOLOGY**

Settore Scientifico Disciplinare: MED/13

Tesi di Dottorato di:
Maria Di Mauro

Tutor:
Ch.mo Prof. Salvatore Cannavò
Cotutor:
Ch.ma Prof.ssa Mariacarla Moleti

Anno Accademico 2021/2022

Indice

1.	Introduzione	1
1.1	Valutazione diagnostica dei noduli tiroidei: ruolo della citologia da aspirazione con ago sottile.....	2
1.2	Analisi immuno-fenotipiche.....	7
1.3	Ruolo delle indagini molecolari	8
1.4	Genetica molecolare del carcinoma tiroideo differenziato: implicazioni diagnostiche.....	9
1.4.1	BRAF	11
1.4.2	RAS.....	12
1.4.3	Riarrangiamenti RET/PTC	12
1.4.5	Riarrangiamenti PAX8/PPAR γ	14
1.4.6	Altre mutazioni.....	14
1.5	Pannelli molecolari.....	16
1.6	Test molecolari disponibili in commercio	17
1.6.1	ThyroSeq v3.....	17
1.6.2	ThyGeNEXT/ThyraMIR.....	18
1.6.3	Afirma GSC and Xpression Atlas.....	19
2.	MicroRNA	21
2.1	Biogenesi e funzioni dei microRNA.....	21
2.2	MicroRNA e cancerogenesi.....	23
2.3	Ruolo dei microRNA nei carcinomi differenziati della tiroide	24
2.4	Ruolo dei microRNA nel PTC e FTC	25
2.5	Ruolo diagnostico dei microRNA su agoaspirato tiroideo.....	28
3.	PARTE SPERIMENTALE.....	32
3.1	Introduzione.....	33
3.2	Materiali e Metodi	34
3.2.1	Estrazione del DNA e analisi molecolare della mutazione di BRAF, TERT e NRAS.....	35
3.2.2	Analisi molecolare dei miRNA	35
3.2.3	Real-Time PCR	36
3.3	Analisi Statistica	36
3.4	Risultati	37

3.4.1 Analisi della popolazione in esame	37
3.4.2 Analisi dei profili di espressione dei miRNA.....	38
3.4.3 Conferma della differente espressione dei miRNA sull'intera casistica citologica	40
3.5 Discussione.....	44
BIBLIOGRAFIA	49

1. Introduzione

Nella pratica clinica i noduli tiroidei vengono diagnosticati con crescente frequenza nella popolazione generale, con una prevalenza maggiore nelle donne e nella fascia di età più avanzata e nelle aree a carenza iodica. La prevalenza dei noduli tiroidei palpabili nella popolazione adulta si attesta intorno al 10%, tuttavia, tale prevalenza aumenta fino al 50-70% grazie all'impiego degli ultrasuoni ad alta risoluzione, che possono rilevare noduli subcentimetrici e/o noduli clinicamente silenti [Guth S et al., 2009; Haugen BR et al., 2016]. La maggior parte dei noduli tiroidei è benigna mentre nel 5-25% dei casi si riscontra una neoplasia [Kakudo K et al., 2018; Keh SM et al., 2018;]. Lo spettro delle neoplasie tiroidee è vario. Le neoplasie derivate dalle cellule follicolari tiroidee costituiscono la maggior parte delle neoplasie tiroidee e possono essere distinte in neoplasie benigne, a basso rischio e maligne (figura 1) [Asa SL, 2019; Lloyd RV et al., 2017]. Le neoplasie benigne comprendono gli adenomi follicolari (FA). Le neoplasie a basso rischio comprendono le neoplasie tiroidee follicolari non invasive con caratteristiche nucleari simili al papillare (NIFTP), un gruppo di tumori tiroidei a potenziale maligno incerto, e i tumori trabecolari ialinizzanti. Le neoplasie tiroidee maligne, note come carcinomi differenziati della tiroide (DTC) comprendono i carcinomi papillari della tiroide (PTC, circa l'80-90% dei casi), i carcinomi follicolari della tiroide (FTC, circa il 10-15% dei casi), i carcinomi oncocitici (a cellule di Hürthle) (OCA) e i carcinomi tiroidei scarsamente differenziati (PDTC, circa 1-3% dei casi). Il carcinoma anaplastico della tiroide (ATC) è un tumore maligno indifferenziato raro (<1%) che origina dalle cellule follicolari tiroidee e risulta caratterizzato da un comportamento clinico molto aggressivo. Infine, i carcinomi midollari della tiroide (MTC) rappresentano dei tumori rari della tiroide (1-2%), che originano dalle cellule C parafollicolari che producono calcitonina [Asa SL, 2019; Lloyd RV et al., 2017]. Il carcinoma della tiroide è la più frequente neoplasia del sistema endocrino e rappresenta il 3.8% di tutte le neoplasie. Nelle ultime decadi la sua incidenza è progressivamente aumentata in quasi tutti i paesi, pur con ampia variabilità nelle diverse regioni geografiche, soprattutto nei paesi con elevato reddito, anche per via di un accesso più agevole ai mezzi diagnostici. La mortalità del carcinoma tiroideo non ha mostrato un incremento parallelo

all'incidenza, dato che l'incremento delle diagnosi riguarda i piccoli carcinomi papillari che hanno una prognosi nettamente più favorevole rispetto agli altri istotipi [Davies L et al., 2006; Pellegriti G et al., 2013]. Relativamente al tasso di sopravvivenza il fattore prognostico più significativo è rappresentato dall'istotipo: il tasso di sopravvivenza a 20 anni è del 98-99% per i carcinomi papillari, 80-90% per i carcinomi follicolari, si riduce al 75-50% per i carcinomi midollari ed infine è minore del 20% ad 1 anno per i carcinomi anaplastici.

World Health Organization classification of primary thyroid neoplasms of follicular cell derivation 2017		
Benign	Follicular adenoma	
Borderline/uncertain	Hyalinizing trabecular tumor Other encapsulated follicular-patterned tumors	Follicular tumor of UMP Well-differentiated tumor of UMP NIFT-P
Malignant	PTC	Papillary carcinoma Follicular variant of PTC Encapsulated variant of PTC Papillary microcarcinoma Columnar cell variant of PTC Oncocytic variant of PTC
	FTC	FTC, minimally invasive FTC, encapsulated angioinvasive FTC, widely invasive Hürthle cell carcinoma
	Hürthle (oncocytic) cell tumors Poorly differentiated thyroid carcinoma Anaplastic thyroid carcinoma	

Figura 1 Classificazione delle neoplasie tiroidee primitive di derivazione dalle cellule follicolari WHO 2017 (Asa SL, 2019)

1.1 Valutazione diagnostica dei noduli tiroidei: ruolo della citologia da aspirazione con ago sottile

L'inquadramento diagnostico dei noduli tiroidei rappresenta un'importante sfida sia per il clinico che per il patologo con notevoli ripercussioni nella scelta del trattamento più adeguato. Lo studio dei noduli tiroidei si avvale, oltre che dell'esame clinico ed ecografico, anche della tecnica di aspirazione con ago sottile (fine needle aspiration FNA). Tale tecnica consente, mediante aspirazione tramite ago sottile sotto guida ecografica, di allestire dei preparati citologici e studiare la morfologia delle cellule della lesione. La citologia tiroidea da FNA, fin dalla sua introduzione negli anni '80,

rappresenta il più importante strumento diagnostico preoperatorio per la valutazione dei noduli tiroidei proprio per la sua semplicità, sicurezza, accuratezza e per il vantaggioso rapporto costo-beneficio [Gharib H et al., 2016]. Essa presenta, infatti, un'elevata sensibilità e specificità nella diagnosi differenziale dei noduli benigni dalle lesioni tiroidee maligne. Secondo i dati di letteratura oltre il 70% dei noduli tiroidei è benigno e solo il 5–10% è maligno [Cooper DS et al., 2009; Cramer JD et al., 2010]. Tuttavia, una percentuale variabile tra il 15 e il 25% delle lesioni tiroidee ricade nella controversa zona grigia delle lesioni follicolari, "categoria indeterminata", che include sia lesioni benigne che maligne, per le quali non è sempre possibile una classificazione sulle base delle caratteristiche morfologiche, determinando un problema importante relativamente alla conseguente gestione clinica e/o chirurgica [Baloch ZW et al., 2002; Faquin WC et al., 2010; Poller DN et al., 2016; Rossi ED et al., 2014]. A tal proposito i dati in letteratura dimostrano come tali lesioni soltanto nel 10-30% dei casi risultino maligne al riscontro istologico e che, di conseguenza, tali lesioni siano responsabili di un alto tasso di tiroidectomie non necessarie con importanti implicazioni psicologiche per il paziente e maggiori costi per l'assistenza sanitaria [Feldkamp J et al., 2016; Panebianco F et al., 2015; Paschke R et al., 2017; Singh ON et al., 2020]. Alla verifica istopatologica la categoria dei noduli indeterminati corrisponde ampiamente alle neoplasie ad architettura follicolare (FN), sia benigne che maligne, incluso l'adenoma follicolare (FA), la neoplasia follicolare tiroidea non invasiva con caratteristiche nucleari simil papillari (NIFTP), il carcinoma papillare variante follicolare della tiroide (FVPTC) e il carcinoma follicolare della tiroide (FTC). Queste ultime neoplasie sono particolarmente difficili da inquadrare mediante FNA. Nel caso dell'FTC la citologia non è in grado di evidenziare l'invasione vascolare e/o capsulare al fine di distinguere FTC da un FA benigno. Nel caso dell'FVPTC il pattern di crescita è follicolare ma dal punto di vista citomorfologico non sono evidenti le caratteristiche nucleari tipiche del PTC [Nardi F et al., 2014; Poller DN et al., 2016]. Al fine di standardizzare le valutazioni citologiche, stimare il potenziale rischio di malignità e di conseguenza definire la gestione più idonea dei noduli tiroidei sono stati redatti dei sistemi di classificazione basati su criteri citologici. Tra i sistemi di refertazione, la Classificazione Italiana SIAPEC-AIT, nella sua ultima versione aggiornata al 2014 e il Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, redatta nel 2007 e aggiornata nel 2017 (TBSRTC) sono fra quelli più utilizzati (tabella 1) [Baloch ZW et al., 2008; Nardi F et al., 2014; Pusztaszeri M et al., 2016]. Benché i parametri morfologici su cui si basano i due sistemi siano molto simili, esistono delle differenze nei

criteri di inclusione nelle categorie citologiche, soprattutto nelle categorie indeterminate, che incidono sulle raccomandazioni per la gestione clinica dei pazienti. Entrambi i sistemi di refertazione identificano sei categorie con rischio incrementale di malignità, rispettivamente non diagnostico/insoddisfacente, non neoplastico/benigno, indeterminato (2 categorie per ciascun sistema), sospetto per malignità e diagnostico per malignità. La categoria non *diagnostico/insoddisfacente* include i campioni non diagnostici a seguito di materiale insufficiente (poche cellule, materiale prevalentemente ematico o cistico) o inadeguato per presenza di artefatti durante le procedure di fissazione e/o di colorazione o eccessiva presenza di sangue. In tali casi è consigliata la ripetizione dell'esame al fine di riclassificare il nodulo in una delle rimanenti categorie di rischio. Circa il 70% delle valutazioni citologiche è classificata come *benigna*. In questa categoria rientra la citologia da noduli colloidei o iperplastici, da tiroiditi autoimmuni o granulomatose e da altre, meno frequenti, condizioni non neoplastiche. La categoria *sospetto per malignità*, include quei noduli in cui è fortemente sospettata una diagnosi citologica di malignità, che non può essere stabilita in maniera assoluta. Il campione prelevato da queste lesioni si presenta con una bassa cellularità che comprende anche cellule tipiche e atipiche senza, però, avere delle caratteristiche nettamente maligne. Infine, il 5% circa dei noduli tiroidei, presenta una citologia definita *maligna* che comprende campioni con diagnosi citologica conclusiva di neoplasia maligna (papillifera, midollare, scarsamente differenziata, anaplastica, linfoma, tumore non epiteliale o metastatico). Per quanto riguarda la zona grigia delle lesioni indeterminate nel sistema Bethesda [Pusztaszeri M et al., 2016], i noduli indeterminati sono suddivisi in *atipie o lesioni follicolari di significato indeterminato* (AUS/FLUS) e *neoplasie follicolari o sospette per neoplasie follicolari* (FN/SFN), mentre la classificazione italiana prevede una suddivisione della categoria indeterminata TIR3 in due sottocategorie a diverso rischio di malignità: TIR3A (lesione indeterminata a basso rischio,) e TIR3B (lesione indeterminata ad alto rischio) [Nardi F et al., 2014]. Tali suddivisioni, per quanto simili, non sono perfettamente sovrapponibili, in particolare per quel che riguarda la categoria ad alto rischio del sistema italiano. Infatti, la categoria TIR3B non è limitata alle lesioni a pattern follicolare come FN/SFN ma comprende anche quelle lesioni a pattern non follicolare con caratteristiche nucleari del carcinoma papillare della tiroide troppo lieve o focale per essere incluso nella categoria sospetta (TIR4) [Nardi F et al., 2014]. Per ognuna delle categorie presenti nei sistemi di refertazione viene anche definito il rischio di malignità (ROM), vale a dire il rischio stimato che una lesione possa risultare maligna all'esame istologico. In entrambi i sistemi

il rischio di malignità per i noduli benigni risulta inferiore al 3%, per cui per le lesioni che rientrano in tale categoria è indicato follow-up clinico ed ecografico. Nel caso in cui il nodulo dovesse andare incontro a crescita o modificazioni ecografiche potrà essere opportuno ripetere FNA. Il rischio di malignità dei noduli sospetti per malignità e maligni è, invece, elevato, rispettivamente 60-80% e oltre il 95%, per cui l'indicazione terapeutica è chirurgica. Per le lesioni indeterminate il ROM stimato è variabile nei due sistemi di refertazione. In particolare, nella classificazione italiana la categoria a basso rischio (TIR3A) ha un ROM previsto tra il 5-10%, mentre quella ad alto rischio (TIR3B) tra il 15-30% [Nardi F et al., 2014]. Di conseguenza, le linee guida raccomandano una diversa gestione clinica, per le due categorie secondo la quale dovrebbero essere sottoposti ad intervento chirurgico solo i noduli ad alto rischio. Di recente è stato osservato che il ROM per le lesioni indeterminate è lievemente superiore rispetto a quanto stimato, riportando un valore del 17% per la categoria TIR3A e del 47% per la categoria TIR3B [Trimboli P et al., 2019]. Tuttavia, questo dato relativo al ROM delle categorie indeterminate a basso rischio risente del fatto che la maggior parte dei noduli che ricadono in tale categoria non vengono trattati chirurgicamente [Straccia P et al., 2017]. Nell'edizione del sistema Bethesda del 2017, a differenza dei dati riportati in quella del 2008 dove sostanzialmente i ROM erano simili a quelli della classificazione italiana, i ROM risultano incrementati. Infatti, il ROM stimato per la categoria AUS/FLUS è tra il 10 e il 30% rispetto al 5-15% della precedente versione e per la categoria FN/SFN si colloca in un range tra 25 e 40%, rispetto al 15-30% del 2008, ponendo un problema rispetto alla scelta della gestione del paziente (terapia conservativa o terapia chirurgica) [Poller DN et al., 2016]. Il riconoscimento nella recente edizione della classificazione dei tumori endocrini della WHO (2017) di una nuova entità nosologica il *Non invasive Follicular Tumor with Papillary-like nuclear features* (NIFTP) dovrebbe determinare una riduzione del ROM, soprattutto nelle categorie indeterminate di entrambi i sistemi classificativi [Pusztaszeri M et al., 2016]. Il NIFTP è una neoplasia a crescita follicolare con atipia nucleare lieve-moderata (in assenza di corpi psammomatosi, vere papille e alterazioni molecolari tipiche del carcinoma papillare classico) delimitata da una capsula indenne [Parente DN et al., 2018]. Il termine NIFTP, che ha sostituito il PTC variante follicolare minimamente invasivo nella classificazione WHO del 2017, è stato introdotto al fine di enfatizzare il comportamento biologico del tumore, per il cui trattamento viene raccomandata la lobectomia seguita da follow-up [Haugen BR et al., 2017; Nikiforov YE et al., 2016]. Una questione rilevante è rappresentata dall'implicazione della NIFTP sulla citologia

tiroidea e la sua allocazione nelle diverse categorie diagnostiche. In particolare, diversi studi hanno riferito che le NIFTP sono spesso diagnosticate nelle categorie indeterminate, in particolare, 31% nell'AUS/FLUS, 26,6% nell'FN/SFN e 24,3% nell'SFM con ripercussioni sulla stima del rischio di malignità. In effetti, i primi studi condotti relativamente alla rivalutazione del rischio di malignità dopo l'introduzione del termine NIFTP hanno stimato una significativa riduzione del ROM nelle varie classi diagnostiche (45% negli AUS/FLUS, 18% negli FN/SFN e del 48% sospetti per malignità) [Strickland KC et al., 2015]. Dopo la revisione dei criteri nel 2018 [Parente DN et al., 2018], gli studi, che si sono focalizzati sull'impatto del NIFTP sulla diagnostica citologica tiroidea, hanno evidenziato una riduzione del ROM più contenuta nelle diverse classi diagnostiche del sistema Bethesda. Lo studio di Kopczynski e colleghi ha dimostrato una riduzione del ROM statisticamente non significativa e pari allo 0,7% per la categoria FN/SFN, 4,2% per la categoria sospetta per malignità, 0,5% per la categoria maligna, e una mancata riduzione del ROM per la categoria AUS/FLUS [Kopczynski J et al., 2020] In un altro studio Ventura e colleghi hanno osservato una riduzione del ROM del 15,2% per gli AUS/FLUS, del 7,6% per gli FN/SFN e del 14,2% per i sospetti per malignità [Ventura M et al., 2019]. Sebbene sia ben noto che l'FNA giochi un ruolo essenziale nella valutazione diagnostica dei noduli tiroidei, tuttavia la valutazione morfologica da sola non è capace di essere diagnostica in tutti i casi e/o fornire risposte a tutti i quesiti diagnostici. A tale scopo diversi autori, hanno supportato l'impiego di tecniche ancillari, incluse l'immunocitochimica (ICC) e i test molecolari, sui FNA tiroidei processati con striscio convenzionale (CS) o citologia su base liquida (LBC) al fine di incrementarne l'accuratezza diagnostica [Cantara S et al., 2017; Decaussin-Petrucci M et al., 2017; de Koster EJ et al., 2018; Poller DN et al., 2017; Rossi ED et al., 2017a; Rossi ED et al. 2018].

Classificazione Italiana 2014	The Bethesda Reporting System For Thyroid Cytology 2017 (USA)
TIR1: non diagnostico	ND: non diagnostico
TIR1C: cistico	
TIR2: benigno	BEN: benigno
TIR3A: lesione indeterminata a basso rischio di malignità	AUS/FLUS: atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato
TIR3B: lesione indeterminata ad alto rischio di malignità	FN/SFN: neoplasia follicolare/sospetto neoplasia follicolare
TIR4: sospetto per malignità	SUSP: sospetto di malignità
TIR5: maligno	MAL: maligno

Tabella 1 Confronto tra i sistemi di refertazione italiano 2014 e americano Bethesda 2017

1.2 Analisi immuno-fenotipiche

Molti autori hanno indagato l'impiego di diversi immunomarcatori specifici al fine di migliorare la caratterizzazione delle lesioni follicolari tiroidee su FNA. Le linee guida ATA del 2015 riconoscono l'immunocitochimica come una tecnica in fase di sviluppo con limitati studi prospettici di validazione nella citologia indeterminata [Haugen BR et al., 2016] Sono stati identificati diversi marker di malignità, tra cui GAL3, HMBE-1 e CK-19. GAL-3 (galectina-3), è un membro delle lectine leganti i beta galattosidi, con funzioni non del tutto note e il cui ruolo è stato associato con la regolazione del ciclo cellulare, la modulazione della matrice cellulare e secondo alcuni autori con la crescita e trasformazione delle cellule tiroidee. Gli studi sulla citologia indeterminata hanno dimostrato come l'impiego di questo marker abbia una sensibilità compresa tra lo 0 e il 92% e una specificità compresa tra il 68% e il 100% [de Koster EJ et al., 2018; Rossi ED et al., 2017a]. Sono stati descritti risultati simili con HMBE-1 (Hector Battiflora Mesothelial-1), un anticorpo monoclonale rivolto verso un antigene non noto sulla superficie dei microvilli delle cellule mesoteliali. Esso è, generalmente, negativo nelle cellule follicolari tiroidee normali, mentre la sua espressione è associata al PTC sebbene non ne indichi necessariamente la presenza. Questo marker ha mostrato in diversi studi condotti sui noduli indeterminati una sensibilità e una specificità rispettivamente tra il

61% e il 100% e tra il 75% e il 96% [de Koster EJ et al., 2018; Rossi ED et al., 2017a]. Infine, un altro marker analizzato è la CK-19 (Citocheratina-19), una cheratina di tipo I, che appartiene al gruppo del filamento intermedio, che organizzano il citoscheletro cellulare e l'integrità strutturale. La sensibilità e la specificità riportate per la colorazione con CK-19 nella citologia indeterminata varia dal 61% al 100% e dal 75% al 96% rispettivamente [de Koster EJ et al., 2018; Rossi ED et al., 2017a]. Nonostante l'impiego di questi differenti markers per migliorare l'accuratezza diagnostica degli FNA, l'uso dell'immunocitochimica nell'ulteriore caratterizzazione dei noduli indeterminati ha avuto un successo limitato in quanto nessuna delle molecole testate ha raggiunto una sufficiente sensibilità e specificità da sostenerne l'impiego nella pratica clinica.

1.3 Ruolo delle indagini molecolari

Nelle ultime decadi, i considerevoli progressi raggiunti nella conoscenza dei meccanismi molecolari e genetici alla base della tumorigenesi e del cancro tiroideo hanno alimentato la ricerca e l'applicazione a scopo diagnostico delle indagini molecolari sulla citologia delle lesioni tiroidee con un ruolo significativo, sebbene non esclusivo, per quanto riguarda la diagnosi, la valutazione della prognosi e conseguentemente una gestione personalizzata e su misura delle lesioni citologicamente indeterminate. Un significativo contributo alla conoscenza del profilo molecolare della patologia tiroidea è da attribuirsi alla pubblicazione nel 2014 dello studio Thyroid Cancer Genome Atlas che ha chiarito ulteriormente le conoscenze relative al PTC [Killock D, 2014]. Lo scopo principale delle indagini molecolari è quello di distinguere correttamente i noduli benigni nell'ambito delle citologie indeterminate, riducendo di conseguenza il numero degli interventi chirurgici a fini diagnostici non necessari [Ngo, HTT et al., 2020; Nylén C et al., 2020; Ohori, NP et al., 2020; Kumar N et al., 2020]. Le linee guida ATA sulla gestione dei pazienti con noduli tiroidei e carcinoma differenziato della tiroide, pubblicate nel 2015, e la seconda edizione del Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (TBSRTC) raccomandano l'impiego delle metodiche di diagnostica molecolare come possibile opzione nei casi di FNA con citologia indeterminata [Ali SZ et al., 2018; Haugen BR et al., 2016]. In particolare, le linee guida ATA suggeriscono come l'applicazione dei pannelli molecolari (inclusi BRAF, RAS, RET/PTC and PAX8-PPAR γ) possano supportare una diagnosi definitiva in alcuni specifici casi, migliorando l'accuratezza dei prelievi citologici indeterminati e fornendo un valido strumento per

stratificare il rischio di malignità (ROM), evitando, dunque, interventi chirurgici non necessari [Haugen BR et al., 2016]. È importante sottolineare come, sebbene né le linee guida ATA né la seconda edizione del TBSRTC abbiano approvato alcun test molecolare specifico, entrambe suggeriscono il potenziale ruolo dei diversi test molecolari in diverse categorie e scenari diagnostici [Ali SZ et al., 2018; Haugen BR et al., 2016]. Le indagini molecolari offrono, quindi, la possibilità di ridefinire la stratificazione del rischio dei noduli tiroidei citologicamente indeterminati, con lo scopo di distinguere i noduli che sulla base del profilo molecolare molto probabilmente sono benigni e possono andare incontro a sorveglianza ecografica dai noduli meritevoli di approccio chirurgico al fine della diagnosi e per quest'ultimi determinare l'estensione dell'approccio chirurgico iniziale (lobectomia versus tiroidectomia near-total). È importante sottolineare come le indagini molecolari da sole non siano adeguate a guidare le decisioni cliniche, ma tali risultati necessitano di esser sempre implementati e valutati insieme con la citomorfologia del nodulo, storia clinica e caratteristiche ultrasonografiche. Inoltre, occorre sottolineare come le indagini molecolari non sono raccomandate nei pazienti con un nodulo tiroideo indeterminato se sono presenti altre indicazioni per la chirurgia come un nodulo superiore a 4 cm, sintomi compressivi o preferenze personali [Ferris RL et al., 2015] e che malgrado il potenziale valore negli adulti, non sono raccomandati nella popolazione pediatrica [Francis GL et al., 2015].

1.4 Genetica molecolare del carcinoma tiroideo differenziato: implicazioni diagnostiche

Alla base dello sviluppo e della progressione di qualsiasi entità tumorale vi è fondamentalmente l'interruzione delle vie di segnale cellulare che regolano l'equilibrio tra proliferazione cellulare e apoptosi [Wu C et al., 2014]. Nella patogenesi del cancro della tiroide sono stati descritti cambiamenti genetici che si verificano nei geni che codificano per le proteine della via del segnale MAPK (mitogen-activated protein chinasi), che svolge un ruolo importante in un'ampia gamma di processi cellulari, come la regolazione dell'espressione genica, la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare programmata, e nei geni che codificano la via del segnale PI3K-AKT, che svolge un ruolo nella regolazione del metabolismo del glucosio, della sopravvivenza, dell'adesione e della motilità cellulare (figura 2) [Wu C et al. 2014; Prete A et al., 2020]. I meccanismi molecolari principalmente coinvolti nel cancro della tiroide sono: mutazioni

puntiformi e riarrangiamenti cromosomici (geni di fusione) [Prete A et al., 2020]. In caso di mutazione puntiforme, viene modificato un singolo nucleotide. Nel caso di riarrangiamento cromosomico, due diversi geni sono fusi tra loro [Prete A et al., 2020]. La maggior parte di questi cambiamenti genetici non sono ereditari ma somatici (mutazioni che insorgono direttamente nel tessuto tiroideo) [Prete A et al., 2020]. Le mutazioni germinali ereditarie sono tipiche, invece, delle forme familiari di MTC e delle sindromi da neoplasie endocrine multiple (MEN2A, MEN2B) [Prete A et al., 2020]. Le mutazioni somatiche, a differenza delle mutazioni germinali che vengono analizzate dal sangue periferico raccolto dal paziente e possibilmente dal suo parente, vengono ricercate utilizzando materiale tiroideo proveniente da FNA o da tessuto tumorale tiroideo resecato [Wu C et al., 2014]. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo del carcinoma tiroideo ha importanti implicazioni diagnostiche, soprattutto, per quel che riguarda la valutazione preoperatoria dei noduli a citologia indeterminata. Attualmente, le mutazioni puntiformi in BRAF, RAS, TERT, RET, TP53 e i geni di fusione RET/PTC, PAX8/PPAR- γ , NTRK sono le principali cause genetiche conosciute di carcinoma della tiroide [Prete A et al., 2020; Wu C et al., 2014].

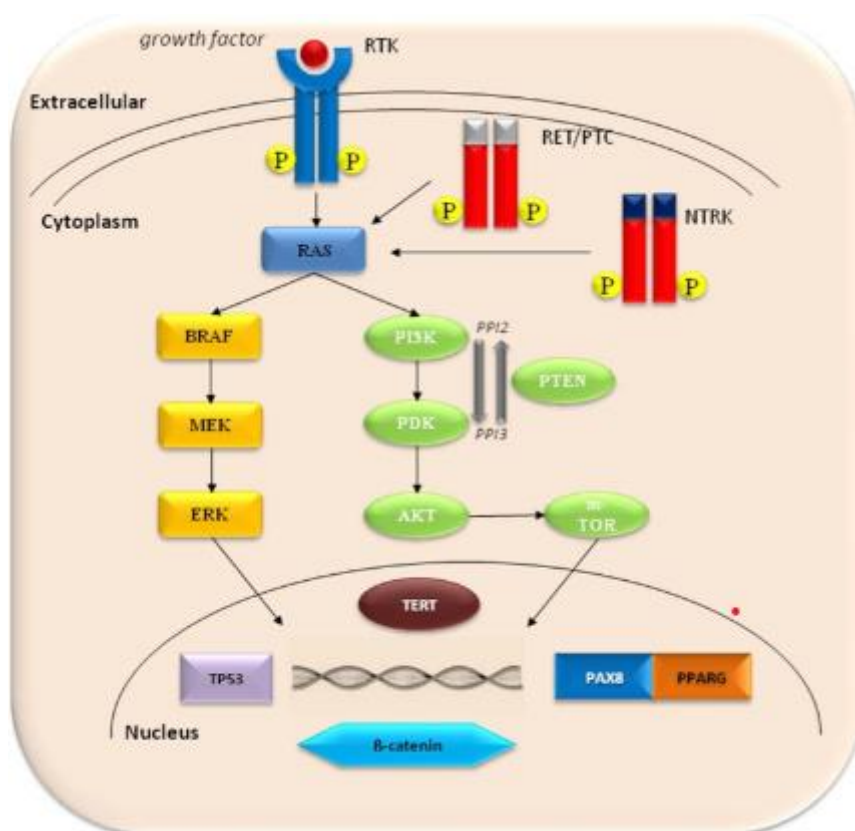


Figura 2 Patogenesi molecolare del tumore della tiroide: deregolazione della via del segnale MAPK e della via del segnale PI3K /AKT (Prete A et al., 2020)

1.4.1 BRAF

Le mutazioni di BRAF rappresentano una delle mutazioni geniche più importanti e più studiate nel carcinoma tiroideo [Cohen Y et al., 2003]. BRAF è una serina-treonina chinasi, appartenete alla famiglia delle proteine RAF, attivatori della via MAPK. La via di trasduzione intracellulare di MAPK ha un ruolo cruciale per il controllo della crescita, proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare; pertanto, è frequentemente bersaglio di attivazione oncogenica in molti tumori umani quali il melanoma, il carcinoma della mammella, del pancreas e della tiroide. In particolare, una mutazione puntiforme (T1799A) determina il cambio del residuo amminoacidico valina 600 di BRAF ad acido glutammico. La valina 600 è localizzata in un'ansa del dominio chinasi di BRAF che ne regola la funzione enzimatica, e il suo cambiamento ad acido glutammico determina l'attivazione chinasi in maniera costitutiva [Wellbrock C et al., 2004]. La proteina BRAF mutata influenza l'espressione di diversi geni, compresa una ridotta espressione del gene NIS e dei geni per tireoglobulina e tireoperossidasi [Song, JY et al., 2018; Xing M et al., 2013]. La frequenza di questa mutazione puntiforme si attesta in media al 45% nei PTC [Xing M, 2013]. Tali mutazioni sono più frequenti nei PTC sporadici, rispetto ai PTC pediatrici e radio-indotti, sono rare negli FTC e non si riscontrano nelle lesioni tiroidee benigne [Vander Poorten V et al., 2013]. Inoltre, in associazione con questa mutazione, sono stati descritti una prognosi peggiore e una recidiva della malattia più frequente, associati ad una maggiore aggressività tumorale, diffusione extratiroidea, metastasi linfonodali locali e a distanza e riduzione dell'effetto della terapia con radioiodio a causa del ridotto trasporto di iodio nella cellula. [Hlozek J et al., 2022; Lupi C et al., 2007; Xing M et al., 2005]. La mutazione BRAF V600E rappresenta il biomarcatore che è stato più ampiamente analizzato nei campioni di FNA. Una review su 18 studi relativi all'impiego del test BRAF in campioni di FNA tiroidei ha mostrato che il tasso di malignità in noduli BRAF-positivi era del 99,8% [Nikiforova MN et al., 2009b]. Tale studio dimostrava, inoltre, che il 15-39% dei campioni di FNA BRAF-positivi era indeterminato o non diagnostico, dimostrando così l'utilità diagnostica di BRAF nella citologia indeterminata. Tuttavia, la bassa sensibilità per malignità di BRAF ne limita l'impiego come marker diagnostico per noduli indeterminati [Nikiforov YE, 2017]. Inoltre, la mutazione BRAF V600E è rara nei FNA di noduli indeterminati (< 10%) che sono tipicamente neoplasie a pattern follicolare [Nikiforov YE et al., 2011]. Tuttavia, indipendentemente dalla categoria, quando si riscontra una mutazione BRAF V600E su FNA, dovrebbe essere fortemente sospettata una diagnosi di tumore della tiroide, anche

se sono stati segnalati rari casi falsi positivi [Yip L et al., 2014]. Sebbene la mutazione BRAF V600E sia quella più comunemente studiata, BRAF 599 e 601 sono state anche descritte in tumori a pattern follicolare. Sono state, inoltre, documentate anche traslocazioni che coinvolgono BRAF.

1.4.2 RAS

Le mutazioni di RAS rappresentano la seconda mutazione più comune dei DTC [Xing M, 2013]. Le tre isoforme dei geni RAS (NRAS, K-RAS e H-RAS) codificano per piccole proteine G, in grado di legare e idrolizzare il GTP a GDP passando così da una forma attiva (legata al GTP) a una forma inattiva (legata al GDP). Nella maggior parte dei casi le mutazioni di RAS determinano la perdita della funzione GTPasica portando ad una sua attivazione costitutiva. Le mutazioni più comuni nel carcinoma tiroideo sono relative a NRAS. Sebbene RAS possa attivare entrambe le vie del segnale MAPK e PI3-AKT, quest'ultima sembra essere attivata preferenzialmente da RAS mutato [Xing M, 2013]. È utile sottolineare come la via PI3-AKT sia maggiormente interessata nelle neoplasie a crescita follicolare, incluso l'FTC, promuovendone invasività e metastatizzazione. A differenza dei riarrangiamenti RET/PTC e delle mutazioni di BRAF, l'attivazione oncogenica dei geni RAS è presente in entrambi i tipi di carcinomi differenziati della tiroide, sebbene sia molto più frequente nelle forme follicolari (40-50%) che in quelle papillifere (10-20%) [Esapa CT et al., 1999; Nikiforov YE, 2011], molte delle quali soprattutto nella variante follicolare [Gupta N et al 2013 ; Zhu Z et al., 2003;]. Tuttavia, le mutazioni RAS non sono specifiche per malignità, e si osservano anche nel 20-40% degli adenomi follicolari e rappresentano, inoltre, le mutazioni predominanti in NIFTP [Nikiforov YE, 2011]. Questo per quanto ci porta a ipotizzare che le mutazioni dei geni RAS siano un evento precoce nella tumorigenesi della tiroide, ne limita l'utilità come unico marker diagnostico di malignità.

1.4.3 Riarrangiamenti RET/PTC

Il protooncogene RET codifica una proteina di membrana con un dominio tirosin-chinasico sul versante citoplasmatico che funziona da recettore per ligandi della famiglia del GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) e gioca un ruolo chiave nella crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare. Normalmente RET è altamente espresso nelle cellule parafollicolari C, mentre non risulta espresso nelle cellule follicolari della tiroide, dove invece può essere attivato da riarrangiamenti cromosomici. I riarrangiamenti cromosomici che interessano questo gene, collocato sul braccio lungo del

cromosoma 10, portano alla fusione della regione che codifica per il dominio tirosino-chinasico (situato al 3' del gene) con la porzione al 5' di geni eterologhi [Hlozek J et al., 2022; Prete A et al., 2020]. I geni a cui RET si fonde codificano per proteine che sono strutturalmente e funzionalmente differenti tra di loro, ma che, tuttavia, condividono due caratteristiche. La prima è quella di essere normalmente espresse nelle cellule follicolari tiroidee, permettendo in tal modo l'espressione del gene chimerico RET/PTC in queste cellule. La seconda è quella di essere dotate di domini di dimerizzazione, che mediano l'attivazione costitutiva della funzione chinasica della proteina chimerica. Esistono più di dieci varianti del riarrangiamento RET/PTC, in cui i differenti geni partner si uniscono, invariabilmente, alla sequenza codificante la porzione tirosino-chinasica di RET. La fusione del gene H4 (D10S170) a RET, denominata RET/PTC1, e la fusione del gene NCOA4 (RFG/ELE1) a RET, denominata RET/PTC3, sono le forme di riarrangiamento RET/PTC più frequenti e costituiscono circa l'80% di tutti i riarrangiamenti del DTC [Prete A et al., 2020]. Entrambe sono dovute a inversione paracentrica del braccio lungo del cromosoma 10 dove sia H4 che NCOA4 sono localizzati insieme a RET. La proprietà oncogena delle proteine chimeriche RET/PTC1 e RET/PTC3 risiede essenzialmente nell'attivazione costitutiva della funzione chinasica, con coinvolgimento delle vie di trasduzione del segnale MAPK e PI3K/AKT [Hlozek J et al., 2022; Prete A et al., 2020]. Numerosi studi hanno cercato di mettere in relazione i riarrangiamenti RET/PTC con specifiche caratteristiche clinico-patologiche dei PTC. In genere, il riarrangiamento RET/PTC1 è più frequentemente riscontrato nella variante classica dei PTC, mentre RET/PTC3 è rilevato specificatamente nei PTC solidi-follicolari indotti da radiazione. Alcuni studi hanno dimostrato come RET/PTC1 sia associato con una prognosi più favorevole, mentre RET/PTC3 sia associato con un fenotipo più aggressivo e maligno [Prete A et al., 2020]. Tuttavia, i pazienti che ospitano questi riarrangiamenti di solito seguono un corso favorevole, per la loro capacità di rispondere alla terapia con iodio radioattivo (RAI) [Paulson VA et al., 2019]. Inoltre, i tumori che mostrano riarrangiamenti RET/PTC presentano più metastasi regionali [Hlozek J et al., 2022; Prete A et al., 2020]. La cancerogenesi RET/PTC-indotta determina una maggiore espressione e fosforilazione dell'epidermal growth factor receptor (EGFR) e può essere potenziale bersaglio delle tirosin chinasi (TKI) che inibiscono EGFR [Croyle M et al., 2008]

1.4.5 Riarrangiamenti PAX8/PPAR γ

I riarrangiamenti cromosomici PAX8/PPAR γ sono dovuti ad una traslocazione cromosomica tra i cromosomi 2 e 3, che determina la fusione tra il promotore e le sequenze che codificano per il dominio che lega il DNA del gene PAX8 con la maggior parte della sequenza codificante del gene PPAR γ [Kroll TG et al., 2000; Prete A et al., 2020]. La proteina PAX8 è un fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione dei tireociti e necessario per l'espressione di numerosi geni tiroide-specifici che codificano per la tireoglobulina, la tireoperossidasi e il simporto sodio/iodio (NIS) [Prete A et al., 2020]. PPAR γ è il recettore nucleare di un gruppo di ligandi di natura lipidica dotato di attività trascrizionale e coinvolto nella differenziazione adipocitaria e nel metabolismo del glucosio e dei lipidi [Prete A et al., 2020]. PPAR γ è, inoltre, dotato di attività oncosoppressoria in diversi sistemi, tra cui la tiroide stessa. La proteina di fusione PAX8-PPAR γ può agire come inibitore negativo dell'attività oncosoppressoria di PPAR γ o come un nuovo fattore trascrizionale con attività protooncogenica [Raman P et al., 2014]. Tuttavia, sembra non influenzare la prognosi dell'FTC. Il riarrangiamento PAX8-PPAR γ è stato identificato nel 30-60% degli FTC [Castro P et al., 2006; Dwight T et al., 2003; Prete A et al., 2020;] e solo nel 38% dei carcinomi papillari variante follicolare (FVPTC) [Castro P et al., 2006]. Inoltre, è stato osservato che nei carcinomi follicolari il riarrangiamento PAX8/PPAR γ è mutuamente esclusivo rispetto alle mutazioni dei geni RAS, anche loro frequentemente ritrovati negli FTC, suggerendo che l'FTC si può sviluppare attraverso due distinte vie molecolari [Nikiforov YE, 2011]. Il rischio riportato di malignità nei FNA preoperatori positivi per riarrangiamenti PAX8/PPAR- γ è dell'84,6-95% [Hlozek J et al., 2022].

1.4.6 Altre mutazioni

Esistono numerose altre mutazioni coinvolte nella tumorigenesi tiroidea. Le mutazioni nel gene che codifica per l'oncosoppressore PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) attraverso l'attivazione della via del segnale PI3K-AKT sono alla base della tumorigenesi tiroidea nell'ambito della sindrome di Cowden [Agarwal S et al., 2022]. Si tratta di una rara sindrome autosomica dominante dovuta ad una mutazione germinale del PTEN che porta allo sviluppo di amartomi multisistemici e oncogenesi. Gli studi condotti hanno, inoltre, dimostrato come i tumori tiroidei possono anche ospitare una sporadica inattivazione del PTEN, secondaria alla delezione, mutazione o metilazione del promotore [Agarwal S et al., 2022]. In un recente studio è stato osservato come l'inattivazione di PTEN fosse più frequente nella variante follicolare

di PTC rispetto al PTC variante classica e a cellule alte [Agarwal S et al., 2022]. I riarrangiamenti NTRK, dovuti alla fusione tra i geni del neurotrophic-tropomyosin receptor kinase (NTRK) con altri geni che codificano per le proteine recettoriali transmembrana TrkA, TrkB, e TrkC hanno un effetto oncogenico tramite una costitutiva attivazione del dominio tirosin-chinasico intracellulare del recettore, che determina proliferazione cellulare e tumorigenesi [Agarwal S et al. 2022]. I geni di fusione NTRK sono descritti nel 5-10% dei PTC, nei bambini e negli adolescenti la prevalenza è di circa il 16%. Il ritrovamento di un gene di fusione NTRK in un campione di tiroide è associato ad un rischio di malignità del 100% [Hlozek J et al. 2022; Nikiforov YE, 2011]. I carcinomi che presentano la fusione NTRK, di solito, mostrano una crescita follicolare e sono associati a tiroidite linfocitica. Inoltre, spesso mostrano un'estesa invasione linfovaskolare, estensione extratiroidea e metastatizzazione linfonodale. Sebbene tali tumori possano sviluppare metastasi a distanza, i tassi di mortalità sono bassi.

Il sequenziamento dell'intero genoma dei tumori tiroidei ha portato all'identificazione di mutazioni driver ricorrenti in regioni regolatorie non codificanti, come i promotori genici, ad esempio le mutazioni di TERT. Il gene TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) codifica per la subunità catalitica dell'enzima telomerasi responsabile dell'allungamento dei telomeri durante la replicazione del DNA [Hlozek J et al., 2022]. Sono state descritte in associazione con questo gene due principali mutazioni puntiformi, C228T e C250T. Le cellule positive per una di queste mutazioni esprimono la telomerasi a un livello maggiore, e quindi mantengono la lunghezza dei telomeri cromosomici e possono proliferare quasi senza limitazioni [Agarwal S et al., 2022]. Le mutazioni di TERT sono associate ad una maggiore incidenza di metastasi locali o a distanza e aggressività del tumore [Agarwal S et al., 2022, Liu X et al., 2013]. Le mutazioni del promotore TERT si verificano nel 10-20% dei DTC (in particolare PTC nelle varianti più aggressive), nel 40% dei PDTC e nel 65% dei ATC [Agarwal S et al., 2022]. Inoltre, la coesistenza della mutazione del promotore TERT con la mutazione BRAF V600E sembra essere associata a una maggiore aggressività dei PTC rispetto a quelli che presentano mutazione di TERT e BRAF singole, indicando un possibile ruolo delle mutazioni di TERT nella progressione e prognosi dei PTC [Agarwal S et al., 2022; Prete A et al., 2020]. Il gene TP53 è un oncosoppressore che regola la crescita cellulare, bloccando il ciclo cellulare nella fase G1 e avviando l'apoptosi in caso di DNA non riparabile [Hlozek J et al., 2022]. Le mutazioni di TP53 sono rilevate in oltre il 75% dei carcinomi tiroidei invasivi e indifferenziati. La

presenza di mutazioni TP53 nei carcinomi differenziati è stata descritto come un possibile segno di successiva dedifferenziazione in ATC [Hlozek J et al., 2022]. Le traslocazioni del gene ALK (Anaplastic lymphoma kinase) sono state indicate come eventi patogeni nei PTC (0–9%), PDTC (0–4%) e ATC (0–4%) [Hlozek J et al., 2022], con dati della letteratura che indicano una maggiore prevalenza nei tumori tiroidei dedifferenziati. Le traslocazioni di ALK sembrano essere più frequenti dopo l'irradiazione, nei PTC di pazienti di sesso femminile e sono stati riportati in modo variabile in età pediatrica e si verificano indipendentemente da altre mutazioni molecolari driver note nei tumori della tiroide [Hlozek J et al., 2022]. Oltre alle traslocazioni, nell'11-20% dei casi sono state riportate anche mutazioni di ALK nell'ATC [Hlozek J et al., 2022], e in questi casi possono essere associate a mutazioni di NF1 e/o TP53.

1.5 Pannelli molecolari

Dai dati presenti in letteratura si può dedurre come la ricerca di singole e poche mutazioni nel campione citologico abbia una sensibilità ed accuratezza diagnostica insufficiente. Per tale motivo la ricerca si è adoperata per lo sviluppo di pannelli di diagnostica molecolare per la valutazione degli FNA. Un approccio iniziale è stato lo sviluppo di un pannello che comprende le più comuni mutazioni di PTC e FTC (BRAF, RAS, RET/PTC e PAX8/PPAR γ). Questo pannello è stato studiato per la prima volta in due studi indipendenti, e poi in un ampio studio prospettico relativo a FNA indeterminati. Nelle lesioni citologicamente indeterminate tale pannello ha mostrato un elevato valore predittivo positivo (PPV) (89%) e specificità (98%), ma la relativa elevata percentuale di falsi negativi (32-43%) ne riduce significativamente la sensibilità (61%) e quindi il valore predittivo negativo (NPV) (89%) [Nikiforov YE et al., 2011]. Pertanto, tale pannello può essere considerato come un test di "rule in" in base al quale il valore predittivo positivo e la specificità per malignità consentono di arruolare i pazienti candidati alla chirurgia quando viene identificata una mutazione. Il tasso di malignità in questo studio era del 24%. L'altro approccio che prende il nome di GEC (Gene Expression Classifier) si basa, invece, sulla misurazione della espressione degli mRNA estratti dai citoaspirati. Questo classificatore di espressione genica ha mostrato una elevata sensibilità e un valore predittivo negativo elevato (93%) con conseguente riduzione del ROM a circa il 5% nei noduli benigni valutati con GEC, che è simile al rischio di lesione tiroidea con citologia da FNA benigna [Alexander EK et al., 2012]. Pertanto, utilizzando questo pannello come test di "rule out" che aiuta nell'individuare i pazienti a basso rischio di malignità,

evitando la valutazione chirurgica. Inoltre, l'avanzamento delle conoscenze della Next Generation Sequencing (NGS), utile per consentire l'analisi di numerosi loci su quantità minime di acidi nucleici, rappresenta una ulteriore migliore integrazione nella valutazione degli FNA tiroidei in aggiunta ai metodi attualmente disponibili clinicamente.

1.6 Test molecolari disponibili in commercio

Ad oggi sono disponibili in commercio tre principali test molecolari per la valutazione dei noduli con citologia indeterminata: ThyroSeq v3 (University of Pittsburgh Medical Center and Sonic Healthcare USA, Rye Brook, NY, USA), ThyGeNEXT and ThyraMIR (Interpace Diagnostics, Parsippany, NJ, USA), and Afirma Gene Sequencing Classifier (GSC) and Xpression Atlas (Veracyte, South San Francisco, CA, USA). Il RosettaGX Reveal (Rosetta Genomics, Inc, Philadelphia, Pennsylvania) è stato recentemente rimosso dal mercato. Ciascuno di questi test per poter ridefinire il rischio di malignità preoperatorio dei noduli a citologia indeterminata si basa da un punto di vista metodologico sulla combinazione tra genotipizzazione e profilo di espressione dei mRNA o miRNA.

1.6.1 ThyroSeq v3

ThyroSeq v3 Genomic Classifier (GC), disponibile per uso clinico dal 2018, è la versione migliorata del precedente ThyroSeq v2 [Nikiforov YE et al 2014; Rossi ED et al., 2022]. I principali vantaggi della nuova versione di questo metodo di "rule-in" sono il maggior numero di mutazioni e fusioni geniche analizzate, l'analisi delle alterazioni del numero di copie del DNA (CNA) e un miglioramento dell'accuratezza per il rilevamento di tumori oncocitari. [Nikiforova MN et al., 2018] ThyroSeq v3 valuta ben 112 geni (compresi tutti i geni testati da ThyroSeq v2) mediante sequenziamento NGS, che, con un'amplificazione mirata, è in grado di rilevare 12.135 variazioni di singolo nucleotide e inserzioni/delezioni, più di 120 tipi di fusione genica, alterazioni anomale dell'espressione genica di 90 geni e alterazioni del numero di copie in 10 regioni genomiche in campioni di agoaspirato [Nikiforova MN et al., 2018; Nishino M et al., 2021]. Le variazioni del numero di copie cromosomiche, sono molto importanti, in quanto queste si riscontrano nel 7% dei carcinomi papillari privi di altre mutazioni e in altri tipi di tumori come i tumori a cellule di Hürthle. In particolare, gli acidi nucleici (DNA e mRNA) utili per il test ThyroSeq vengono isolati dal campione di agoaspirato raccolto in provette contenenti una specifica soluzione di conservazione dell'acido nucleico (collection tubes) fornito dal venditore, preparazioni di blocchi cellulari fissati in

formalina e inclusi in paraffina (FFPE), e più recentemente, da cellule su vetrini a striscio diretto [Nishino M et al., 2021]. Le fasi del controllo di qualità includono l'analisi dell'espressione genica di specifici marcatori per determinare un adeguato contenuto di cellule follicolari tiroidee, nonché marcatori per rilevare il carcinoma midollare della tiroide e i tessuti non tiroidei (ad es. tessuto paratiroideo, carcinoma metastatico) [Nishino M et al., 2021]. Il classificatore genomico (GC) utilizzato dal test si basa su un punteggio da 0 a 2 punti per ogni alterazione genetica, proporzionale alla forza della sua associazione con la malignità tiroidea. I punteggi GC pari a 0 o 1 sono considerati negativi per malignità. Nel dettaglio, un punteggio GC pari a 1 viene segnalato come "attualmente negativo" per indicare i noduli con mutazioni a basso rischio per le quali potrebbe essere considerata la sorveglianza attiva e ripetizione di FNA. Di contro, i punteggi GC ≥ 2 sono considerati positivi. Per i noduli con esito positivo, ThyroSeq v3 fornisce ulteriori informazioni sulla stratificazione del rischio preoperatorio in base al tipo di alterazioni rilevate e in base alla loro frequenza allelica. Il test è stato clinicamente validato in uno studio prospettico, multicentrico, in cieco condotto su 257 citoaspirati da lesioni indeterminate, di cui erano, inoltre, disponibili campioni tissutali per la diagnosi istopatologica. Il test ha mostrato una sensibilità del 94% e una specificità dell'82%, un NPV del 97% e un PPV del 66% nei 247 citoaspirati di classe Bethesda III/IV con una prevalenza di malignità del 28%. La nuova versione del test ha dimostrato una sensibilità migliorata, ma specificità e PPV inferiori rispetto alla versione precedente (ThyroSeq v2; 93% e 83%, rispettivamente) [Nikiforov YE et al., 2014; Steward DL et al., 2019]. ThyroSeq v3 ha dimostrato di essere estremamente utile nell'identificazione dei carcinomi a cellule di Hurthle (NPV: 100%), mentre solo il 43% degli adenomi era correttamente classificato. Gli studi post-validazione sono disponibili solo per il ThyroSeq v2 il quale ha confermato un NPV elevato (94,5%), ma ha riportato percentuali inferiori di sensibilità (87,9%), specificità (71,2%) e PPV (51,2%) rispetto agli studi di validazione [Nikiforov YE et al., 2014; Nikiforov YE., et al 2015, Rossi ED et al., 2022].

1.6.2 ThyGeNEXT/ThyraMIR

ThyGeNEXT è un test NGS, sviluppato da Interspace Diagnostics, e mirato alla ricerca di mutazioni in 10 geni (BRAF, H-RAS, K-RAS e N-RAS, TERT, ALK, GNAS, RET, PTEN e PIK3CA) e di 38 diverse fusioni geniche (comprese ALK, BRAF, NTRK-1, -2 e -3, PPAR γ , RET, e THADA) associate al carcinoma della tiroide. Per migliorarne la sensibilità e il NPV tale test è stato associato ad un secondo test noto come ThyraMIR,

un classificatore che misura i livelli di espressione di 10 microRNA (miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, miR-551b-3p) mediante Real-Time PCR quantitativa [Nishino M et al., 2021; Rossi ED et al., 2022]. 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 [Nishino M et al., 2021]. Campioni per i quali non vengono rilevate nessuna mutazione o fusione genica nel test di sequenziamento mirato, subiscono una ulteriore stratificazione del rischio con ThyraMIR. Il test include l'analisi dell'espressione dei trascritti utili per confermare un contenuto adeguato di cellule follicolari tiroidee e rilevare il campionamento di tessuto paratiroideo e dei marcatori associati a carcinoma midollare della tiroide (mutazioni miR-375 e RET). Il test combinato è stato validato clinicamente utilizzando una versione precedente del test basato su NGS chiamato ThyGenX, che analizza 7 geni (geni BRAF, H-RAS, K-RAS e N-RAS) e 3 fusioni geniche (PAX8-PPARG, RET-PTC1 e RET-PTC3) condotto su 109 FNA classificati come Bethesda III/IV. ThyGenX/ ThyraMIR hanno dimostrato una sensibilità dell'89%, specificità 85%, NPV 94% e PPV 74%. Sono sicuramente necessari ulteriori studi post-validazione per determinare meglio l'accuratezza di ThyGeNEXT/ThyraMIR.

1.6.3 Afirma GSC and Xpression Atlas

Afirma Gene Expression Classifier (GEC, Veracyte) è un test basato su microarray che utilizza un algoritmo proprietario per predire le lesioni benigne (test di “rule out”). L'algoritmo prevede due passaggi. Nel primo passaggio viene valutata l'espressione di 25 geni per identificare neoplasie rare come il carcinoma midollare tiroideo. Il secondo passaggio, a cui accedono solo i campioni non esclusi, valuta il profilo dell'espressione di ulteriori 142 geni al fine di classificare i noduli con citologia indeterminata in due categorie: noduli benigni (GEC-B) o sospetti (GEC-S). Il test è stato validato in uno studio multicentrico, prospettico, in cieco condotto su 210 noduli classificati come noduli indeterminati Bethesda III/IV, con un tasso di malignità pre-test rispettivamente del 24 e del 25%. Lo studio ha mostrato come il test abbia un'elevata sensibilità (87%), ma una specificità modesta (53%); il NPV e il PPV erano 95% e 94% e 38% e 37% rispettivamente nelle due categorie. Uno studio post-validazione ha, di contro, registrato un'alta frequenza di risultati falsi negativi [Muzza M et al., 2020; Nishino M et al., 2021; Rossi ED et al., 2022]. È opportuno dire che l'interpretazione dei risultati sopra

menzionati richiede cautela a causa della piccola quota di noduli GEC-B indirizzati alla chirurgia nella pratica clinica. Inoltre, i noduli benigni a cellule di Hürthle, che rappresentano una grande proporzione delle categorie Bethesda III/IV, sono spesso erroneamente classificati come GEC-S. Una metanalisi di tutti gli studi disponibili su Afirma e con diagnosi istologica disponibile ha mostrato una sensibilità del 95,7%, specificità 16,4%, PPV 37,6%, e NPV del 87.7% [Muzza M et al. 2020]. Per superare la modesta specificità e il ridotto PPV di GEC, è stato introdotto il test Afirma BRAF, che analizza il profilo di espressione insieme alla mutazione di BRAF V600E [Muzza M et al., 2020; Nishino M et al., 2021; Rossi ED et al., 2022]. Tuttavia, l'indagine sulla mutazione BRAF non ha aumentato il PPV, principalmente a causa della bassa prevalenza di varianti classiche di PTC nei noduli Bethesda III e IV. Recentemente è stato introdotto Afirma Genomic Sequencing Classifier (GSC), che stratifica il rischio di malignità dei citoaspirati in base al profilo di espressione di 1115 geni principali mediante metodologia RNA-Seq; la misurazione dei livelli di espressione dei restanti 9000 geni circa serve per fornire stabilità al modello di classificazione. Nel pannello di test di GSC sono state aggiunte le trascrizioni mitocondriali e le CNA nel tentativo di migliorare la stratificazione del rischio delle lesioni a cellule di Hürthle [Muzza M et al. ,2020; Nishino M et al., 2021; Rossi ED et al., 2022]. L'applicazione di Afirma GSC richiede, oltre al materiale cellulare raccolto per la valutazione citologica di routine, citoaspirazioni dedicate il cui materiale deve essere raccolto in provette che contengono un conservante specifico per l'acido nucleico. L'GSC comprende diverse fasi di controllo della qualità, come ad esempio lo screening per il profilo di espressione delle cellule delle paratiroidi e la valutazione del contenuto di cellule follicolari. Gli aspirati che presentano un profilo di espressione compatibile con il campionamento di tessuto paratiroideo o carcinoma midollare (test Afirma MTC) vengono classificati come tali e non richiedono ulteriori test. Allo stesso modo, il riscontro di un profilo di espressione associato a mutazione BRAF V600E (test Afirma BRAF) e rilevamento delle fusioni del gene RET-PTC1 o RET-PTC3 sono altamente specifici per il carcinoma papillare e non richiedono ulteriori analisi da parte del GSC. Per i campioni rimanenti, che risultano negativi per i marcatori di cui sopra e che presentano un contenuto adeguato di cellule follicolari tiroidee, l'algoritmo di GSC classifica ciascun campione come avente un profilo di espressione "Benigno" o "Sospetto". Il GSC è stato validato sulla stessa coorte utilizzata per la prima generazione Afirma GEC ed ha mostrato una maggiore specificità (dal 53 al 68%) e PPV (dal 38 al 47%) pur mantenendo alta sensibilità e NPV. Inoltre, GSC ha mostrato una

specificità e un PPV più elevati per gli adenomi a cellule di Hürthle rispetto a GEC. Studi indipendenti che mettevano a confronto GSC e GEC hanno confermato tali risultati [Muzza M et al., 2020; Nishino M et al., 2021; Rossi ED et al., 2022]. È stato, inoltre, ideato un pannello più ampio (Xpression Atlas) per rilevare ulteriori alterazioni coinvolte nelle neoplasie tiroidee (761 varianti in 346 geni e 130 fusioni) [Angell TE et al., 2019]. È importante notare come, sia in GSC che in Xpression Atlas, le mutazioni nella porzione non trascritta del genoma, come ad esempio il promotore TERT, non sono inclusi [Nishino M et al., 2021]. Xpression Atlas è destinato ai noduli Bethesda III/IV con risultato sospetto per GSC (GSC-S). Tuttavia, l'impatto relativo a questo nuovo pannello sul miglioramento della stratificazione del rischio dei noduli tiroidei deve ancora essere stabilito.

2. MicroRNA

Nell'ambito delle indagini molecolari volte al miglioramento dell'accuratezza diagnostica dei FNA l'attenzione si è recentemente spostata sulla valutazione del potenziale ruolo dei miRNA come biomarcatori tumorali. I microRNA (miRNA o miR) sono una importante classe di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento, contenenti da 18 a 25 nucleotidi, altamente conservati tra le diverse specie, coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. Tali molecole sono state scoperte per la prima volta nel 1993 nel *Caenorhabditis elegans* e successivamente sono state rilevate nel genoma della maggior parte degli organismi complessi [Bartel D, 2009; Lee RC et al., 2005] Ad oggi, nel genoma umano sono state identificate più di 2500 sequenze di miRNA maturi e registrate nel database miRBase Release 21 e il numero è rapidamente ed esponenzialmente in crescita [Kozomara A et al., 2014]. Sebbene i miRNA costituiscano solo il 3% del genoma umano, si ipotizza che essi regolino complessivamente fino al 30% del genoma umano.

2.1 Biogenesi e funzioni dei microRNA

La biogenesi dei miRNA consiste in un processo multifasico di scissione enzimatica attraverso il quale dall'RNA a doppio filamento (dsRNA) si genera un miRNA maturo a singolo filamento [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. Tale processo inizia nel nucleo dove i geni codificanti per i miRNA sono trascritti ad opera di una RNA polimerasi II in un lungo trascritto primario a doppio filamento chiamato pri-miRNA. L'RNA polimerasi III Drosha, col cofattore enzimatico DGCR8 (DiGeorge critical region 8), processa il pri-miRNA in un precursore più corto, a due filamenti, contenente all'incirca

70 nucleotidi, detto pre-miRNA, il quale viene traslocato dal nucleo al citoplasma ad opera della esportina 5 (XPO5). A questo livello il pre-miRNA viene ulteriormente clivato dall'endonucleasi DICER in un miRNA a doppio filamento (miRNA duplex) di circa 22 nucleotidi. Tale doppio filamento viene srotolato e uno dei filamenti viene incorporato nel cosiddetto RISC (RNA induced silencing complex) che media l'interazione tra il miRNA e l'mRNA bersaglio, l'altro filamento viene, invece, degradato [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. I miRNA maturi si legano all'estremità 3'-UTR dell'mRNA per mezzo della "seed region", una sequenza conservata di circa 7 nucleotidi, che si trova principalmente nelle posizioni 2-7 dell'estremità 5' del miRNA [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. In particolare, i miRNA influenzano l'espressione genica attraverso due diversi meccanismi: degradazione dell'mRNA o blocco nella traduzione. L'identità dell'mRNA bersaglio e il grado della omologia di sequenza miR-mRNA (complementarità) determina il meccanismo utilizzato. Se l'mRNA bersaglio ha una complementarità sufficiente al miRNA, sarà specificamente scisso dal miRNA e dal complesso proteico di accompagnamento. Di contro, se il livello minimo di complementarità non esiste il miRNA reprimerà la traduzione dell'mRNA. Poiché la specificità dei miRNA è dettata dalla "seed region", un singolo miRNA può legarsi con diversi mRNA e può, quindi, potenzialmente regolare centinaia di geni e di contro un singolo gene potrebbe essere un potenziale bersaglio di diversi miRNA [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. Tale diversità consente ai miRNA di agire come regolatori di numerosi meccanismi cellulari, in parte ancora da chiarire. Essi sono coinvolti nella regolazione di quasi tutti i processi biologici, inclusa la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'apoptosi, l'emopoiesi, le risposte allo stress e il metabolismo [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. Studi recenti hanno, inoltre, dimostrato come alcuni miRNA svolgano un ruolo nella differenziazione delle cellule immunitarie e nelle risposte immunitarie, rendendole molto rilevanti per la progressione di molte malattie, inclusi i tumori [Ludvíková M et al, 2015; Mazeh H, 2012]. Inoltre, è stato dimostrato che le molecole di miRNA agiscono sia come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica che come messaggeri della segnalazione intercellulare. I miRNA, oltre a presentare una espressione tessuto-specifica [Decmann Á et al., 2017], si possono riscontrare anche nel sangue come componenti di siero, plasma, cellule mononucleate e in altri fluidi corporei (es. urina, sperma, saliva, lacrime, liquido ascitico, liquido amniotico e latte materno) [Hanson EK et al., 2009; Swarup V et al., 2007]. Le molecole di miRNA circolanti sono molto stabili nel plasma sanguigno e nel siero dal momento che sono

incorporate in microparticelle, come esosomi e corpi apoptotici [Raposo Get al., 2013; Wittmann Jet al.,2010]. Le analisi biochimiche hanno rivelato che i miRNA sono resistenti all'attività della RNasi, nonché alla temperatura e a pH estremamente acidi e alcalini [Chen X et al., 2008; Zhang Y et al., 2017].

2.2 MicroRNA e cancerogenesi

La deregolazione dei miRNA, a causa della loro espressione anomala (sovra o sottoespressione), è stata associata a molte condizioni patologiche specifiche, come le patologie cardiovascolari [Sayed ASM et al., 2015], i disordini neurologici [Kumar P et al., 2013], le patologie metaboliche [Rong Y et al., 2013] e il cancro [Barbarotto E et al., 2007; Gilad S et al., 2008]. Diversi studi hanno dimostrato come esistano importanti differenze nel profilo di espressione dei miRNA nei tumori rispetto ai tessuti normali, suggerendo come tali molecole abbiano un ruolo chiave nella cancerogenesi. Per tale motivo è cresciuto l'interesse nei confronti dei miRNA come biomarcatori tumorali con potenziale ruolo diagnostico, prognostico e predittivo. Molteplici sono meccanismi che sottendono alla deregolazione del profilo di espressione dei miRNA nei carcinomi umani, ad esempio, l'amplificazione o la delezione dei geni che codificano per i miRNA, l'anomalo controllo trascrizionale dei miRNA, i cambiamenti epigenetici e i difetti nel meccanismo di maturazione dei miRNA. È stato dimostrato come la sovra-espressione di miRNA specifici può provocare la repressione dei geni oncosoppressori e la sotto-espressione di miRNA specifici può portare ad una maggiore espressione di oncogeni. La conseguenza di entrambi gli eventi è l'alterazione della sopravvivenza, proliferazione e apoptosi cellulare, con conseguente crescita e progressione del tumore (Figura 3). È importante notare che i miRNA non sono sempre classificati come soppressori tumorali o come oncogeni; la loro classificazione dipende dal contesto specifico del tessuto o del tipo di cellula in cui sono espressi [Ludvíková M et al., 2015; Mazeh H, 2012]. I miRNA sono altamente specifici per tipo cellulare e/o patologia, relativamente stabili per via della loro lunghezza e quindi possono essere rilevati e misurati in maniera affidabile in vari materiali biologici, tra cui campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina o il siero. La disponibilità della NGS ad alto rendimento ha, inoltre, fatto in modo che i miRNA possano essere rilevati in modo più abbondante e differenziale dal controllo rispetto ai pannelli miRNA microarray, Northern blot, TaqMan microRNA Assay Human, e confermati da saggi qRT-PCR.

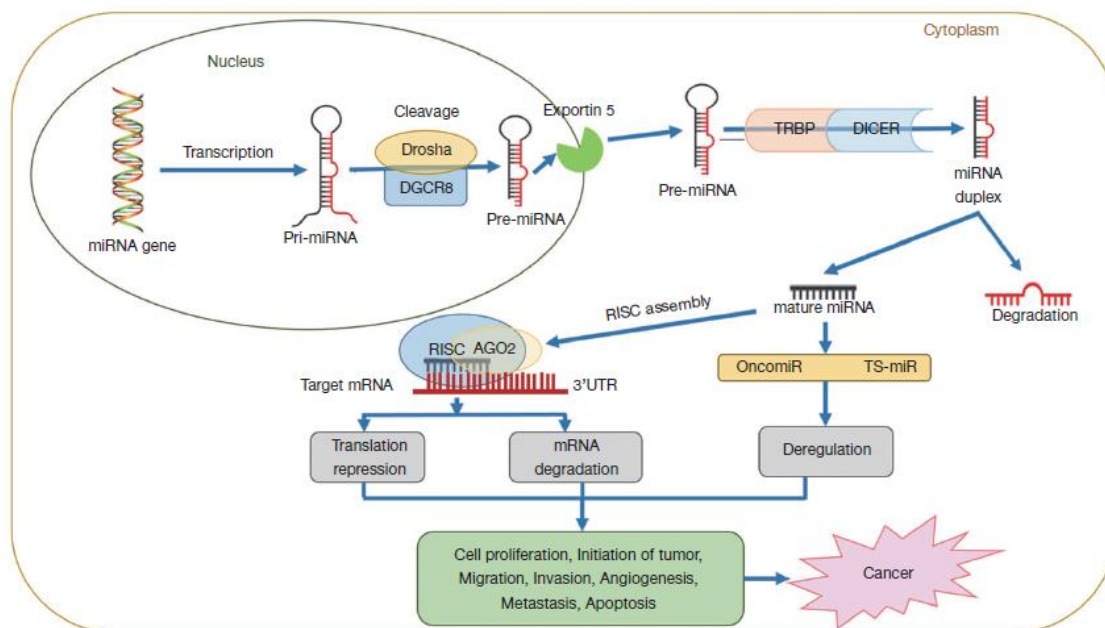


Figura 3 Biogenesi dei microRNA e loro implicazione nello sviluppo del cancro (Sharma PC et al., 2020)

2.3 Ruolo dei microRNA nei carcinomi differenziati della tiroide

La relazione tra deregolazione dei miRNA e cancro è stata riconosciuta nel 2002 [Calin GA et al., 2002], ma i primi dati relativi al ruolo dei miRNA nella tumorigenesi tiroidea sono state pubblicati nel 2005 [He H et al., 2005]. Il profilo di espressione dei miRNA presenta una variabilità significativa tra i diversi tipi di tumore della tiroide, anche quando provengono dallo stesso tipo di cellule tiroidee [Nikiforova MN et al., 2009a; Nikiforova MN et al., 2008]. Gli studi hanno dimostrato come il carcinoma midollare della tiroide, derivato dalle cellule parafollicolari C, presenti un profilo di espressione dei miRNA significativamente diverso dai DTC. Allo stesso modo, sebbene i carcinomi papillari, gli adenomi e i carcinomi follicolari e gli adenomi e carcinomi follicolari oncocitici originano tutti da cellule follicolari, tuttavia mostrano profili di espressione di miRNA diversi e distinti [Santiago K et al., 2020]. Sebbene il ruolo biologico dei miRNA nella cancerogenesi tiroidea sia ancora tutto da studiare, la valutazione dello specifico profilo di espressione dei miRNA nei tumori tiroidei rispetto al tessuto tiroideo normale e nei diversi istotipi di tumore tiroideo può avere implicazioni diagnostiche, soprattutto per quel che concerne la loro classificazione, e terapeutiche. Inoltre, l'analisi dei livelli di espressione dei miRNA e il rilevamento dei miRNA circolanti possono essere utilizzati per la diagnosi precoce di tumore della tiroide e per il monitoraggio delle risposte al trattamento [Santiago K et al., 2020]. Ad oggi, sono in corso numerosi studi per utilizzare

i miRNA come potenziali biomarcatori per la valutazione della diagnosi, la prognosi, e dei bersagli terapeutici del tumore della tiroide; questi necessitano, tuttavia, di ulteriore convalida in studi più ampi.

2.4 Ruolo dei microRNA nel PTC e FTC

I dati della letteratura hanno evidenziato come diversi miRNA risultino deregolati (sovra o sottoespressi) tanto nei PTC quanto negli FTC (figura 4) [Papaioannou M et al., 2022; Rogucki M et al., 2021; Santiago K et al., 2020]. Alcuni miRNA, come il miR-146b, miR-221, miR-222 e miR-181b, sembrano essere costantemente sovraregolati nei PTC rispetto al tessuto tiroideo non neoplastico. I miR-146a e il miR-146b hanno un effetto modulatore sul sistema immunitario e riducono l'espressione genica post-trascrizionale. Uno studio ha dimostrato come nel PTC l'espressione del miR-146b sia circa 28.9 volte maggiore rispetto al tessuto tiroideo non neoplastico, dato confermato da numerosi studi successivi [Santiago K et al., 2020]. Dai dati presenti in letteratura appare evidente come miR-146b abbia un ruolo importante nei processi di migrazione, invasione, proliferazione, regolazione del ciclo cellulare e resistenza alla chemioterapia nelle cellule con mutazione di BRAF [Santiago K et al., 2020]. La deregolazione di miR-146b aumenta il rischio di angioinvasione, infiltrazione capsulare e metastasi ai linfonodi e a distanza che determinano una peggiore prognosi di sopravvivenza [Papaioannou M et al., 2022, Rogucki M et al., 2021]. Dal punto di vista clinico diventa ancora più rilevante come un aumento dell'espressione del miR-146b determini una prognosi peggiore nei pazienti con PTC [Rogucki M et al., 2021]. I miR-221 e miR-222, che presentano una elevata omologia, hanno un importante impatto sullo sviluppo di diversi tumori, incluso il carcinoma della tiroide. Uno studio ha dimostrato come il miR-221 promuova l'invasività delle cellule dei PTC inibendo la trascrizione di RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs), un oncosoppressore con un ruolo chiave nel processo di metastatizzazione dal momento che agisce bloccando la trasformazione epiteliale-mesenchimale [Rogucki M et al., 2021]. Gli studi presenti in letteratura riportano come sia il miR-221 che il miR-222 determinino una significativa inibizione della p27, un oncosoppressore tumorale e regolatore del ciclo cellulare, in molti tumori, compreso il tumore della tiroide. D'altra parte, diversi studi hanno riportato una significativa sottoespressione di p27 nel PTC rispetto al normale tessuto tiroideo. La ridotta espressione di p27 nei PTC a causa della sovraespressione di miR-221 e miR-222 potrebbe spiegare il tasso di proliferazione osservato nelle cellule PTC. Molti altri studi

hanno confermato come una sovraespressione di miR-221 e miR-222 siano associate a dimensioni tumorali maggiori, oltre che ad una più spiccata tendenza del tumore a infiltrarsi nei vasi sanguigni dei tessuti circostanti, determinando una maggiore probabilità di metastasi linfonodali e a distanza [Papaioannou M et al., 2022, Rogucki M et al., 2021; Santiago K et al., 2020]. Inoltre, uno studio ha messo in evidenza come la sovraespressione di miR-221 dovrebbe essere considerata come un fattore di rischio di ricorrenza di PTC [Rogucki M et al., 2021]. Anche l'espressione del miR-181b risulta aumentata nelle cellule di PTC. In particolare, gli studi che hanno indagato il meccanismo attraverso cui miR-181b determina la trasformazione cellulare e lo sviluppo del tumore hanno mostrato che questo presenta come bersaglio la CYLD (lysine 63 deubiquitinase) inibendone l'espressione. La CYLD è sottoespressa in diversi tumori e inibisce il pathway NFκB, oltre ad indurre l'apoptosi cellulare [Papaioannou M et al., 2022; Rogucki M et al., 2021]. Inoltre, è stato dimostrato come l'espressione di miR-181b era quasi 8 volte superiore nel tessuto tumorale rispetto all'espressione nel tessuto tiroideo normale [Papaioannou M et al., 2022, Rogucki M et al.; 2021]. Infine, la sovraespressione di miR-181b aumenta significativamente il rischio di recidiva tumorale e di sviluppo di metastasi linfonodali [Papaioannou M et al., 2022]. Esiste, inoltre, un numero di miRNA la cui espressione è sottoregolata tanto nelle linee cellulari quanto nei campioni di PTC e che influenza l'espressione genica e diversi processi cellulari. La sottoregolazione del miR-144, che ha come gene bersaglio WWTR1 (WW domain-containing transcription regulator 1) attraverso il quale inibisce la proliferazione cellulare, sembra essere associata con dimensioni tumorali maggiori nei PTC [Papaioannou M et al., 2022]. Anche il miR-451a, il cui bersaglio molecolare è rappresentato da MIF, c-MYC e AKT1 e che agisce sulla via del segnale Akt/mTOR, risulta sottoespresso nel tessuto tumorale del PTC e associato a caratteristiche clinico-patologiche più aggressive, alla variante a cellule alte di PTC, estensione extratiroidea e stadio tumorale più avanzato [Papaioannou M et al., 2022]. I miRNA della famiglia Let sono ampiamente coinvolti nello sviluppo di PTC. A differenza di let-7b e let-7c che sono sovraregolati, l'espressione di let-7f, -7d, e -7g risulta ridotta nei campioni di PTC. Il bersaglio di let-7f sembra essere la via del segnale MAPK/ ERK [Papaioannou M et al., 2022].

Relativamente al profilo di espressione dei miRNA nell' FTC sono disponibili dati limitati. A differenza che nel PTC, gli adenomi e i carcinomi follicolari presentano meccanismi molecolari simili nel processo di tumorigenesi. Mentre in diversi studi è stato

dimostrato come il profilo di espressione di mRNA/miRNA delle neoplasie follicolari differisca da quello dei carcinomi papillari, di contro i marcatori molecolari che distinguono chiaramente adenoma e carcinoma follicolare necessitano di ulteriori validazioni in studi più ampi. In uno studio è stato dimostrato come i miR-21 e miR-181a-5p, che sono miRNA esosomiali, possono differenziare gli FTC dai PTC con una sensibilità del 100% e una specificità del 77% [Samsonov R et al, 2016]. L'espressione di miR-197 e miR-346 è significativamente più alta nel carcinoma follicolare rispetto all'adenoma follicolare [Santiago K et al., 2020]. In una metanalisi miR-637, miR-181c-3p, miR-206 e miR-7-5p si sono rivelati potenziali biomarcatori de novo di FTC; in particolare miR-7-5p ha mostrato una potenziale capacità di distinguere tra tessuto tiroideo benigno e maligno in diversi studi pubblicati [Santiago K et al., 2020]. In uno studio Stokowy e colleghi hanno trovato due classificatori miRNA, miR-484 e miR-148b3p, e hanno così distinto gli FTC negativi per mutazione dagli adenomi tiroidei follicolari con una sensibilità e specificità rispettivamente dell'89% e 87% [Santiago K et al., 2020]. In un altro studio lo stesso autore ha trovato due diversi classificatori di miRNA costituiti da miR-7-5p e miR-7-2-3p per distinguere PTC e FTC dalle masse tiroidee benigne. Questi due classificatori avevano una sensibilità e specificità rispettivamente dell'82% e del 49% [Santiago K et al., 2020]. Anche i miR-146b, miR-183 e miR-221 (che sono deregolati anche nei PTC) risultano sovraregolati e miR-199b sottoregolato negli FTC rispetto alle cellule tiroidee normali [Wojtas B et al., 2014]. La variante follicolare del carcinoma papillare della tiroide è la variante più comune di PTC e viene diagnosticata in circa 15–30% dei PTC e presenta caratteristiche cliniche, morfologiche e genetiche sia del FTC che del PTC. Nella pratica clinica risulta di notevole importanza distinguere tra FTC e FVPTC. Sebbene la deregolazione dei miRNA sia stata ampiamente studiata nei PTC e FTC, ad oggi, in letteratura sono disponibili dati limitati relativamente all'FVPTC. Uno studio ha dimostrato come, nonostante PTC classico e FVPTC abbiano mostrato elevata somiglianza nell'espressione dei miRNA, il miR-375 è altamente sovraregolato negli FVPTC e in misura minore nella variante classica di PTC, ma non in FTC, nodulo iperplastico o tiroide normale [Dettmer MS et al., 2014]. Inoltre, sembra che i miR-181a-2-3p e miR-99b-3p possano predire la sopravvivenza libera da recidiva nei pazienti con FVPTC e, quindi, il loro studio potrebbe potenzialmente avere un ruolo diagnostico e predittivo [Santiago K et al., 2020].

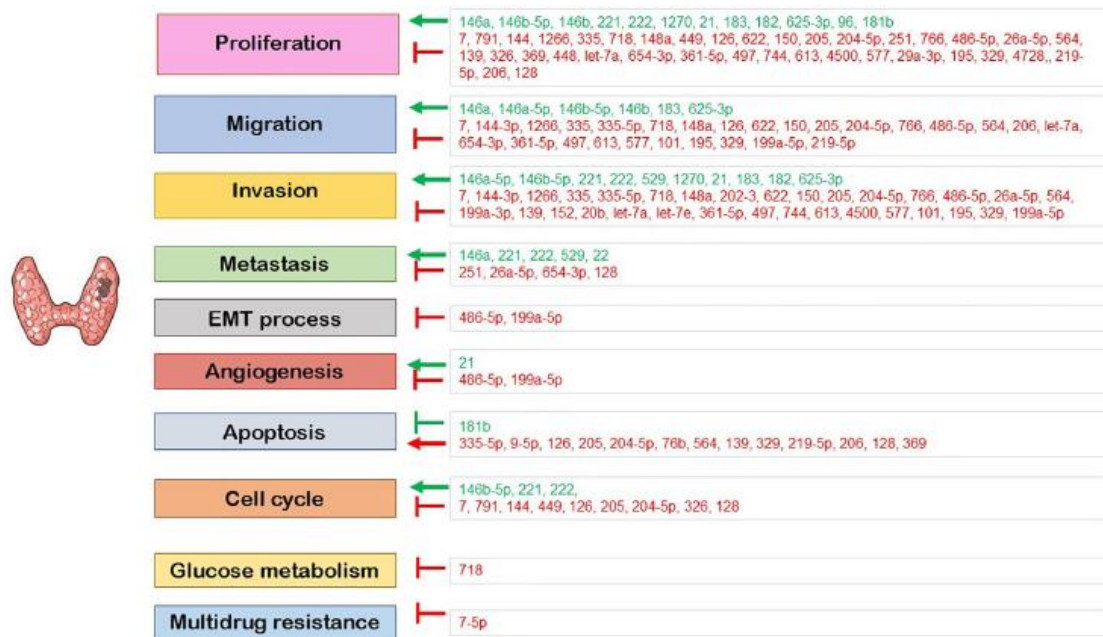


Figura 4 Ruolo dei miRNA deregolati nei processi cellulari. EMT: trasformazione epitelio-mesenchimale. In rosso: miRNA sottoregolati; in verde: miRNAsovraregolati; →: induzione; ←: inibizione (Papaioannou M et al., 2022)

2.5 Ruolo diagnostico dei microRNA su agoaspirato tiroideo

Gli studi iniziali relativi alla valutazione del profilo di espressione dei miRNA su FNA tiroidei si sono concentrati sulla distinzione tra lesioni tiroidee maligne e benigne in generale e hanno documentato un pannello di miRNA significativamente sovraespresso nel tumore della tiroide rispetto alle cellule benigne. Tale pannello è rappresentato dai miR-221, miR-222 e miR-146b, tutti coinvolti nella regolazione dell'oncogene KIT responsabile della crescita e differenziazione cellulare [He H et al. 2005]. Lo studio di Pallante e colleghi ha documentato una sovraespressione significativa di miR-221, miR-222 e miR-181b in campioni di FNA derivati da PTC rispetto alle cellule tiroidee normali [Pallante P et al., 2005]. Un successivo studio ha provato come gli stessi miRNA erano espressi in modo significativamente differenziale tra 20 tumori tiroidei benigni e 20 maligni su campioni di FNA ex vivo [Chen YT et al., 2008]. In questo, studio, inoltre, è stato documentato come i miR-221 e miR-222 erano significativamente differenti solo tra PTC e adenoma follicolare ma non tra PTC e nodulo iperplastico [Chen YT et al., 2008]. Mazeh e colleghi hanno, invece, trovato che i miRNA più accurati per le lesioni maligne erano miR-146b, miR-221 e miR-222, con un tasso di accuratezza rispettivamente del 96%, 98% e 92% [Mazeh H et al., 2011]. Nello studio di Nikiforova e colleghi è stata

valutata la profilazione dei miRNA utilizzando una sonda progettata per rilevare 158 miRNA umani e sono stati analizzati i livelli di espressione dei miRNA sia nei tumori tiroidei che nel tessuto tiroideo normale. Questo studio ha portato alla selezione di una serie di sette miRNA (miR-187, miR-221, miR-222, miR-146b, miR-155, miR-224 e miR-197) che mostravano una maggiore accuratezza nella differenziazione tra carcinoma della tiroide e noduli iperplastici. Il gruppo di lavoro ha quindi applicato questo set ad un campione di test per la convalida in 62 pazienti consecutivi sottoposti a FNA di un nodulo tiroideo. Sfortunatamente, i dati non possono essere completamente validati, poiché solo 13 su 62 pazienti sono stati sottoposti a intervento chirurgico e quindi hanno avuto una diagnosi istologica [Nikiforova MN et al., 2008]. Inoltre, la chiara distinzione tra i noduli maligni (categoria Bethesda VI) e benigni (Bethesda II) è ottenuta con un'accuratezza estremamente elevata mediante la sola valutazione citologica, senza la necessità di implementare la diagnostica molecolare. Gli studi successivi si sono focalizzati sul profilo di espressione dei miRNA sui noduli a citologia indeterminata. Vriens e colleghi, dopo aver valutato l'espressione di 850 miRNA su 104 campioni di tessuto benigno e maligno, hanno identificato quattro miRNA espressi in modo significativamente differente tra lesioni maligne e benigne (miR-100, miR-125b, miR-138 e miR-768-3p). I risultati sono stati validati su 125 campioni di FNA indeterminati, di cui 37 si sono rivelati maligni alla valutazione istologica. In questo studio, miR-138 ha mostrato un'accuratezza del 75% nel distinguere tra noduli indeterminati benigni e maligni. Tuttavia, l'NPV era dell'81%, il che significa che questo test non può essere utilizzato per escludere la malignità [Vriens MR et al., 2012]. In uno studio condotto su FNA ex vivo in 29 noduli tiroidei con citologia indeterminata, 14 dei quali erano maligni all'istopatologia finale, gli autori hanno eseguito un'analisi mirata dell'espressione di determinati miRNA noti per essere deregolati nelle lesioni tiroidee maligne rispetto a quelle benigne (miR-222, miR-181, miR-146b, miR-328, miR-197 e miR-21). In questo studio sono stati utilizzati modelli statistici atti a determinare quale set di miRNA potesse avere la massima accuratezza diagnostica. Gli autori hanno, quindi, trovato un set di quattro miRNA (miR-222, miR-328, miR-197 e miR-21) che presentava un'accuratezza dell'86% nel set di training e un'accuratezza del 90% nel set di convalida di 72 campioni di FNA tiroidei indeterminati [Keutgen XM et al., 2012]. Agretti e colleghi hanno, invece, analizzato il profilo di espressione dei miR-146b, miR-155 e miR-221 provando che il modello usato era valido solo in 31 dei 53 noduli indeterminati (59%), con riscontro di 16 falsi positivi (30%) e 6 falsi negativi (11%). I risultati di questo studio hanno, dunque, dimostrato come il profilo di espressione

di questi tre miRNA possa essere utile per discriminare i noduli benigni dai carcinomi papillari, ma di contro questo mostra una sensibilità e specificità limitata nel gruppo delle lesioni indeterminate [Agretti P et al., 2012]. In un altro studio, è stata valutata l'espressione di un pannello di miRNA, inclusi miR-21, miR-31, miR-146b, miR-187, miR-221 e miR-222, in una serie di 77 FNA tiroidei. L'analisi ha incluso solo 11 dei 77 campioni raccolti, caratterizzati da citologia indeterminata e con dati istopatologici finali disponibili. Sebbene gli autori descrivano un'accuratezza molto elevata per il test (90%, con specificità del 100% e PPV del 100%), la piccola dimensione del campione dello studio non consente una conclusione forte. Inoltre, l'elevato PPV in questo studio è molto probabilmente un riflesso della prevalenza del tumore della tiroide in questa coorte che è dell'81% (9/11 pazienti) [Mazeh H et al., 2013]. Kitano e colleghi hanno analizzato i livelli di espressione di quattro miRNA (miR-7, miR-126, miR-374a e miR-let-7g) in 95 campioni di FNA di categoria Bethesda I-VI come set di training e 59 campioni di FNA nel set di convalida. L'applicazione del modello su campioni di FNA non soddisfacenti e indeterminati (47/95 nel set di studio e 24/59 nei FNA di convalida) ha prodotto una sensibilità del 100%, una specificità del 20%, PPV del 25% e NPV del 100%, suggerendo che miR-7 e miR-126, significativamente differenti tra tumori benigni e maligni, possono essere usati come test di "rule out" per evitare la tiroidectomia diagnostica [Rossi ED et al., 2018]. Un altro studio ha analizzato otto miRNA con associazioni ben consolidate con il carcinoma della tiroide (miR-146b, miR-221, miR-187, miR-197, miR-346, miR-30d, miR-138 e miR-302c) su 60 campioni di FNA indeterminati. Sulla base di questa analisi, un insieme di quattro miRNA- miR-146b, miR-221, miR-187 sovraregolati e miR-30d sottoregolato- ha predetto correttamente la diagnosi istologica in 56 casi su 60. L'accuratezza diagnostica era del 93,3%, mentre la sensibilità e la specificità erano rispettivamente del 93,2% e del 93,8%. Tuttavia, nel campione di validazione che includeva 30 casi AUS/FLUS, l'accuratezza diagnostica era ridotta (73,3%), con una sensibilità del 63,6%, una specificità del 78,9%, PPV del 64% e NPV del 79%. Il metodo di previsione dei miRNA in questo studio era accurato per i casi di carcinoma papillare della tiroide, con tassi di previsione maligna di 35/36 (97,2%) e 34/36 (94,4%) rispettivamente nei set di campioni di training e convalida. Sfortunatamente, i tassi di previsione di malignità per FTC erano relativamente bassi - 4 su 5 (80%) nel set di campioni di training 5 su 8 (62,5%) nel set di campioni di convalida - suggerendo che questo profilo di miRNA non è utile per discriminare tra adenoma follicolare e FTC [Shen R et al., 2012]. Uno studio italiano ha documentato il ruolo di miR-375 in una serie cito-

istologica di 27 FN, inclusi AUS/FLUS e FN, processati con LBC. Come specificato nei loro risultati, miR-375 era sovraespresso in tutti le FN associate ad un'istologia maligna [Rossi ED et al., 2016]. In particolare, Rossi e colleghi hanno concluso che vi era una perfetta correlazione tra l'esito istologico e l'espressione di miR-375 nelle diverse categorie di proliferazioni indeterminate [Rossi ED et al., 2016]. Alla comparazione con i limitati studi presenti in letteratura relativi all'espressione dei miRNA nelle FN, i dati di questo studio hanno dimostrato una maggiore accuratezza diagnostica, sensibilità e specificità rispetto a quelli riportati sia da Agretti e colleghi nelle loro 53 FN che da Shen e colleghi nei casi di AUS/FLUS [Rossi ED et al., 2016]. Nello studio è stato, infatti, riscontrato un solo caso falso negativo rispetto ai 16 casi falsi positivi e ai 6 casi falsi negativi riscontrati nello studio di Agretti e colleghi [Rossi ED et al., 2016]. Dunque, l'elevata sensibilità (97,1%) e PPV (100%) nelle FN suggerisce come miR-375 sembra avere un ruolo concreto come marcatore aggiuntivo promettente nella discriminazione preoperatoria di FN benigna e maligna. Alcuni autori hanno proposto l'applicazione di algoritmi basati sulla combinazione di marcatori immunoistochimici, mutazioni somatiche, e/o riarrangiamenti e i miRNA per la gestione dei pazienti con noduli indeterminati. Paskaš e colleghi hanno proposto un modello predittivo per le FN basato sulla valutazione delle combinazioni della mutazione di BRAF V600E, Galectina-3 e i miR-221 e miR-222 [Paskaš S et al., 2015]. L'algoritmo applicato a 120 campioni di tessuto tiroideo consentiva di classificare 62 campioni come benigni e quindi ridurre di circa metà il numero delle tiroidectomie non necessarie con una specificità del 89,9% e una accuratezza diagnostica del 75,7% [Paskaš S et al., 2015]. Labourier e colleghi hanno combinato il test mutazionale a sette geni con l'espressione di un set di 10 miRNA in campioni di FNA preoperatori da 109 pazienti con citologia AUS/FLUS o FN/SFN e ha osservato una sensibilità dell'89% e una specificità dell'85% con un 73% PPV, 94% NPV e il 32% di prevalenza di malignità [Labourier E et al., 2015]. Attualmente non esiste un test di miRNA convalidato disponibile nella pratica clinica. La riproducibilità dei test molecolari è altamente variabile nella pratica clinica e NPV e PPV sono influenzati dalla prevalenza del carcinoma della tiroide, per cui sussiste la necessità di validare il profilo di espressione dei miRNA su FNA in studi più ampi.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Introduzione

Il gold-standard per la valutazione e la diagnosi dei noduli tiroidei è rappresentato dall'esame citologico mediante agoaspirazione con ago sottile (FNA), il cui elevato valore diagnostico e accuratezza nella valutazione delle lesioni tiroidee sono state chiaramente dimostrate e validate nelle ultime decadi. Esso rappresenta, inequivocabilmente, l'approccio migliore per la diagnosi dei noduli tiroidei per la sua semplicità, sicurezza e per rapporto costo-beneficio, consentendo una corretta diagnosi nella maggior parte dei casi [Gharib H et al., 2016]. Gli studi presenti in letteratura dimostrano che in più del 70% dei casi la citologia tiroidea risulta benigna, nel 5-10% dei casi maligna e che la quota restante, circa il 15-25% [Cooper DS et al., 2009; Cramer JD et al., 2010], è rappresentata dalla cosiddetta zona grigia delle neoplasie follicolari (FN), che include differenti entità patologiche. La categoria FN rappresenta, infatti, una categoria indeterminata in cui non è sempre semplice una diagnosi morfologica oggettiva e definitiva, ponendo il problema della conseguente gestione clinica e/o chirurgica [Baloch ZW et al., 2002; Faquin WC et al., 2010; Poller DN et al., 2016; Rossi ED et al., 2014]. A tal proposito è evidente che più del 75% delle FN risultano benigne al riscontro istologico e che di conseguenza tale categoria è responsabile di un alto tasso di tiroidectomie non necessarie e maggiori costi per l'assistenza sanitaria [Feldkamp J et al., 2016; Panebianco F et al., 2015; Paschke R et al., 2017; Singh ON et al., 2020].

La conoscenza dei meccanismi molecolari del tumore della tiroide ha sicuramente avuto un impatto pratico sulle valutazioni citologiche da agoaspirato, soprattutto nell'ambito delle neoplasie follicolari. Sebbene l'applicazione di tecniche ancillari quali l'immunoistochimica e i test molecolari possano contribuire a superare le limitazioni della valutazione morfologica e a migliorare l'accuratezza diagnostica, la valutazione della prognosi e la previsione del comportamento del tumore della tiroide, tuttavia, non forniscono una diagnosi corretta della natura delle lesioni tiroidee, in particolare tra le FN [Cantara S et al., 2017; Decaussin-Petrucci M et al., 2017; de Koster EJ et al., 2018; Poller DN et al., 2017; Rossi ED et al., 2017a; Rossi ED et al. 2018]. In tale prospettiva alcuni autori hanno recentemente investigato il potenziale ruolo dei microRNA (miRNA) come biomarcatori tumorali.

I microRNA sono definiti come piccoli RNA endogeni, non codificanti, che agiscono principalmente come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica e la cui deregolazione è spesso associata a tumori, compreso il tumore della tiroide [Cantara S et

al., 2017; Decaussin-Petrucci M et al., 2017; de Koster EJ et al., 2018; Poller DN et al., 2017; Rossi ED et al., 2017a; Rossi ED et al. 2018]. Sebbene nella maggior parte degli studi la valutazione delle implicazioni diagnostiche e prognostiche dei miRNA è stata condotta su campioni istologici di lesioni benigne e maligne della tiroide, anche i campioni citologici ottenuti da agoaspirato rappresentano un potenziale valido campo per la valutazione dei pannelli di miRNA finalizzati alla diagnosi delle lesioni indeterminate [Rossi ED et al., 2017b]. D'altra parte, solo un articolo ha evidenziato la bassa sensibilità e specificità ottenuta con la rilevazione di miRNA effettuata su campioni FN convenzionali [Rossi ED et al., 2017b].

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il profilo di espressione dei miRNA su campioni citologici processati con LBC, per lo più diagnosticati come lesioni indeterminate, in modo tale da stabilire se è possibile distinguere lesioni maligne e benigne fornendo una diagnosi molecolare predittiva su FNA.

3.2 Materiali e Metodi

Questo studio retrospettivo è stato condotto previa approvazione del comitato etico, acquisizione del consenso informato di tutti i partecipanti e in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki. Tra tutti i noduli sottoposti ad agoaspirato tiroideo processato con citologica su fase liquida registrati presso la UOC di Anatomica Patologia e Istologia dell'Università di Messina, Policlinico G. Martino di Messina e la Divisione di Anatomica Patologia e Istologia dell'Università Cattolica Agostino Gemelli, Ospedale Agostino Gemelli di Roma nel periodo compreso tra Settembre 2020 e Marzo 2022, abbiamo selezionato 33 casi di cui era disponibile la verifica istologica. Il gruppo di studio comprendeva 20 noduli indeterminati classificati in 10 TIR3A e 10 TIR3B, 5 noduli benigni-TIR2 e 8 noduli maligni-TIR5. I casi sono stati selezionati sulla base della diagnosi istologica dopo tiroidectomia in modo tale che le classi citologiche TIR2 e TIR3A fossero tutte costituite da lesioni benigne e i casi TIR3B e TIR5 fossero tutte lesioni maligne. Tutti gli FNA sono stati eseguiti sotto guida ecografica da endocrinologi e processati con metodo LBC, Thin Prep 5000 (Hologic Co., Marlborough, MA). Tutte le aspirazioni (mediamente due per ogni lesione) sono state eseguite con aghi da 25-27G. Non è stata effettuata nessuna valutazione in loco dell'adeguatezza del materiale prelevato. Tutti i pazienti sono stati adeguatamente informati per quanto riguarda l'uso del metodo LBC per l'elaborazione dei loro campioni ed hanno fornito un consenso informato scritto. I passaggi tecnici per i preparati in fase liquida prevedevano: lavaggio

dell'ago usato per l'aspirazione nella soluzione Cytolytic e processamento del campione ottenuto mediante il metodo Thin Prep 5000 (Hologic Cytyc Co., Marlborough, MA, USA). Il vetrino risultante è stato fissato in metanolo al 95% e colorato con Papanicolaou, mentre il rimanente materiale citologico è stato conservato nella soluzione Preservcyt. Il limite inferiore per definire l'adeguatezza per ogni campione è stato stabilito, secondo gli schemi del Bethesda e British RC Path Classification, in sei gruppi di cellule epiteliali follicolari tiroidee all'interno dei vetrini valutati e ciascuno di essi con almeno dieci cellule epiteliali ben visualizzate. I casi citologici sono stati classificati secondo la classificazione SIAPEC del Gruppo di Lavoro Italiano [Nardi F, et al 2014; Pusztaszeri et al 2016]. Tutti i campioni citologici e istologici sono stati esaminati da due patologi esperti e quei casi la cui interpretazione era equivoca sono stati sottoposti al giudizio diagnostico di altri patologi fino al raggiungimento di un accordo definitivo.

3.2.1 Estrazione del DNA e analisi molecolare della mutazione di BRAF, TERT e NRAS

Il DNA è stato estratto dai 10µm di tessuto incluso in paraffina utilizzando il kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Milano, Italia), seguendo il protocollo del produttore. Le aree sezionate per l'estrazione di DNA e RNA contenevano almeno l'80% delle cellule tumorali. L'analisi mutazionale di BRAF, TERT e N-RAS è stata eseguita mediante Real-Time PCR (qPCR) allele-specifica 1N-RAS mediante il kit Easy PGX Ready (Diatech Pharmacogenetics, Jesi, AN, Italia) utilizzando il termociclatore EasyPGX qPCR instrument 96 (Diatech Pharmacogenetics).

3.2.2 Analisi molecolare dei miRNA

Per la profilazione dei miRNA, abbiamo utilizzato miScript miRNA PCR Array Human miFinder (formato da 96 pozzetti, MIHS-001Z, Qiagen). miScript miRNA PCR Array Human miFinder profila l'espressione degli 84 miRNA più abbondantemente espressi e meglio caratterizzati nell'ultima versione di miRbase. Su ciascuna piastra è inclusa una serie di controlli che hanno consentito l'analisi dei dati utilizzando il metodo di quantificazione relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$, la valutazione delle prestazioni della trascrizione inversa e la valutazione delle prestazioni della PCR. Per l'analisi miScript miRNA PCR Array Human miFinder, abbiamo utilizzato lo strumento di real-time PCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIORAD, Milano, Italia) usando SYBR GreenMIx, seguendo i seguenti passaggi: 95°C per 15min; 40 cicli di 94°C per 15s; 55°C per 30s e 70°C per 30s. Per l'analisi dei dati della Real-Time PCR è stato utilizzato un software

disponibile online (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>). L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita due volte. I risultati più significativi ottenuti nell'array RT2 PCR sono stati convalidati mediante Real-Time PCR.

3.2.3 Real-Time PCR

L'RNA totale è stato isolato mediante miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Milano, Italia) dalla serie delle nostre LBC, seguendo il protocollo del produttore. Dopo la trascrizione inversa, è stata eseguita la Real-Time PCR utilizzando il kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (KAPA-Biosystems, Boston, Massachusetts, USA) o QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix (Qiagen), seguendo il protocollo del produttore, in CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, Roma, Italia). In breve, è stato aggiunto RNA (25 ng) alla miscela contenente 10µl di KAPA SYBR FAST qRT-PCR Master Mix (2X), 0.4 µl di primer senso e primer anti-senso (10 µM), 0.4 µl di dUTP (10 mM) e 0,4 µl di KAPA RT Mix (50X) fino a un volume finale di 20 µl. La condizione di amplificazione era: un ciclo iniziale a 42°C per 5 minuti, una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita da 38 cicli a 95°C per 5 secondi e 60°C per 20 secondi. Ciascuna analisi è stata eseguita in duplicato e, per ciascun gene, il livello di espressione è stato normalizzato per quantità di β-actina (Tabella 2).

miRNA	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
miR-96-5p	5'-ACGATGCACCTGTACGATCA-3'	5'-TCTTTCAACACGCAG GACAG-3'
miR-155-5p	5'-AAATGAACCTGTGACGAA-3'	5'-TCAAAAAACATGCGCACCT-3'
miR-126-3p	5'-CGCCGTCGTACCGTGAGTAA-3'	5'-CAGCCACAAAAGAGCACAAT-3'
miR-143-3p	5'-GAGATGAAGCACTGT AGCT-3'	5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'
miR-9-5p	5'CGAGCTCTGTGTGTGTGTGTGTG TG-3'	5'TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACG TCGACGG-3'
miR-7-5p	5'-GGCTGCTCTCAACATGCGA-3'	5'-CTGTGTCCGCACGTTCAAGA-3'
miR-150-5p	5'ACACTCCAGCTGGGTCTCCCAAC CCTTGTA-3'	5'CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGG CAATTCAGTTGAGATGGTCAC-3'

Tabella 2 Sequenze dei primer dei miRNA studiati

3.3 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad-Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA) e MedCalc versione 10.2.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke,

Belgio). Il confronto statistico delle variabili continue è stato eseguito mediante il test U di Mann-Whitney o T-test accoppiato (test t), a seconda dei casi. Il confronto delle variabili categoriche è stato eseguito mediante il test del chi-quadrato, utilizzando il test esatto di Fisher ove necessario. Valori di P inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

3.4 Risultati

3.4.1 Analisi della popolazione in esame

La coorte di studio comprendeva una serie retrospettiva di 33 noduli valutati citologicamente mediante FNA, e più specificatamente: 5 TIR2, 10 TIR3A, 10 TIR3B e 8 TIR5, tutti con follow-up chirurgico nello stesso periodo di riferimento. Per lo scopo dello studio è stato analizzato il ruolo dei miRNA nelle categorie TIR3A e TIR3B e nelle due categorie TIR2 e TIR5, considerate rispettivamente come controlli negativi (TIR2) e positivi (TIR5).

Le caratteristiche demografiche e clinico-epidemiologiche dei casi inclusi nello studio sono riportate nella tabella 3. Sono stati esaminati pazienti di entrambi i sessi, in particolare 11 (33,3%) di sesso maschile e 22 (66,6%) di sesso femminile, con un'età mediana di 48anni (range 20-72 anni). Le dimensioni dei noduli erano comprese tra 0,5 e 5 cm. (Tabella 3). I 5 TIR2 selezionati erano tutti struma colloidei alla valutazione istologica, mentre gli 8 TIR5 risultavano in 6 PTC e 2 FVPTC dopo esame istologico. La categoria TIR3A comprendeva 10 FA, mentre la categoria TIR3B era costituita da 5PTC e 5FVPTC. Relativamente alla valutazione della mutazione BRAF V600E, questa è stata effettuata sul materiale tissutale incluso in paraffina. Tutti i casi classificati come TIR2, TIR3A e 8 TIR3B erano wild type (wt) per BRAF V600E mentre 2 TIR3B e 6 TIR5, diagnosticati come carcinomi papillari della tiroide all'istologia, esprimevano la mutazione BRAF. Nessuno dei casi considerati esprimeva invece la mutazione di TERT, né mutazioni di N-RAS.

Caratteristiche Cliniche	TIR2 (5 casi)	TIR3A (10 casi)	TIR 3B (10 casi)	TIR 5 (8 casi)
Sesso				
Maschile	2	4	3	2
Femminile	3	6	7	6
Età (età mediana)	35-78(54)	20-70(43.5)	23-72(49)	23-72 (46.25)
Dimensioni del nodulo $\geq 2\text{cm}$	4/5 (80%)	4/10(40%)	5/10(50%)	1/8 (12,5%)
Istologia				
Struma colloideo	5	0	0	0
FA	0	10	0	0
PTC	0	0	5	6
FVPTC	0	0	5	2
BRAF-WT	0	0	8	2
BRAF-V600E	0	0	2	6

Tabella 3 Caratteristiche demografiche e clinico-epidemiologiche della coorte di studio. FA adenoma follicolare; PTC carcinoma papillare; FVPT variante follicolare del carcinoma papillare

3.4.2 Analisi dei profili di espressione dei miRNA

Inizialmente, abbiamo selezionato dalla nostra coorte una serie di 12 noduli, costituita da 3TIR 2, 3 TIR3A, 3 TIR3B, 3 TIR5, sulla quale è stata valutata tramite piattaforma miRNA PCR Array form miFinder l'espressione di 84 miRNA indipendenti. Successivamente si è proceduto ad analisi dei risultati mediante software Qiagen di analisi che ha permesso di confrontare le varie categorie con i campioni citologici di controllo (TIR2).

I risultati di questa prima valutazione dimostravano come l'espressione di alcuni miRNA nei diversi sottogruppi risultasse significativamente sottoregolata o sovraregolata rispetto ai controlli (tabella 4). In particolare, l'espressione di miR-96-5p risultava sovraregolata in maniera significativa nei TIR5 (fold change= 6,7194) mentre il miR-155-5p risultava significativamente sovraregolato nei TIR3B (fold change= 4,1989).

Dall'analisi eseguita, si evidenziava, inoltre, come alcuni miRNA, in particolare miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-125a-5p, miR-126-3p, miR-144-3p, miR-23b-3p, miR-143-3p, miR-122-5p, risultassero significativamente sottoespressi sia nei TIR5 che nei TIR3B (tabella 4). Inoltre, alcuni miRNA erano significativamente sottoregolati in categorie citologiche specifiche. In particolare, nella categoria TIR5 si riscontrava una significativa sottoregolazione di miR-27b-3p (fold change= -4,352), let-7c-5p (fold change= -7,9539), miR-7-5p (fold change= -4,3822), miR-196b-5p (fold change= -5,6634). Di contro miR-142-5p (fold change= -4,6913), miR-150-5p (fold change= -12,4666), miR-103a-3p (fold change= -6,0629), miR-223-3p (fold change= -7,1602), miR-424-5p (fold change= -8,8766) e let-7f-5p (fold change= -4,2871) presentavano una significativa sottoregolazione esclusivamente nella sottocategoria diagnostica TIR3A. Dal confronto tra i campioni citologici emergeva inoltre una sovrapposizione nella sottoregolazione di alcuni miRNA (miR-26a-5p, miR-185-5p, miR-29c-3p, miR-140-3p, miR-100-5p) in tutte le sottocategorie analizzate, senza differenze significative nella loro espressione (tabella 4).

Genes Expressed in			
	TIR5	TIR3B	TIR3A
Mature ID	Fold Change	Fold Change	Fold Change
hsa-miR-96-5p	6,7194	-----	-----
hsa-miR-155-5p	-----	4,1989	-----
hsa-miR-9-5p	-10,0677	-14,2215	-----
hsa-miR-26a-5p	-5,0339	-4,0558	-3,985
hsa-miR-26b-5p	-6,5508	-4,5315	-----
hsa-miR-185-5p	-4,0046	-4,6589	-4,728
hsa-miR-125a-5p	-7,899	-4,9933	-----
hsa-miR-126-3p	-6,9243	-11,3137	-----
hsa-miR-144-3p	-6,5508	-67,6492	-----
hsa-miR-23b-3p	-7,6299	-5,3517	-----
hsa-miR-143-3p	-10,1378	-42,8137	-----
hsa-miR-29c-3p	-4,1747	-4,3772	-4,568

hsa-miR-140-3p	-6,2405	-5,4642	-4,521
hsa-miR-122-5p	-24,1118	-4,4691	-----
hsa-miR-100-5p	-6,9243	-5,7358	-5,284
hsa-miR-27b-3p	-4,352	-----	-----
hsa-let-7c-5p	-7,9539	-----	-----
hsa-miR-7-5p	-4,3822	-----	-----
hsa-miR-196b-5p	-5,6634	-----	-----
hsa-miR-142-5p	-----	-----	-4,6913
hsa-miR-150-5p	-----	-----	-12,4666
hsa-miR-103a-3p	-----	-----	-6,0629
hsa-miR-223-3p	-----	-----	-7,1602
hsa-miR-424-5p	-----	-----	-8,8766
hsa-let-7f-5p	-----	-----	-4,2871

Tabella 4 Fold change dei miRNA deregolati

3.4.3 Conferma della differente espressione dei miRNA sull'intera casistica citologica

Sulla base dei risultati preliminari ottenuti utilizzando miFinder miRNA PCR Array, è stata focalizzata l'attenzione su quei miRNA che presentavano caratteristiche di espressione peculiari in termini di selettività dei sottotipi citologici (miR-96-5p e miR-155-5p rispettivamente sovraespressi nei TIR5 e nei TIR3B; miR-7-5p, miR-150-5p rispettivamente sottoespressi nei TIR5 e nei TIR3A) o di espressione quantitativa (miR-126-3p, miR-143-3p, miR-9-5p) rispetto ai campioni di controllo e in accordo con le attuali evidenze di letteratura. Tali miRNA sono stati valutati in una coorte più ampia (33 campioni citologici) mediante Real-Time PCR.

Dall'analisi dei dati è emerso come vi fosse un'espressione significativamente più elevata di miR-96-5p nei noduli della categoria citologica TIR5 ($p=0.0003$) e TIR3B ($p=0.0097$) rispetto al gruppo di controllo (Figura 5). Tale miRNA risultava, infatti, sovraregolato rispettivamente di 2,6 volte e di circa 2 volte nei noduli TIR5 e TIR3B rispetto al gruppo di controllo, con un maggiore incremento nella categoria citologica maligna. Nei noduli

TIR3B è stata, inoltre, osservata un'espressione significativamente più elevata (4,526 vs 1,884; 2,4 volte) di miR-155-5p rispetto al gruppo di controllo (p=0.0047) (Figura 6).

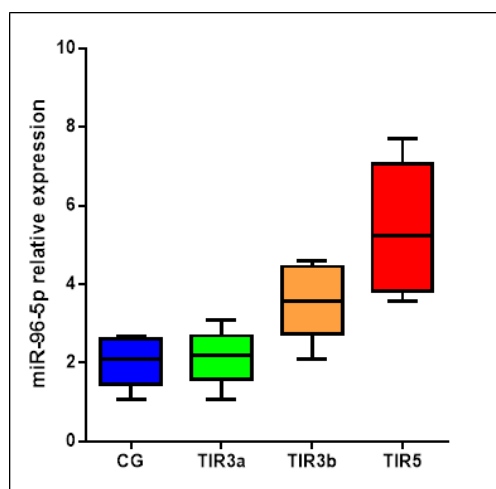


Figura 5 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione di miR-96-5p

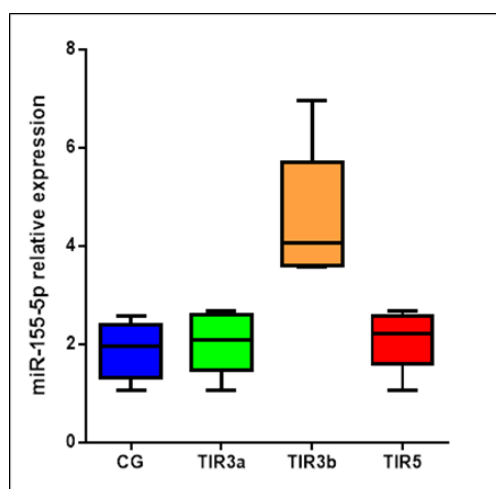


Figura 6 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del miR-155-5p

Di contro l'espressione di tre miRNA (miR-9-5p, miR-126-3p e miR-143-3p) è risultata significativamente ridotta nelle categorie diagnostiche TIR3B e TIR5. In particolare, l'espressione di miR-9-5p era significativamente sottoregolata sia nei noduli TIR3B che nei noduli TIR5 (entrambe $p < 0.0001$) (Figura 7), con una riduzione media dell'espressione di miR-9-5p rispettivamente di 4 volte (0,6244 vs 2,486) e quindici volte (0,160 vs 2,486) rispetto al gruppo di controllo. L'espressione di miR-126-3p era

significativamente ridotta nei noduli TIR3B ($p= 0.0072$) e TIR5 ($p<0.0001$) rispetto al gruppo di controllo e tale miRNA risultava sottoespresso di circa 2 volte e 6,6 volte in tali categorie rispetto al gruppo di controllo (Figura 8). Il miR-143-3p risultava significativamente sottoregolato sia nei TIR3B che nei TIR 5 (entrambi $p<0.0001$) (Figura 9) con una media di espressione rispettivamente di 2,6 e 4 volte inferiore rispetto al gruppo di controllo.

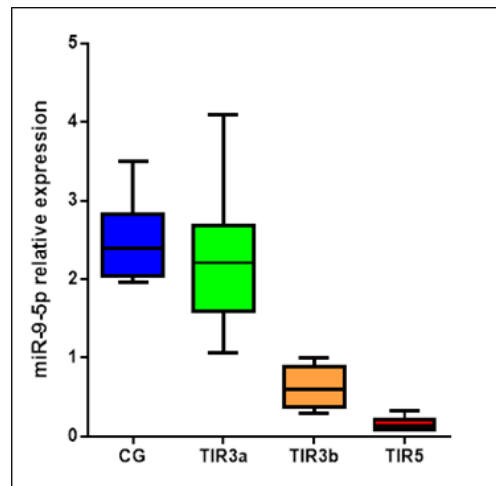


Figura 7 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del miR-9-5p

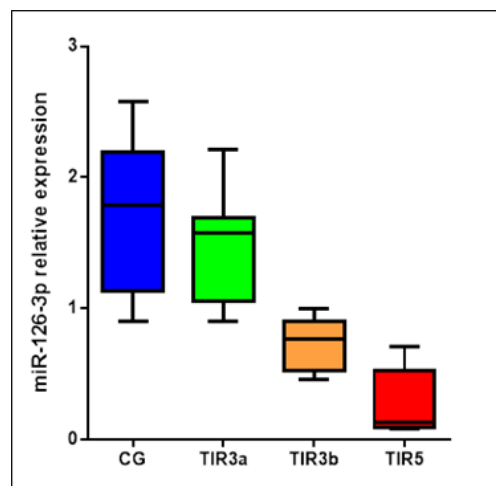


Figura 8 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del miR-126-3p

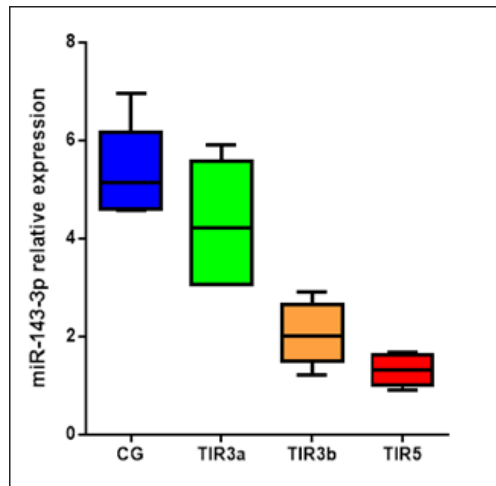


Figura 9 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del miR-143-3p

Infine, l'espressione del miR-7-5p si confermava significativamente più bassa nei TIR5 rispetto al controllo (2,1233 vs 5,386667, $p < 0.0001$) (Figura 10), laddove quella del miR-150-5p risultava ridotta di circa 2,6 volte nella categoria TIR3A rispetto ai controlli (2,24 vs 5,37, $p < 0.0001$) (Figura 11).

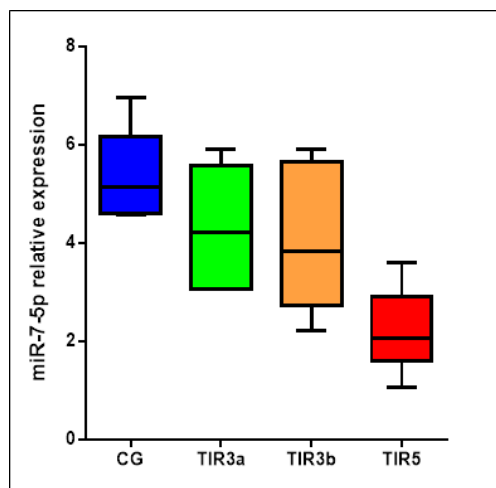


Figura 10 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del mR-7-5p

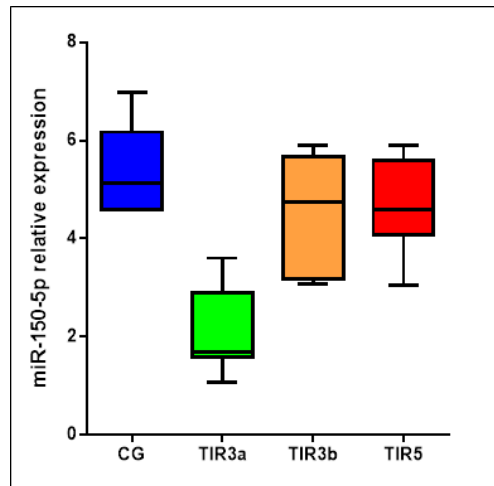


Figura 11 Analisi Real-Time PCR: profilo di espressione del miR-150-5p

3.5 Discussione

La valutazione diagnostica dei pazienti con malattia nodulare della tiroide ha come obiettivo principale l'esclusione di tumori tiroidei maligni. Sebbene la citologia da FNA rappresenti lo strumento più sensibile e specifico per la diagnosi differenziale delle neoplasie tiroidee, tuttavia questa presenta importanti limitazioni [Gharib H et al., 2016]. In particolare, mentre il 75% delle diagnosi citologiche è indicativa di una lesione benigna e il 5% di una lesione maligna [Cooper DS et al., 2009; Cramer JD et al., 2010], fino al 25% degli FNA risulta conclusivo per lesioni follicolari di significato indeterminato, per le quali la chirurgia è l'unico metodo per distinguere le diverse entità istologiche (adenoma follicolare, neoplasia follicolare tiroidea non invasiva con caratteristiche nucleari simil papillari, carcinoma follicolare e variante follicolare del carcinoma papillare) [Cooper DS et al., 2009; Cramer JD et al., 2010]. Decidere se i pazienti con un nodulo tiroideo citologicamente indeterminato debbano, quindi, essere indirizzati alla chirurgia o alla sorveglianza attiva è una sfida importante per il clinico. In un significativo numero di casi di questo tipo, la decisione ricade sulla chirurgia diagnostica, sulla base di un rischio stimato di malignità che va dal 15 al 40% [Nardi F et al., 2014; Trimboli P et al., 2019; Poller DN et al., 2016]. Tuttavia, solo il 25% dei noduli citologicamente indeterminati resecati risulta effettivamente maligno. Ciò significa che, a parte l'impatto di questa pratica in termini di spesa sanitaria, una buona parte dei noduli tiroidei a citologia indeterminata sono attualmente sovratrattati e i pazienti sono inutilmente esposti a dei rischi chirurgici (lesioni del nervo laringeo ricorrente,

ipocalcemia, emorragia/ematoma, ipotiroidismo) [Feldkamp J et al., 2016; Panebianco F et al., 2015; Paschke R et al., 2017; Singh ON et al., 2020]. A tal proposito sono stati proposti diversi approcci per migliorare il processo diagnostico, compresi sistemi ecografici di stratificazione del rischio [Grani G et al., 2017; Valderabano P et al., 2018], l'elastasonografia [Rago T et al., 2010], la loro combinazione [Cantisani V et al., 2019], o altri sistemi di punteggio clinico [Ianni F et al., 2020]. Inoltre, negli ultimi anni, dal momento che i dati di letteratura hanno dimostrato che l'identificazione di mutazioni genetiche, spesso associate a malignità, rappresenta un valido aiuto aggiuntivo nella cosiddetta zona grigia delle neoplasie follicolari, è stato introdotto l'uso di tecniche ancillari (ICC o analisi DNA/RNA) sulla citologia tiroidea nel tentativo di superare i limiti della citomorfologia [Cantara S et al., 2017; Decaussin-Petrucci M et al., 2017; de Koster EJ et al., 2018; Poller DN et al., 2017; Rossi ED et al., 2017a; Rossi ED et al., 2018]. Un approccio genetico per migliorare l'accuratezza diagnostica preoperatoria consiste nell'identificare un gruppo di mutazioni (mutazioni BRAF e RAS, riarrangiamenti cromosomici RET/PTC e PAX8-PPAR γ , mutazioni di TERT). Queste mutazioni si verificano nel 70% dei pazienti con PTC e l'alterazione più frequente è la mutazione somatica BRAF V600E (45% di PTC); tuttavia, la maggior parte delle FN non presentano alcuna mutazione somatica, compresa la mutazione di BRAF V600E o non esprimono marcatori ICC specifici [de Koster EJ et al., 2018; Rossi ED et al., 2017a]. Recentemente è cresciuto l'interesse nella valutazione del profilo di espressione dei miRNA nella patogenesi del carcinoma tiroideo e come strumento diagnostico aggiuntivo. Inoltre, numerosi studi recenti hanno valutato il ruolo di diversi miRNA come possibili markers diagnostici nei noduli a citologia indeterminata [Cantara S et al., 2017; Decaussin-Petrucci M et al., 2017; de Koster EJ et al., 2018; Poller DN et al., 2017; Rossi ED et al., 2017b; Rossi ED et al., 2018].

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il profilo di espressione dei miRNA su campioni citologici processati con LBC, per lo più diagnosticati come lesioni indeterminate in modo tale da stabilire se è possibile distinguere lesioni maligne e benigne fornendo una diagnosi molecolare predittiva su FNA. In questo studio è stato preliminarmente valutato il profilo di espressione di 84 miRNA ben caratterizzati su una serie di 12 noduli selezionati con diversa classificazione citologica (3 TIR2, 3 TIR3A, 3 TIR3B, 3 TIR5) dei quali era nota la diagnosi istologica, utilizzando Human miFinder miRNA PCR array (MIHS-001Z); si tratta di un pannello predeterminato di miRNA

progettato per delineare l'espressione dei miRNA più abbondantemente espressi e meglio caratterizzati nel database miRBase. Il complesso ruolo di ciascuno dei miRNA inclusi in questo pannello nell'ambito delle diverse malattie non è ancora stato completamente determinato. L'analisi dei risultati di questa prima valutazione ci ha consentito di identificare 19 miRNA differenzialmente espressi (sovra o sottoregolati) nei diversi sottogruppi citologici rispetto al gruppo di controllo (TIR2). Abbiamo successivamente valutato l'espressione differenziale di alcuni di questi miRNA in una coorte più ampia (33 campioni citologici) mediante Real-Time PCR. La scelta dei miRNA da studiare con questa metodica è stata un punto di criticità del protocollo ed è stata guidata dalla letteratura. Abbiamo, dunque, selezionato quei miRNA che presentavano caratteristiche di espressione peculiari in termini di selettività dei sottotipi citologici (miR-96-5p e miR-155-5p rispettivamente sovraespressi nei TIR5 e nei TIR3B; miR-7-5p, miR-150-5p rispettivamente sottoespressi nei TIR5 e nei TIR3A) o di espressione quantitativa (miR-126-3p, miR-143-3p, miR-9-5p) rispetto ai campioni di controllo e in accordo con le attuali evidenze di letteratura relativamente alla loro espressione su campioni istologici di lesioni tiroidee. I due miRNA- miR-96 e miR-155, la cui espressione è risultata elevata rispettivamente nelle categorie TIR5 e TIR3B, hanno entrambe una funzione oncogenica nel carcinoma della tiroide. Dai dati di letteratura è evidente come il miR-96 risulti sovraespresso in diversi tipi di tumori maligni, inclusi il carcinoma epatocellulare, della mammella, della vescica, della prostata e, non ultimo, della tiroide. Tale miRNA sembra, infatti, avere un ruolo oncogenico nei PTC, nei quali risulta sovraespresso, e la sua funzione sembra essere mediata dalla soppressione dell'espressione di FOX1, che agisce sulla via del segnale AKT/FOXO1/Bim, e quindi media la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali nel PTC [Song HM et al., 2015]. Altri studi hanno confermato il ruolo oncogenico di miR-96 nel PTC [Liu ZM et al., 2019; Zhao X et al., 2019;]. In particolare, uno studio ha dimostrato come la sovraespressione di miR-96-3p possa promuovere l'invasività e la metastatizzazione dei PTC in vivo e in vitro attivando la via SDHB/AKT/mTOR che ne giustifica gli effetti oncogenici [Zhao X et al., 2019]. Inoltre, lo studio di Liu e colleghi non solo ha dimostrato che miR-96-5p è altamente espresso nei tessuti e nelle linee cellulari di PTC, ma ha anche riportato come tale miRNA possa promuovere la proliferazione, l'invasività e la migrazione cellulare attraverso la riduzione del livello di espressione proteica di CCDC67 [Liu ZM et al., 2019]. Relativamente al miR-155, questo è stato individuato come biomarcatore per la discriminazione tra lesioni tiroidee benigne e maligne ed è stato dimostrato come la sua

sovraespressione risulta correlata a maggiori dimensioni del tumore, maggiore probabilità di estensione extratiroidea, un più alto tasso di metastasi linfonodali cervicali e uno stadio TNM più avanzato, oltre che ad una prognosi sfavorevole nei pazienti con PTC [Zhu YZ et al., 2016]. Un altro studio ha, invece, dimostrato come l'espressione di miR-155-5p risulta aumentata nel carcinoma follicolare tiroideo, e che la deregolazione di questo miRNA può inibire l'apoptosi cellulare, promuovendo formazione e progressione tumorale. Inoltre, miR-155-5p potrebbe essere un fattore prognostico indipendente per carcinoma follicolare tiroideo [Geng X et al., 2020].

Tra i miRNA la cui espressione è risultata sottoregolata mediante analisi Human miFinder miRNA PCR array nelle diverse categorie citologiche ne abbiamo selezionati alcuni noti dai dati di letteratura per avere una funzione oncosoppressoria nella tumorigenesi tiroidea. In particolare, i dati di letteratura dimostrano come miR-143-3p sia un oncosoppressore che ha come bersaglio il gene MSI2 tramite il quale inibisce la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasività dei PTC [Wang ZL et al., 2020]. Il miR-9-5p è un oncosoppressore che ha come bersaglio diretto BRAF. Il pathway di segnale miR-9-5p/BRAF sembra svolgere un ruolo chiave nella cancerogenesi del PTC. In particolare, la sottoregolazione del miR-9-5p sembra promuovere la proliferazione delle cellule del PTC, inibendone l'apoptosi [Guo F et al., 2018]. L'espressione del miR-126 risulta ridotta nel PTC ed è stato dimostrato che il suo ruolo funzionale risiede nell'inibizione dell'angiogenesi mediata da VEGF-A [Salajegheh A et al., 2016]. I dati di letteratura mostrano, inoltre, come il miR-7-5p, abbia funzioni di oncosoppressore nel cancro di diversi organi, inclusi i polmoni, il colon, la mammella e la tiroide. Diversi studi hanno, infatti, dimostrato come questo miRNA risulti sottoregolato nel PTC rispetto al tessuto tiroideo benigno. In particolare, miR-7-5p funge da oncosoppressore nelle vie di segnalazione con un ruolo cruciale nella cancerogenesi (EGFR/MAPK, PI3K/AKT, Wnt e altri), inibendo la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione delle cellule [Hua K et al., 2016]. Infine, l'espressione del miR-150 risulta aumentata o ridotta in differenti tipi di tumori solidi, compreso il carcinoma del collo dell'utero, della mammella, del polmone, del colon-retto, dello stomaco, del fegato, del pancreas e dell'esofago. Uno studio incentrato su miR-150, ha rivelato come tale miRNA abbia un ruolo oncosoppressorio nel carcinoma della tiroide. In particolare, la sua ridotta espressione nei campioni di PTC risulta correlata negativamente con lo stadio TNM e la presenza di metastasi linfonodali. Tale miRNA ha come proteina target la chinasi 1 Rho-associata

(ROCK1) [Cheng L et al., 2017]. Dai dati emersi dal nostro studio la valutazione del profilo di espressione di alcuni miRNA su campione citologico potrebbe avere un ruolo nella diagnosi differenziale delle lesioni a citologia indeterminata. In particolare, i miR-96-5p, e il miR-155-5p risultavano significativamente sovraespressi, mentre i miR-9-5p, miR-126-3p, miR-143-3p presentavano un'espressione significativamente ridotta alla valutazione mediante qRT-PCR nei noduli TIR3B, che alla verifica istologica erano tutte lesioni maligne (5PTC e 5FVPTC), rispetto ai TIR2 e ai TIR3A, che erano istologicamente tutte lesioni benigne. Questo dato è in accordo con i dati di letteratura che riportano come la sovraregolazione o la sottoregolazione di tali miRNA risulti essere associata alla cancerogenesi tiroidea [Song HM et al., 2015; Zhao X et al., 2019; Liu ZM et al., 2019; Zhu YZ et al., 2016; Geng X et al., 2020; Wang ZL et al., 2020; Guo F et al., 2018; Salajegheh A et al., 2016].

In questo studio, è stata effettuata per la prima volta la profilazione dei miRNA su agoaspirato processato con citologia su fase liquida mediante piattaforma miScript miRNA PCR Array Human miFinder che consente una quantificazione sensibile e specifica dei miRNA. Dai risultati emersi è possibile ipotizzare un ruolo diagnostico della valutazione del profilo di espressione di specifici miRNA come marker di malignità, in particolar modo nei FNA con citologia indeterminata. I nostri dati suggeriscono, che la valutazione dell'espressione di un pannello di miRNA costituito da miR-96-5p, miR-155-5p, miR-9-5p, miR-126-3p, miR-143-3p potrebbe essere utile come strumento diagnostico per la differenziazione tra le lesioni a citologia indeterminata da sottoporre a follow-up clinico-strumentale o a intervento chirurgico. L'ulteriore ampliamento della casistica cito-istologica consentirà di espandere la valutazione a specifiche sottoclassi istologiche come i NIFTP, tumori dal comportamento tipicamente indolente e per i quali è legittimata l'adozione di un approccio terapeutico conservativo, o gli adenomi follicolari.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal S, Bychkov A, Jung CK. Emerging Biomarkers in Thyroid Practice and Research. *Cancers (Basel)*. 2021;14(1):204. Published 2021 Dec 31. doi:10.3390/cancers14010204
- Agretti P, Ferrarini E, Rago T, et al. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(3):393-400. doi:10.1530/EJE-12-0400
- Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012;367(8):705-715. doi:10.1056/NEJMoa1203208
- Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Switzerland: Springer International (2018). doi: 10.1007/978-3-319-60570-8
- Angell TE, Wirth LJ, Cabanillas ME, et al. Analytical and Clinical Validation of Expressed Variants and Fusions From the Whole Transcriptome of Thyroid FNA Samples. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:612. Published 2019 Sep 11. doi:10.3389/fendo.2019.00612
- Asa SL. The Current Histologic Classification of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(1):1-22. doi:10.1016/j.ecl.2018.10.001
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2002;26(1):41-44. doi:10.1002/dc.10043
- Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol*. 2008;36(6):425-437. doi:10.1002/dc.20830
- Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*. 2008;122(5):969-977. doi:10.1002/ijc.23343
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic

- leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Cantara S, Marzocchi C, Pilli T, et al. Molecular Signature of Indeterminate Thyroid Lesions: Current Methods to Improve Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):775. Published 2017 Apr 6. doi:10.3390/ijms18040775
 - Cantisani V, David E, Grazhdani H, et al. Prospective Evaluation of Semiquantitative Strain Ratio and Quantitative 2D Ultrasound Shear Wave Elastography (SWE) in Association with TIRADS Classification for Thyroid Nodule Characterization. Prospektive Evaluierung der semiquantitativen Kompressionselastografie und der quantitativen 2D-Scherwellenultraschallelastografie (SWE) in Verbindung mit der TIRADS-Klassifikation zur Charakterisierung von Schilddrüsenknoten. *Ultraschall Med*. 2019;40(4):495-503. doi:10.1055/a-0853-1821
 - Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):213-220. doi:10.1210/jc.2005-1336
 - Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282
 - Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ 3rd, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(9):1139-1146. doi:10.1038/modpathol.2008.105
 - Cheng L, Zhou R, Chen M, Feng L, Li H. MicroRNA-150 targets Rho-associated protein kinase 1 to inhibit cell proliferation, migration and invasion in papillary thyroid carcinoma. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):2217-2224. doi:10.3892/mmr.2017.6842
 - Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, WestraWH, Ladenson PW, Sidransky D (2003) BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95(8):625–627
 - Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients

- With Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* (2009) 19 (11):1167–214. doi: 10.1089/thy.2009.0110
- Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. *Surgery*. 2010;148(6):1147-1153. doi:10.1016/j.surg.2010.10.016
 - Croyle M, Akeno N, Knauf JA, et al. RET/PTC-induced cell growth is mediated in part by epidermal growth factor receptor (EGFR) activation: evidence for molecular and functional interactions between RET and EGFR. *Cancer Res*. 2008;68(11):4183-4191. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0413
 - Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295(18):2164-2167. doi:10.1001/jama.295.18.2164
 - de Koster EJ, de Geus-Oei LF, Dekkers OM, et al. Diagnostic Utility of Molecular and Imaging Biomarkers in Cytological Indeterminate Thyroid Nodules. *Endocr Rev*. 2018;39(2):154-191. doi:10.1210/er.2017-00133
 - Decaussin-Petrucci M, Descotes F, Depaepe L, et al. Molecular testing of BRAF, RAS and TERT on thyroid FNAs with indeterminate cytology improves diagnostic accuracy. *Cytopathology*. 2017;28(6):482-487. doi:10.1111/cyt.12493
 - Decmann Á, Perge P, Nagy Z, Butz H, Patócs A, Igaz P. Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában [Circulating microRNAs in the diagnostics of endocrine neoplasms]. *Orv Hetil*. 2017;158(13):483-490. doi:10.1556/650.2017.30708
 - Dettmer MS, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN. MicroRNA profile of poorly differentiated thyroid carcinomas: new diagnostic and prognostic insights. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(2):181-189. Published 2014 Mar 6. doi:10.1530/JME-13-0266
 - Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4440-4445. doi:10.1210/jc.2002-021690
 - Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50(4):529-535. doi:10.1046/j.1365-2265.1999.00704.x

- Faquin WC, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular patterned lesions of the thyroid: Diagnosis, management, and follow-up according to National Cancer Institute (NCI) recommendations. *Diagn Cytopathol.* 2010;38(10):731-739. doi:10.1002/dc.21292
- Feldkamp J, Führer D, Luster M, Musholt TJ, Spitzweg C, Schott M. Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(20):353-359. doi:10.3238/arztebl.2016.0353
- Ferris RL, Baloch Z, Bernet V, et al. American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid.* 2015;25(7):760-768. doi:10.1089/thy.2014.0502
- Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, et al. Management Guidelines for Children with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2015;25(7):716-759. doi:10.1089/thy.2014.0460
- Geng X, Sun YY, Fu JJ, Cao L, Li Y. Role of miR-155-5p expression and its involvement in apoptosis-related factors in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Pharm Ther.* 2020;45(4):660-665. doi:10.1111/jcpt.13175
- Gharib H, Papini E, Garber JR, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY, AND ASSOCIAZIONE MEDICI ENDOCRINOLOGI MEDICAL GUIDELINES FOR CLINICAL PRACTICE FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THYROID NODULES--2016 UPDATE. *Endocr Pract.* 2016;22(5):622-639. doi:10.4158/EP161208.GL
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y and Chajut A: Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 3: e3148, 2008
- Grani G, Lamartina L, Ascoli V, et al. Ultrasonography scoring systems can rule out malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Endocrine.* 2017;57(2):256-261. doi:10.1007/s12020-016-1148-6

- Guo F, Hou X, Sun Q. MicroRNA-9-5p functions as a tumor suppressor in papillary thyroid cancer via targeting BRAF. *Oncol Lett.* 2018;16(5):6815-6821. doi:10.3892/ol.2018.9423
- Gupta N, Dasyam AK, Carty SE, et al. RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):E914-E922. doi:10.1210/jc.2012-3396
- Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(8):699-706. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02162.x
- Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem.* 2009;387(2):303-314. doi:10.1016/j.ab.2009.01.037
- Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1-133. doi:10.1089/thy.2015.0020
- Haugen BR, Sawka AM, Alexander EK, et al. American Thyroid Association Guidelines on the Management of Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer Task Force Review and Recommendation on the Proposed Renaming of Encapsulated Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma Without Invasion to Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features. *Thyroid.* 2017;27(4):481-483. doi:10.1089/thy.2016.0628
- He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19075-19080. doi:10.1073/pnas.0509603102
- Hlozek J, Pekova B, Rotnagl J, Holy R, Astl J. Genetic Changes in Thyroid Cancers and the Importance of Their Preoperative Detection in Relation to the General Treatment and Determination of the Extent of Surgical Intervention-A Review. *Biomedicines.* 2022;10(7):1515. Published 2022 Jun 27. doi:10.3390/biomedicines10071515

- Hua K, Jin J, Zhang H, Zhao B, Wu C, Xu H and Fang L: MicroRNA-7 inhibits proliferation, migration and invasion of thyroid papillary cancer cells via targeting CKS2. *Int J Oncol* 49: 1531-1540, 2016
- Ianni F, Pascucci D, Paragliola RM, et al. Follow-Up or Surgery for Indeterminate Thyroid Nodules: Could the CUT Score Application Be a Support for Decision-Making in the Preoperative Assessment?. *Thyroid*. 2020;30(1):65-71. doi:10.1089/thy.2018.0649
- Kakudo K, Bychkov A, Bai Y, Li Y, Liu Z, Jung CK. The new 4th edition World Health Organization classification for thyroid tumors, Asian perspectives. *Pathol Int*. 2018;68(12):641-664. doi:10.1111/pin.12737
- Keh SM, El-Shunnar SK, Palmer T, Ahsan SF. Incidence of malignancy in solitary thyroid nodules. *J Laryngol Otol*. 2015;129(7):677-681. doi:10.1017/S0022215115000882
- Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res*. 2012;18(7):2032-2038. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2487
- Killock D. Genetics: The Cancer Genome Atlas maps papillary thyroid cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(12):681. doi:10.1038/nrclinonc.2014.193
- Kopczyński J, Suligowska A, Niemyska K, et al. Did Introducing a New Category of Thyroid Tumors (Non-invasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features) Decrease the Risk of Malignancy for the Diagnostic Categories in the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology?. *Endocr Pathol*. 2020;31(2):143-149. doi:10.1007/s12022-020-09619-0
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D68-D73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L et al (2000) PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*289(5483):1357–1360
- Kumar N, Gupta R, Gupta S. Molecular testing in diagnosis of indeterminate thyroid cytology: Trends and drivers. *Diagn Cytopathol*. 2020;48(11):1144-1151. doi:10.1002/dc.24522

- Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(7):e69807. Published 2013 Jul 29. doi:10.1371/journal.pone.0069807
- Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, et al. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(7):2743-2750. doi:10.1210/jc.2015-1158
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y
- Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(4):603-610. Published 2013 Jul 12. doi:10.1530/ERC-13-0210
- Liu ZM, Wu ZY, Li WH, Wang LQ, Wan JN, Zhong Y. MiR-96-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma through down-regulating *CCDC67*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(8):3421-3430. doi:10.26355/eurrev_201904_17706
- Lloyd, R.V.; Osamura, R.Y.; Kloppel, G.; Rosai, J. Chapter 2 Tumours of the Thyroid Gland. In WHO Classification of Tumours of Endocrine Organ; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017; pp. 65–143
- Ludvíková M, Kalfeřt D, Kholová I. Pathobiology of MicroRNAs and Their Emerging Role in Thyroid Fine-Needle Aspiration. *Acta Cytol*. 2015;59(6):435-444. doi:10.1159/000442145
- Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4085-4090. doi:10.1210/jc.2007-1179
- Maze H, Levy Y, Mizrahi I, et al. Differentiating benign from malignant thyroid nodules using micro ribonucleic acid amplification in residual cells obtained by fine needle aspiration biopsy. *J Surg Res*. 2013;180(2):216-221. doi:10.1016/j.jss.2012.04.051

- Mazeh H, Mizrahi I, Halle D, et al. Development of a microRNA-based molecular assay for the detection of papillary thyroid carcinoma in aspiration biopsy samples. *Thyroid*. 2011;21(2):111-118. doi:10.1089/thy.2010.0356
- Mazeh H. MicroRNA as a diagnostic tool in fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Oncologist*.2012;17(8):1032-1038. doi:10.1634/theoncologist.2012-0013
- Muzza M, Colombo C, Pogliaghi G, Karapanou O, Fugazzola L. Molecular markers for the classification of cytologically indeterminate thyroid nodules. *J Endocrinol Invest*. 2020;43(6):703-716. doi:10.1007/s40618-019-01164-w
- Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, et al. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(6):593-599. doi:10.1007/s40618-014-0062-0
- Ngo HTT, Nguyen TPX, Vu TH, et al. Impact of Molecular Testing on the Management of Indeterminate Thyroid Nodules Among Western and Asian Countries: a Systematic Review and Meta-analysis. *Endocr Pathol*. 2021;32(2):269-279. doi:10.1007/s12022-020-09643-0
- Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, 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(23):3627-3634. doi:10.1002/cncr.29038
- Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid*. 2015;25(11):1217-1223. doi:10.1089/thy.2015.0305
- Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):3390-3397. doi:10.1210/jc.2011-1469
- Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol*. 2016;2(8):1023-1029. doi:10.1001/jamaoncol.2016.0386

- Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):569-577. doi:10.5858/2010-0664-RAIR.1
- Nikiforov YE. ROLE OF MOLECULAR MARKERS IN THYROID NODULE MANAGEMENT: THEN AND NOW [published correction appears in *Endocr Pract.* 2017 Nov;23 (11):1362]. *Endocr Pract.* 2017;23(8):979-988. doi:10.4158/EP171805.RA
- Nikiforova MN, Chiose SI, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2009a;20(2):85-91. doi:10.1007/s12022-009-9069-z
- Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer.* 2018;124(8):1682-1690. doi:10.1002/cncr.31245
- Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid.* 2009b;19(12):1351-1361. doi:10.1089/thy.2009.0240
- Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1600-1608. doi:10.1210/jc.2007-2696
- Nishino M, Bellevicine C, Baloch Z. Molecular Tests for Risk-Stratifying Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: An Overview of Commercially Available Testing Platforms in the United States. *Journal of Molecular Pathology.* 2021; 2(2):135-146. <https://doi.org/10.3390/jmp2020014>
- Nylén C, Mechera R, Maréchal-Ross I, et al. Molecular Markers Guiding Thyroid Cancer Management. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):2164. Published 2020 Aug 4. doi:10.3390/cancers12082164
- Ohori NP, Landau MS, Manroa P, Schoedel KE, Seethala RR. Molecular-derived estimation of risk of malignancy for indeterminate thyroid cytology diagnoses. *J Am Soc Cytopathol.* 2020;9(4):213-220. doi:10.1016/j.jasc.2020.03.004
- Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):497-508. doi:10.1677/erc.1.01209
- Panebianco F, Mazzanti C, Tomei S, et al. The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient

- management. *BMC Cancer*. 2015;15:918. Published 2015 Nov 19. doi:10.1186/s12885-015-1917-2
- Papaioannou M, Chorti AG, Chatzikyriakidou A, Giannoulis K, Bakkar S, Papavramidis TS. MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer: What Is New in Diagnosis and Treatment. *Front Oncol*. 2022;11:755097. Published 2022 Feb 3. doi:10.3389/fonc.2021.755097
 - Parente DN, Kluijfhout WP, Bongers PJ, et al. Clinical Safety of Renaming Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Is NIFTP Truly Benign?. *World J Surg*. 2018;42(2):321-326. doi:10.1007/s00268-017-4182-5
 - Paschke R, Cantara S, Crescenzi A, Jarzab B, Musholt TJ, Sobrinho Simoes M. European Thyroid Association Guidelines regarding Thyroid Nodule Molecular Fine-Needle Aspiration Cytology Diagnostics. *Eur Thyroid J*. 2017;6(3):115-129. doi:10.1159/000468519
 - Paskaš S, Janković J, Živaljević V, et al. Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(8):471-479. doi:10.1002/cncy.21554
 - Paulson VA, Rudzinski ER, Hawkins DS. Thyroid Cancer in the Pediatric Population. *Genes (Basel)*. 2019;10(9):723. Published 2019 Sep 18. doi:10.3390/genes10090723
 - Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;2013:965212. doi:10.1155/2013/965212
 - Poller DN, Baloch ZW, Fadda G, et al. Thyroid FNA: New classifications and new interpretations. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(7):457-466. doi:10.1002/cncy.21703
 - Poller DN, Glaysher S. Molecular pathology and thyroid FNA. *Cytopathology*. 2017;28(6):475-481. doi:10.1111/cyt.12492
 - Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:102. Published 2020 Mar 13. doi:10.3389/fendo.2020.00102
 - Pusztaszeri M, Rossi ED, Auger M, et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Proposed Modifications and Updates for the Second

- Edition from an International Panel. *Acta Cytol.* 2016;60(5):399-405. doi:10.1159/000451020
- Rago T, Scutari M, Santini F, et al. Real-time elastosonography: useful tool for refining the presurgical diagnosis in thyroid nodules with indeterminate or nondiagnostic cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(12):5274-5280. doi:10.1210/jc.2010-0901
 - Raman P, Koenig RJ. Pax-8-PPAR-g 3 fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol.* (2014) 10:616–23. doi: 10.1038/nrendo.2014.115
 - Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
 - Rogucki M, Buczyńska A, Krętowski AJ, Popławska-Kita A. The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Med.* 2021;10(20):4738. Published 2021 Oct 15. doi:10.3390/jcm10204738
 - Rong Y, Bao W, Shan Z, et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013;8(9):e73272. Published 2013 Sep 2. doi:10.1371/journal.pone.0073272
 - Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, et al. The evaluation of miRNAs on thyroid FNAC: the promising role of miR-375 in follicular neoplasms. *Endocrine.* 2016;54(3):723-732. doi:10.1007/s12020-016-0866-0
 - Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, Larocca LM, Schmitt F, Vielh P. Cytopathology of Follicular Cell Nodules. *Adv Anat Pathol.* 2017a;24(1):45-55. doi:10.1097/PAP.0000000000000135
 - Rossi ED, Fadda G, Schmitt F. The nightmare of indeterminate follicular proliferations: when liquid-based cytology and ancillary techniques are not a moon landing but a realistic plan. *Acta Cytol.* 2014;58(6):543-551. doi:10.1159/000363439
 - Rossi ED, Locantore P, Bruno C, et al. Molecular Characterization of Thyroid Follicular Lesions in the Era of "Next-Generation" Techniques. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:834456. Published 2022 May 12. doi:10.3389/fendo.2022.834456
 - Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Larocca LM. The role of miRNAs in the evaluation of follicular thyroid neoplasms: an overview of literature. *J Am Soc Cytopathol.* 2017b;6(3):96-104. doi:10.1016/j.jasc.2017.02.001

- Rossi, E.D., Bongiovanni, M. (2018). Molecular Cytology Application on Thyroid. In: Schmitt, F. (eds) *Molecular Applications in Cytology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74942-6_10
- Salajegheh A, Vosgha H, Rahman MA, Amin M, Smith RA, Lam AK. Interactive role of miR-126 on VEGF-A and progression of papillary and undifferentiated thyroid carcinoma. *Hum Pathol*. 2016;51:75-85. doi:10.1016/j.humpath.2015.12.018
- Samsonov R, Burdakov V, Shtam T, et al. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(9):12011-12021. doi:10.1007/s13277-016-5065-3
- Santiago K, Chen Wongworawat Y, Khan S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Subtypes. *J Oncol*. 2020;2020:2052396. Published 2020 Jun 3. doi:10.1155/2020/2052396
- Sayed AS, Xia K, Li F, et al. The diagnostic value of circulating microRNAs for middle-aged (40-60-year-old) coronary artery disease patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(4):257-263. doi:10.6061/clinics/2015(04)07
- Sharma PC, Gupta A. MicroRNAs: potential biomarkers for diagnosis and prognosis of different cancers. *Transl Cancer Res*. 2020;9(9):5798-5818. doi:10.21037/tcr-20-1294
- Shen R, Liyanarachchi S, Li W, et al. MicroRNA signature in thyroid fine needle aspiration cytology applied to "atypia of undetermined significance" cases. *Thyroid*. 2012;22(1):9-16. doi:10.1089/thy.2011.0081
- Singh Ospina N, Iñiguez-Ariza NM, Castro MR. Thyroid nodules: diagnostic evaluation based on thyroid cancer risk assessment. *BMJ*. 2020;368:l6670. Published 2020 Jan 7. doi:10.1136/bmj.l6670
- Song HM, Luo Y, Li DF, et al. MicroRNA-96 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and regulating AKT/FOXO1/Bim pathway in papillary thyroid carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):9889-9900. Published 2015 Sep 1.
- Song JY, Sun SR, Dong F, Huang T, Wu B, Zhou J. Predictive Value of BRAF^{V600E} Mutation for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Cancer: A

- Meta-analysis. *Curr Med Sci.* 2018;38(5):785-797. doi:10.1007/s11596-018-1945-7
- Steward DL, Carty SE, Sippel RS, et al. Performance of a Multigene Genomic Classifier in Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology: A Prospective Blinded Multicenter Study [published correction appears in *JAMA Oncol.* 2019 Feb 1;5(2):271]. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):204-212. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4616
 - Straccia P, Santoro A, Rossi ED, et al. Incidence, malignancy rates of diagnoses and cyto-histological correlations in the new Italian Reporting System for Thyroid Cytology: An institutional experience. *Cytopathology.* 2017;28(6):503-508. doi:10.1111/cyt.12455
 - Strickland KC, Howitt BE, Marqusee E, et al. The Impact of Noninvasive Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma on Rates of Malignancy for Fine-Needle Aspiration Diagnostic Categories. *Thyroid.* 2015;25(9):987-992. doi:10.1089/thy.2014.0612
 - Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 2007;581(5):795-799. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.051
 - Trimboli P, Crescenzi A, Castellana M, Giorgino F, Giovanella L, Bongiovanni M. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology: the risk of malignancy between indeterminate lesions at low or high risk. A systematic review and meta-analysis. *Endocrine.* 2019;63(3):430-438. doi:10.1007/s12020-018-1825-8
 - Valderrabano P, McGettigan MJ, Lam CA, et al. Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Utility of the American Thyroid Association Sonographic Patterns for Cancer Risk Stratification. *Thyroid.* 2018;28(8):1004-1012. doi:10.1089/thy.2018.0085
 - Vander Poorten V, Hens G, Delaere P. Thyroid cancer in children and adolescents. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;21(2):135-142. doi:10.1097/MOO.0b013e32835e15d9
 - Ventura M, Melo M, Fernandes G, Carrilho F. RISK OF MALIGNANCY IN THYROID CYTOLOGY: THE IMPACT OF THE RECLASSIFICATION OF NONINVASIVE FOLLICULAR THYROID NEOPLASM WITH PAPILLARY-

- LIKE NUCLEAR FEATURES (NIFTP). *Endocr Pract.* 2019;25(7):642-647. doi:10.4158/EP-2018-0423
- Vriens MR, Weng J, Suh I, et al. MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer.* 2012;118(13):3426-3432. doi:10.1002/cncr.26587
 - Wang ZL, Wang C, Liu W, Ai ZL. Upregulation of microRNA-143-3p induces apoptosis and suppresses proliferation, invasion, and migration of papillary thyroid carcinoma cells by targeting MSI2 [published correction appears in *Exp Mol Pathol.* 2020 Jun 2;:104457]. *Exp Mol Pathol.* 2020;112:104342. doi:10.1016/j.yexmp.2019.104342
 - Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):875-885. doi:10.1038/nrm1498
 - Wittmann J, Jäck HM. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):200-207. doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.002
 - Wojtas B, Ferraz C, Stokowy T, et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;388(1-2):1-9. doi:10.1016/j.mce.2014.02.011
 - Wu C, Schwartz JM, Brabant G, Nenadic G. Molecular profiling of thyroid cancer subtypes using large-scale text mining. *BMC Med Genomics.* 2014;7 Suppl 3(Suppl 3):S3. doi:10.1186/1755-8794-7-S3-S3
 - Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013;309(14):1493-1501. doi:10.1001/jama.2013.3190
 - Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6373-6379. doi:10.1210/jc.2005-0987
 - Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(3):184-199. doi:10.1038/nrc3431
 - Yip L, Ferris RL. Clinical application of molecular testing of fine-needle aspiration specimens in thyroid nodules. *Otolaryngol Clin North Am.* 2014;47(4):557-571. doi:10.1016/j.otc.2014.04.003

- Zhang Y, Xu D, Pan J, et al. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4252-4266. doi:10.3892/ol.2017.6028
- Zhao X, Li Y, Zhou Y. MicroRNA-96-3p promotes metastasis of papillary thyroid cancer through targeting SDHB. *Cancer Cell Int.* 2019;19:287. Published 2019 Nov 12. doi:10.1186/s12935-019-1003-y
- Zhu YZ, Zheng K, Zhang HH, et al. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2016;36(10):1364-1368
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):71-77. doi:10.1309/ND8D-9LAJ-TRCT-G6QD