



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ONCOLOGICHE E CHIRURGICHE

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
IN ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA**

CICLO XXII

**LE CARATTERISTICHE MOLECOLARI DEL CARCINOMA PAPILLARE
DELLA TIROIDE NON IODOCAPTANTE**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello

Supervisore :Ch.ma Prof.ssa Maria Rosa Pelizzo

Dottorando: Dott. ERIC CASAL IDE

Indice

1. RIASSUNTO.....	2
2. ABSTRACT.....	6
3. IL NOSTRO STUDIO.....	10
3.1 Introduzione e finalità.....	10
3.2 Presentazione.....	12
3.3 Embriologia.....	12
3.4 Anatomia della ghiandola tiroide.....	13
3.5 Vascolarizzazione e innervazione.....	16
3.6 Regolazione dell'asse tiroideo.....	17
3.7 Sintesi degli ormoni tiroidei.....	18
3.8 Trasporto e metabolismo degli ormoni tiroidei.....	20
3.9 Azione degli ormoni tiroidei.....	21
3.10 Patologia tiroidea.....	22
3.11 Diagnostica del nodulo tiroideo.....	24
3.12 Galectina.....	30
3.13 Anatomia patologica della tiroide.....	33
3.14 Generalità sui carcinomi tiroidei differenziati.....	38
3.15 Fattori prognostici.....	43
3.16 Tireoglobulina.....	47
3.17 Genetica.....	50
4. MATERIALI E METODI.....	59
4.1 Esami di laboratorio.....	61
4.2 Ecotomografia ad alta risoluzione e citologia ecoguidata.....	61
4.3 Esame scintigrafico con 131-I.....	62
4.4 18-FDG-PET-TC.....	63
4.5 Note di tecnica chirurgica.....	64
4.6 Anatomia patologica.....	68
4.7 Estrazione di RNA e DNA da paraffinato.....	70
4.8 Determinazione della concentrazione di DNA e controllo qualitativo.....	70
4.9 Amplificazione del DNA mediante PCR.....	71
5. RISULTATI.....	77
6. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	83
7. BIBLIOGRAFIA.....	87

1. RIASSUNTO

Presupposti dello studio:

i carcinomi papillari tiroidei (PTCs) costituiscono la neoplasia endocrina più frequente e si caratterizzano per un decorso indolente e una bassa mortalità, dovuta principalmente alla capacità di questi tumori di concentrare lo iodio e alla possibilità di essere efficacemente trattati con iodio radioattivo (¹³¹I). Tuttavia in circa un terzo dei pazienti, in particolare in corso di malattia persistente o ricorrente, viene persa la capacità di captare lo ¹³¹I.

Una mutazione somatica interessante l'esone 15 della serina-treonina-chinasi BRAF, realizzante la sostituzione di una valina con glutammato (V600E), rappresenta l'evento genico più frequente alla base dello sviluppo del carcinoma papillare tiroideo, documentabile nel 36-48% dei casi. Diversi studi hanno messo in evidenza che i carcinomi papillari con mutazione di BRAF hanno un atteggiamento più aggressivo, presentandosi in stadio più avanzato alla diagnosi e potendo evolvere verso istotipi meno differenziati o anaplastici nel *follow-up*. BRAF potrebbe pertanto rappresentare un nuovo fattore prognostico indipendente, in grado di identificare i carcinomi papillari a maggior rischio di recidiva e di perdita della capacità di concentrare lo ¹³¹I. La mutazione di BRAF è inoltre associata ad un' aumentata espressione del trasportatore del glucosio GLUT1, suggerendo l'utilità di tecniche di *imaging*, quali la 18-FDG-PET-TC, nel *follow-up* dei pazienti con recidiva di tumore tiroideo differenziato.

Scopo dello studio:

- 1) valutare la frequenza di mutazioni BRAF nei carcinomi papillari primitivi, nelle metastasi linfonodali al momento della diagnosi e nelle recidive e definire se tale frequenza sia maggiore nei tumori che recidivano e in particolare in quelli con recidive non iodofissanti;
- 2) valutare se la presenza di mutazioni BRAF si correli ai fenotipi con accelerato metabolismo del glucosio FDG-PET positivi.

Pazienti e metodi:

abbiamo selezionato 42 pazienti consecutivi operati per recidiva di carcinoma tiroideo differenziato; alla diagnosi tutti i pazienti erano stati sottoposti a tiroidectomia totale e a terapia radioablativa con ¹³¹I. In questi pazienti la scintigrafia totale corporea è stata eseguita 3 giorni dopo una dose terapeutica di ¹³¹I (2,7-5,4 GBq) dopo aver sospeso la terapia con ormone tiroideo. 23/42 pazienti sono stati sottoposti a ¹⁸F-FDG PET-TC. La presenza di mutazioni a carico dell'esone 15 di BRAF è stata analizzata tramite sequenziaggio e PCR allele-specifica (MASA).

Risultati:

tra le recidive di carcinoma papillare, in base allo *staging* tumorale, 10/42 (24%) erano T1, 8/42 (19%) T2, 4/42 (10%) T3 e 18/42 (43%) T4. (Di 2/42 pazienti non era disponibile la classificazione TNM). L'età media alla diagnosi era di 40, la mediana 35 anni (min 16, max 79). L'età media al momento

della recidiva era di 45, la mediana 43 anni (min 16, max 82). La media dei valori di Tg durante terapia soppressiva era 181, mentre la mediana era 7 ng/ml (min.<0.5 max 3344). 11/42 pazienti presentavano positività/persistenza degli anticorpi anti-Tg durante il *follow-up*. BRAF risultava mutato in 19/37 (51%) recidive non iodofissanti e in 1/5 (20%) delle iodofissanti. Abbiamo quindi correlato la presenza di mutazioni BRAF con la capacità di captare il radioiodio e il 18-FDG (15 casi): di tali 15 casi, 14 erano recidive non iodiofissanti, mentre 1 era iodofissante. Nell'insieme delle recidive BRAF-mutate, tra le non iodofissanti 73% captavano il 18-FDG e 20% non lo captavano, mentre l'unica recidiva iodofissante BRAF-mutata era PET-positiva. Inoltre la presenza della mutazione correlava con gli indici di *uptake* più elevati. In 10 pazienti l'analisi delle mutazioni di BRAF è stata condotta simultaneamente sul tumore primitivo (K0), sulla metastasi linfonodale al momento della diagnosi (N0) e sulla prima recidiva non iodofissante (R1) asportata chirurgicamente e sulle eventuali successive (R2): BRAF risultava mutato in 2/10 (20%) tumori primitivi, in 3/7 (42%) metastasi linfonodali al momento della diagnosi e in 7/10 (70%) prime recidive non iodofissanti e 2/2 (100%) seconde recidive.

Tramite sequenziaggio abbiamo inoltre dimostrato una nuova mutazione che interessa il codone 602 dell'esone 15 di BRAF e porta alla sostituzione dell'amminoacido serina con la fenilalanina (S602F).

Conclusioni:

nel nostro studio abbiamo dimostrato che 1) le mutazioni BRAF sono più frequenti nelle recidive non iodofissanti rispetto a quelle iodofissanti (51 % versus 20 %); 2) esse possono comparire *de novo* in corso di recidiva di tumore tiroideo primitivo (20% versus 42% e 70% rispettivamente nel tumore primitivo, nella metastasi linfonodale alla diagnosi e nella recidiva non iodofissante); 3) esiste una correlazione inversa tra la presenza della mutazione e la capacità di fissare lo iodio, ed un'associazione diretta tra la presenza della mutazione e la capacità di captare il 18-FDG e le recidive che mostrano la mutazione V600E hanno un indice di captazione elevato, suggerendo quindi l'esistenza di una correlazione tra il grado di captazione di 18-FDG e la presenza della mutazione; 4) una nuova mutazione di BRAF non riportata in Letteratura è presente a livello del codone 602 dell'esone 15 di BRAF e determina la sostituzione di un amminoacido polare - serina - con uno apolare - fenilalanina.

In base ai dati del nostro studio sembrerebbe che BRAF si confermi come probabile marcatore molecolare di prognosi povera, in grado di promuovere lo sviluppo di recidive più aggressive, meno differenziate e meno iodocaptanti durante il *follow-up*.

2. ABSTRACT

Background:

Differentiated thyroid cancers (DTC) represent the most frequent endocrine cancer. They typically show an indolent behaviour and a good prognosis, mainly due to their capability to trap radioiodine (¹³¹I), the most powerful therapeutic tool in these malignancies. Nevertheless, approximately one third of thyroid cancer metastases do not concentrate radioiodine. The most common genetic event in papillary thyroid carcinoma is a transversion in exon 15 of the BRAF gene which leads to a V600E aminoacid substitution (glutamic acid instead of valine) ranging from 36% to 48%. It has been demonstrated that cancers with the BRAF mutation have a more aggressive behaviour: the mutation is associated with more advanced initial tumor stage at diagnosis and with conversion into less differentiated or anaplastic cancers during the follow-up. BRAF could represent a new independent prognostic factor helpful to identify cancers that both tend to recur more frequently and lose the capability to trap radioiodine. The BRAF mutation is also associated with an increased expression of the glucose transporter (GLUT-1), suggesting the possibility to use 18-FDG-PET-CT examination during the follow-up.

The objective of the study:

- 1) to estimate the frequency of the BRAF mutation in primary papillary cancers, in lymphonodal metastases at diagnosis and in recurrences; to value whether the BRAF mutation frequency is higher in relapsing cancers, particularly in those with no radioiodine uptake;
- 2) to determine whether the BRAF mutation is associated with increased glucose metabolism phenotypes.

Patients and methods:

42 consecutive recurrences, belonging to 42 PTC affected patients who underwent surgery, were analysed. At the time of diagnosis they were subjected to thyroidectomy and to ¹³¹I radioablation; then they were submitted to a total body scintigraphic examination 3 days after a ¹³¹I therapeutic dose (2,7- 5,4GBq). 23/42 patients were submitted to a FDG-PET-CT examination as well.

All the samples were paraffin embedded: DNA extraction was performed according to the manufacturer's recommendations. Genomic DNA was evaluated for the existence of mutations of the BRAF gene by PCR amplification of the target DNA sequences followed by both direct sequencing and MASA.

Results:

recurrences were analysed under the TNM classification: 10/42 (24%) were T1, 8/42 (19%) were T2, 4/42 (10%) were T3 and 18/42 (43%) were T4. (TNM classification was not available for 2/42 patients). The average age at diagnosis was 40, the median was 35-yr-old (min 16, max 79), the average age at the time of recurrence was 45, the median was 43-yr-old (min 16,

max 82). The average serum Tg concentration during suppressive therapy with l-T4 was 181, the median was 7 ng/ml (min <0,5- max 3344). 11/42 patients had anti-Tg autoantibodies. 19/37 (51%) recurrences with no 131-I uptake showed the BRAF mutation, while 1/5 (20%) recurrence with 131-I uptake showed the mutation. In 15 recurrences (14 with no 131-I uptake and 1 with 131-I uptake) we correlated the presence of the BRAF mutation with both the capability to trap 131-I and 18-FDG: among the recurrences with no 131-I uptake 73% could concentrate 18-FDG and 20% could not, the one that trapped 131-I trapped also 18-FDG. The recurrences with BRAF mutation showed also an increased SUV. In 10 patients a simultaneous analysis of BRAF status was conducted in primary cancers (K0), in lymphonodal metastases at diagnosis (N0) and in surgically removed first (R1) and second recurrences (R2): the BRAF mutation was detected in 2/10 (20%) primary cancers, in 3/7 (42%) lymphonodal metastases at diagnosis, in 7/10 (70%) recurrences with no 131-I uptake and in 2/2 (100%) second recurrences.

By DNA sequencing we discovered a new BRAF mutation in exon 15 codon 602, which determine an aminoacidic substitution (phenylalanine instead of serine, S602F).

Conclusions:

1) BRAF mutations are more frequent in recurrences with no ¹³¹I uptake than in those with ¹³¹I uptake (51% versus 20%);

2) *de novo* BRAF mutations were shown in thyroidal recurrences during the follow-up (20% versus 42% and 70% respectively in primary cancers, in lymphonodal metastases and in recurrences);

3) the presence of BRAF mutations has an inverse correlation with the capability to trap ¹³¹I, and a direct one with the ability to concentrate ¹⁸F-FDG and it is related to a higher level of ¹⁸F-FDG uptake; 4) a new mutation occurs in exon 15, codon 602 of the BRAF gene and it causes the substitution of a polar aminoacid (serine) with a non polar one (phenylalanine).

Our study confirms that BRAF is a possible molecular indicator of poor prognosis because its mutation is associated with more aggressive, less differentiated and unable to trap radioiodine recurrences.

3. IL NOSTRO STUDIO

3.1 Introduzione e finalità

I carcinomi papillari tiroidei (PTCs) costituiscono la neoplasia endocrina più frequente e si caratterizzano per un decorso indolente e una bassa mortalità, dovuta principalmente alla capacità di questi tumori di concentrare lo iodio e alla possibilità di essere efficacemente trattati con iodio radioattivo (^{131}I). Tuttavia le recidive loco-regionali non iodofissanti sono riportate in letteratura nel 10-30% dei paziente con carcinoma differenziato della tiroide (3,4,7). Fortunatamente queste lesioni non iodofissanti mantengono la capacità, nella maggior parte dei casi, di sintetizzare e secernere Tg che mantiene pertanto il suo ruolo di sensibile marker tumorale (3,4,16,17) ma senza tuttavia fornire alcuna informazione riguardo la sede della diffusione metastatica, all'entità della recidiva o relativamente al comportamento biologico del tumore. È necessario quindi individuare il più precocemente possibile le recidive loco-regionali non iodofissanti, utilizzando come prima indagine l'ecografia ad alta risoluzione associata al FNAC; va segnalato che il coinvolgimento dei linfonodi mediastinici, che si osserva nel 5-20% dei casi (3,4,7), non può essere valutato mediante esame ecografico e questa informazione diviene di fondamentale importanza nei pazienti con recidive non iodofissanti nei quali la rimozione chirurgica rappresenta l'unica possibile e efficace strategia terapeutica: la valutazione accurata preoperatoria dell'estensione tumorale al collo e al mediastino, quindi, acquisisce un significato cruciale.

In tale scenario accanto all'ecografia del collo e alla TAC, la 18-FDG-PET-TC viene utilizzata per identificare la sede della malattia residua.

In questo studio abbiamo selezionato 42 pazienti affetti da recidiva di CDT, individuata in base alle tecniche di imaging suddette e quindi sottoposti a reintervento chirurgico a scopo di "bonifica". In una parte di questi pazienti è stato prelevato in vivo un frammento di tessuto per la caratterizzazione molecolare della lesione stessa: una mutazione somatica interessante l'esone 15 della serina-treonina-chinasi BRAF, realizzante la sostituzione di una valina con glutammato (V600E), rappresenta l'evento genico più frequente alla base dello sviluppo del carcinoma papillare tiroideo, documentabile nel 36-48% dei casi e tumori portatori di tale mutazione hanno un atteggiamento più aggressivo, presentandosi in uno stadio più avanzato alla diagnosi e potendo evolvere ad una differenziazione nel follow-up. BRAF potrebbe quindi rappresentare un nuovo fattore prognostico indipendente, in grado di identificare i carcinomi papillari a maggior rischio di recidiva o di perdita della capacità di concentrare lo ^{131}I . La mutazione di BRAF è inoltre associata ad un'aumentata espressione del trasportatore del glucosio GLUT-1, suggerendo l'utilità di tecniche di *imaging*, quali la 18-FDG-PET-TC, nel follow-up dei pazienti con recidiva di tumore tiroideo differenziato. La ricaduta pratica sotto il profilo chirurgico di BRAF è quella di modulare l'estensione dell'intervento chirurgico: a) Tiroidectomia parziale; b) Tiroidectomia totale; c) Svuotamento del compartimento centrale, del compartimento laterocervicale mono- o bilaterale.

3.2 Presentazione

La tiroide è una ghiandola che produce triiodotironina (T3) e tiroxina (T4): tali ormoni, agendo attraverso recettori nucleari, svolgono un ruolo centrale nella differenziazione cellulare durante lo sviluppo e aiutano a mantenere l'omeostasi termogenica e metabolica nell'adulto. Le alterazioni della ghiandola derivano principalmente da processi autoimmuni che possono stimolare la produzione ormonale, determinando rispettivamente un quadro di tireotossicosi o di ipotiroidismo. Inoltre nella ghiandola tiroidea si possono manifestare alterazioni parenchimali con presenza di noduli benigni o di varie forme di cancro. (1,2)

3.3 Embriologia

La tiroide è una ghiandola endocrina follicolare che risulta dalla fusione, durante l'embriogenesi, di un abbozzo mediano e di due abbozzi laterali: l'abbozzo mediano discende dal forame cieco della lingua fino alla regione anteriore del collo, formando il dotto tireoglosso, mentre l'abbozzo laterale deriva dal quarto e dal quinto arco branchiale e contiene il corpo ultimo-branchiale con le cellule C parafollicolari che producono la calcitonina, un ormone in grado di influenzare i livelli di calcio circolanti.

Durante la vita fetale sono rare le anomalie di migrazione, la più frequente delle quali è la persistenza di tessuto tiroideo alla base della lingua (si parla di tiroide linguale); altre sedi in cui il tessuto tiroideo può arrestarsi determinando la formazione di cisti o più raramente l'insorgenza di un tumore, sono il dotto

tireoglosso, la trachea, la laringe, la regione retro-sternale, il grasso ed i muscoli del collo.

La tiroide si sviluppa a partire dalla 3° settimana di gestazione, ma è solo dalla 11° che inizia a produrre gli ormoni tiroidei.

Lo sviluppo della ghiandola è controllato dall'azione di numerosi fattori di trascrizione: TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1, noto anche come NKX-2A), TTF2 (noto anche come FKHL-15), Paired Homebox 8 (noto anche come PAX-8). Essi sono espressi selettivamente ma non esclusivamente nella tiroide ed insieme ne coordinano lo sviluppo e determinano l'induzione di geni tiroide specifici come quelli della tireoglobulina (Tg), della tireoperossidasi (TPO), del trasportatore sodio/iodato (NIS) e del recettore del TSH (TSH-R). Mutazioni a carico di tali fattori trascrizionali o dei loro geni bersaglio sono cause rare di agenesia tiroidea o di disormonogenesi e conducono ad una condizione di ipotiroidismo congenito. (1,2)

3.4 Anatomia della ghiandola tiroide

La tiroide è localizzata nella regione anteriore del collo, davanti e lateralmente alla laringe ed ai primi anelli tracheali.

A livello macroscopico la ghiandola è costituita da due lobi riuniti al centro da un istmo e ha una struttura che ricorda quella di uno scudo: il termine tiroide deriva dal greco *thyreos*, scudo ed *eidos*, forma, e significa appunto, “forma a scudo”. I lobi sono piriformi, hanno gli apici rivolti verso l'alto e si riuniscono attraverso una parte trasversale, detta istmo, all'altezza del 1° e 2° anello tracheale. Nel 30-50% della popolazione dal margine superiore dell'istmo si diparte un

prolungamento parenchimale, generalmente spostato verso sinistra, detto lobo piramidale o piramide di Morgagni, che sale verso l'alto in direzione della radice della lingua, ripetendo il decorso del dotto tireoglossa, di cui rappresenta il residuo.

La ghiandola è altamente vascolarizzata, presenta colorito bruno, superficie liscia e consistenza soffice.

Lo sviluppo della ghiandola varia a seconda del sesso, dell'età e della località in cui vive il soggetto: alla nascita pesa circa 2 grammi mentre nell'adulto mediamente circa 18-20 grammi. Presenta una larghezza di circa 7 cm, altezza 3 cm (il polo superiore dei lobi laterali giunge alla parte media della cartilagine tiroidea, mentre il polo inferiore arriva al 5°-6° anello tracheale) e spessore variabile tra 0.5 e 2 cm. La tiroide è circondata da una capsula propria e ancor più esternamente da una guaina peritiroidea, che la fissa posteriormente alle cartilagini cricoidea, tiroidea e ai primi anelli tracheali e lateralmente alla guaina fibrosa del fascio neurovascolare del collo. Nello spazio tra i due rivestimenti decorrono le diramazioni dei vasi: data la facilità con cui vi si verificano emorragie è detto "spazio pericoloso". Dalla capsula propria si dipartono dei setti che suddividono il parenchima in aree di forma e dimensioni diverse, impropriamente definiti "lobuli".

Anteriormente la tiroide è coperta dai muscoli sottoioidei (sternoioideo, sternotiroideo e omoioideo) e dalla fascia cervicale media, tesa tra i due muscoli omoioidei; più superficialmente è situata la fascia cervicale superficiale, compresa tra il margine anteriore dei due muscoli sternocleidomastoidei; seguono infine il tessuto sottocutaneo con il muscolo platisma e la cute della regione antero-laterale del collo. Lateralmente i due lobi sono in gran parte ricoperti

dai muscoli sternocleidomastoidei. Posteriormente la tiroide aderisce al condotto laringotracheale e alla parte laringea della faringe. La faccia posterolaterale dei lobi laterali entra in rapporto con il fascio neurovascolare del collo, tanto che l'arteria carotide comune può lasciarvi un solco; posteriormente ai lobi tiroidei sono localizzate le ghiandole paratiroidi, in numero variabile da 3 a 7, che producono paratormone (PTH), importante per il controllo della calcemia. Lungo i margini laterali della tiroide decorrono i nervi laringei inferiori o ricorrenti, la cui identificazione è di fondamentale importanza nel corso degli interventi chirurgici al fine di evitarne il danneggiamento che comporta la paralisi delle corde vocali.

La tiroide si sposta assieme al condotto laringotracheale durante i movimenti di estensione del collo.

A livello microscopico l'unità elementare è il **follicolo**, di forma sferica od ovoidale, ripiena di colloide, con la parete formata da un unico strato di cellule che costituiscono l'epitelio follicolare. A seconda delle dimensioni, si distinguono micro- e macrofollicoli. I macrofollicoli hanno dimensioni notevoli, epitelio piatto e sono ripieni di colloide intensamente cromofila. Si tratta di follicoli ipofunzionanti, la cui colloide si accumula per essere utilizzata, qualora ve ne sia necessità, da parte dell'organismo: in tal caso nell'epitelio compaiono i segmenti escretori a livello dei quali avviene il riassorbimento della colloide con immissione in circolo di ormoni tiroidei. I microfollicoli hanno invece la parete formata da epitelio cubico e contengono quantità variabile di colloide scarsamente

cromofila: sono follicoli funzionanti nei quali le cellule sono attivamente impegnate.

L'epitelio è composto di cellule follicolari o tireociti, responsabili della produzione degli ormoni e poggia su una lamina basale all'esterno della quale decorrono i capillari. Tra i tireociti della parete follicolare sono localizzate le cellule C o parafollicolari che derivano da elementi della cresta neurale, difficilmente evidenziabili con le colorazioni abituali ma rilevabili mediante immunisto chimica con anticorpi anti-CT.

Le cellule follicolari presentano altezza variabile e diverso grado di sviluppo dell'apparato di Golgi in rapporto allo stadio funzionale. (1,2).

3.5 Vascolarizzazione e innervazione

La vascolarizzazione della ghiandola è fornita dalle arterie tiroidee superiori ed inferiori: le prime derivano dalle arterie carotidi esterne omolaterali, mentre le seconde dal tronco tireocervicale dell'arteria succlavia. Talvolta può essere presente un'arteria tiroidea "ima", incostante, che nasce direttamente dal tronco brachiocefalico o dalla carotide comune.

Le vene formano nello spazio peritiroideo un ricco plesso che, attraverso la vena tiroidea superiore, scarica in vena giugulare interna e, attraverso la vena tiroidea inferiore, nel tronco brachiocefalico.

Il drenaggio linfatico è omolaterale e ciascun lobo può pertanto essere considerato indipendente, nonostante esistano delle anastomosi linfatiche tra i lobi attraverso l'istmo. Le principali vie di drenaggio sono le catene pre- e latero-tracheali, la parte

bassa della catena giugulo-carotidea e la catena cervicale traversa a livello sottoclavicolare; la parte superiore del lobo drena attraverso il peduncolo tiroideo superiore verso i linfonodi sottodigastrici.

L'innervazione della ghiandola è fornita dall'ortosimpatico cervicale e dal nervo vago, principalmente attraverso i nervi laringei superiori ed inferiori. (1,2)

3.6 Regolazione dell'asse tiroideo

Il controllo della funzionalità tiroidea dipende dal TSH secreto dalle cellule tireotrope dell'ipofisi: è il principale e più utile marcatore dell'azione degli ormoni tiroidei. Il TSH è un ormone di 31 kDa costituito da una subunità α ed una β : la prima è comune agli altri ormoni glicoproteici, come ad esempio LH, FSH, hCG, mentre la seconda è specifica del TSH. L'attività del TSH è modulata a monte dal TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) prodotto dall'ipotalamo. L'asse tiroideo è un classico esempio di feedback endocrino: il TRH ipotalamico stimola la produzione ipofisaria di TSH che a sua volta stimola la sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei agiscono con feedback negativo inibendo la produzione di TRH e TSH. Il *set point* di tale asse è stabilito dal TSH, i cui livelli costituiscono un marcatore sensibile e specifico della funzione tiroidea. Esistono molecole come la dopamina, i glucocorticoidi e la somatostatina che sopprimono la produzione di TSH, che però non hanno un ruolo fisiologico importante, a meno che non vengano somministrate a dosi farmacologiche. Gli ormoni tiroidei sono i principali regolatori della produzione di TSH: una loro riduzione determina un

aumento della produzione basale di TSH e aumenta la stimolazione di TRH-mediata del TSH (TSH alto); livelli elevati di ormoni tiroidei sopprimono rapidamente e in modo diretto il TSH ed inibiscono la stimolazione TRH-mediata del TSH (TSH basso). Analogamente ad altri ormoni ipofisari, il TSH viene rilasciato in modo pulsatile e la secrezione ha un ritmo circadiano, con livelli massimi di ormone durante la notte; rispetto ad altri ormoni ipofisari le escursioni del TSH sono modeste, ed in parte ciò è dovuto al fatto che ha un'emivita piuttosto lunga (circa 50 minuti): misurazioni singole del TSH risultano perciò adeguate per stimare i livelli in circolo. Il TSH agisce attraverso il TSH-R, un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato alla subunità α di una proteina G stimolatrice, che attiva l'adenilato ciclasi, determinando un incremento del cAMP. Il TSH stimola inoltre il turnover del fosfatidilinositolo tramite l'attivazione della fosfolipasi C.

La sintesi degli ormoni tiroidei, oltre che dal TSH, è condizionata da alcuni fattori di crescita prodotti dalla stessa tiroide, tra cui IGF-1 (Insuline-like Growth Factor -1), EGF (Epidermal Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor – β), endoteline e numerose citochine. (1,2)

3.7 Sintesi degli ormoni tiroidei

La produzione di T3 e T4 avviene attraverso un meccanismo piuttosto complesso: i tireociti sintetizzano la Tg (Tireoglobulina), una glicoproteina dimerica con PM di 660 kDa costituita da 2669 aminoacidi, che viene immessa nella

cavità follicolare sottoforma di colloide, che può essere considerata un vero e proprio serbatoio di ormoni tiroidei. Le cellule follicolari hanno la capacità di captare ioduri dal sangue e di trasferirli nelle vescicole secretorie dirette verso il lume che contengono la Tg appena sintetizzata. Grazie all'azione di una perossidasi tiroidea che utilizza perossido di idrogeno, gli ioduri vengono ossidati e trasformati in iodio molecolare che viene incorporato in specifici residui tirosinici contenuti nella molecola della Tg: mediante legami esterici si ottengono MIT (monoiodotirosina) e DIT (diiodotirosina) e successivi processi di accoppiamento tra MIT e DIT portano alla formazione di triiodotironina e tetraiodotironina. Attraverso i microvilli presenti all'apice dei tireociti la Tg contenente nella sua sequenza gli ormoni tiroidei viene riversata nel lume follicolare. Gli ormoni tiroidei possono essere mobilizzati ed immessi in circolo dopo che la colloide viene riassorbita e la Tg proteolizzata: il riassorbimento avviene attraverso propaggini pseudopoliposiche che fagocitano gocce di colloide, segue quindi la formazione di fagolisosomi, a livello dei quali enzimi idrolitici liberano dalla tireoglobulina T3 e T4, che vengono immessi in circolo attraverso il polo basale delle cellule follicolari, che è in stretto rapporto con i capillari, dotati di endotelio con rare fenestrate chiuse da diaframmi. La MIT e la DIT non accoppiate che sono state liberate dalla Tg riassorbita, vengono deiodinate all'interno dei tireociti, rendendo così lo iodio disponibile per la iodinazione di nuove molecole di Tg. Alterazioni della sintesi di ormoni tiroidei portano ad ipotiroidismo congenito: si tratta soprattutto di mutazioni a carico di TPO o di Tg, ma sono stati identificati anche difetti a carico del TSH-R, del NIS, della pendrina e

della generazione di perossido di idrogeno. La ghiandola risulta incapace di sintetizzare ormoni in quantità adeguata e ciò comporta un aumento del TSH e la comparsa di gozzo, anche di grosse dimensioni. La quantità di iodio disponibile condiziona fortemente l'attività tiroidea in quanto è un fattore indispensabile per la iodinazione della Tg e quindi della sintesi degli ormoni tiroidei: lo iodio ingerito viene legato dalle proteine sieriche, in particolare dall'albumina; la parte di iodio che non viene legata viene eliminata con le urine. La captazione dello iodio è mediata dal trasportatore sodio/iodio (NIS) che è espresso ad alti livelli sulla membrana basolaterale del tireociti (a bassi livelli si trova anche nelle ghiandole salivari, nella mammella durante l'allattamento e nella placenta). Il meccanismo di trasporto dello iodio è finemente regolato: bassi livelli di iodio fanno aumentare l'espressione del NIS e stimolano la captazione dell'elemento anche mediante un aumento della vascolarizzazione, mentre elevati livelli di iodio ne inibiscono l'organificazione (fenomeno di Wolff-Chaikoff). L'apporto giornaliero di iodio raccomandato è di 150 µg/die per gli adulti, 90-120 µg/die per i bambini e 200 µg/die per le donne in gravidanza. (1,2)

3.8 Trasporto e metabolismo degli ormoni tiroidei

La T4 viene secreta dalla tiroide in quantità circa 20 volte superiore della T3 ed entrambi gli ormoni sono veicolati da proteine plasmatiche: la TBG (Thyroxine Binding Globuline) ha bassa concentrazione, ma avendo alta affinità trasporta circa l'80% degli ormoni legati; la transtiretina (TTR) trasporta circa il 10% della T4 e una piccola quota di T3; l'albumina,

che ha affinità relativamente bassa ma alta concentrazione, trasporta il 10% della T4 e il 30% della T3. tali proteine sieriche hanno la funzione di aumentare il pool di ormoni circolanti, di ritardare la clearance ormonale e di regolare la distribuzione degli ormoni ai vari tessuti. Quando gli effetti delle proteine di legame sono combinati, risultano legati il 99,8 % di T4 e il 99,7% di T3: poiché la T3 è legata meno strettamente, la quota di T3 libera è maggiore di quella della T4, sebbene vi sia una minor quantità in valore assoluto di T3 totale in circolo. Solo l'ormone libero è biologicamente disponibile a livello tissutale e quindi i meccanismi omeostatici hanno lo scopo di mantenere un livello adeguato di ormone libero in circolo. (1,2).

3.9 Azione degli ormoni tiroidei

Gli ormoni tiroidei agiscono attraverso recettori specifici, di tipo α e β ($TR\alpha$ e $TR\beta$, Thyroid-hormone Receptor): il primo è espresso soprattutto nel cervello, nel rene, nelle gonadi, nel muscolo e nel cuore, mentre il secondo è maggiormente presente a livello dell'ipofisi e del fegato. I TR contengono un dominio di legame del DNA centrale e un dominio C-terminale per il legame con il ligando; i TR si legano a specifiche sequenze di DNA, denominate TRE (Thyroid Response Elements) nelle regioni promoter dei geni bersaglio: a seconda della natura degli elementi regolatori del gene bersaglio, i recettori attivati possono promuovere o inibire la trascrizione genica. I recettori si legano o come omodimeri o come eterodimeri con i recettori X dell'acido retinico (RXR). (1,2)

3.10 Patologia tiroidea

I noduli sono la più frequente patologia tiroidea: nei paesi in cui la carenza alimentare di iodio è stata corretta, ad esempio in USA, noduli tiroidei clinicamente manifesti sono presenti nel 4-7% della popolazione generale; la frequenza di tali nodi è nettamente superiore nei paesi con carenza iodica responsabile di endemia gozzigena. La frequenza di tali lesioni nodulari tiroidee non manifeste clinicamente e quindi rilevabili solo con l'ausilio dell'ecografia, è superiore al 50% nelle donne con età superiore a 60 anni; analogamente nelle casistiche autoptiche, l'incidenza di noduli tiroidei in ghiandole apparentemente normali può anche superare il 50%.

I noduli tiroidei sono l'espressione clinica di svariate patologie tiroidee, possono essere singoli o multipli e trovarsi nel contesto di una ghiandola ingrandita o anche normale.

Nella maggior parte dei casi i noduli tiroidei sono benigni: in casistiche cliniche meno del 5% dei noduli tiroidei risulta essere maligno, mentre in quelle chirurgiche la percentuale di malignità è variabile. Pertanto, data la bassa mortalità legata al tumore della tiroide e la piccola percentuale di noduli tiroidei maligni, è necessario limitare gli interventi chirurgici attraverso una rigorosa ed accurata selezione pre-chirurgica.

Nella diagnostica di un nodo tiroideo può essere utile la scintigrafia per diagnosticare se i noduli sono funzionanti o non funzionanti.

A seconda dell'origine geografica del paziente, i noduli funzionanti rappresentano fino al 20% dei noduli tiroidei e la loro frequenza è maggiore nei paesi dove persiste una carenza iodica. Solitamente si riscontrano oltre i 30 anni e sono 3-4

volte più frequenti nelle donne e, a parte rare eccezioni, sono benigni.

I noduli non funzionanti sono i più frequenti e rappresentano fino all'80% dei noduli tiroidei e grazie all'ecografia è possibile identificarne tre tipi:

1. **cistici** (fino al 15%): puramente liquidi e prevalentemente benigni;
2. **solidi**
3. **misti**: con componente solida o cistica.

Tra i solidi e i misti si ritrova la maggior parte dei noduli maligni. La proporzione di noduli tiroidei maligni tra tutti i noduli è del 50%; i noduli sono più facilmente maligni in soggetti maschi, in età > 60 anni, nei bambini e negli adolescenti. I noduli non funzionanti sono 10 volte più a rischio di patologia maligna nei bambini rispetto agli adulti senza una storia precedente di irradiazione esterna.

Più del 75% dei noduli maligni sono tumori differenziati della tiroide a partenza dalle cellule follicolari, in cui la prognosi è generalmente favorevole: si parla di carcinoma papillare e follicolare. Gli altri tipi di cancro sono molto meno frequenti: il carcinoma anaplastico si manifesta solitamente in pazienti anziani, ha prognosi infausta e a breve termine; il carcinoma midollare della tiroide (CMT) deriva invece dalle cellule C e rappresenta il 5-8% di tutti i tumori tiroidei.

I noduli, a seconda delle loro dimensioni, si possono distinguere in micro (< 1 cm) e macro (> 1 cm): nella maggior parte dei casi i micronoduli non hanno alcun significato clinico e, se non vi sono altri sospetti di malignità, non necessitano di alcun trattamento e sono sufficienti follow-up clinico ed ecografico.

È di fondamentale importanza distinguere i noduli benigni dai maligni: attualmente l'esame citologico tramite agoaspirato è in grado di risolvere il quesito nella maggior parte dei casi. Tale esame, se eseguito correttamente ed interpretato da un citologo esperto, permette di far diagnosi con un elevato grado di sensibilità e specificità: in primo luogo ciò comporta una drastica riduzione del numero di interventi chirurgici e in secondo luogo consente di programmare, se necessario, il tipo di intervento chirurgico più adeguato.

3.11 Diagnostica del nodulo tiroideo

Lo scopo del percorso diagnostico è triplice: 1) selezionare tra i noduli clinicamente rilevanti quelli che devono essere operati; 2) distinguere le lesioni benigne dalle maligne; 3) valutare la presenza di un'eventuale compressione della trachea o dell'esofago o del nervo laringeo ricorrente, anche in caso di patologia benigna (la presenza di compressione dei tessuti circostanti è un'indicazione al trattamento chirurgico).

Nel valutare un nodulo si inizia con l'anamnesi personale, volta a determinare una precedente irradiazione esterna sulla regione della testa e del collo durante l'infanzia, in quanto tutti i noduli comparsi in un soggetto irradiato in precedenza devono essere considerati sospetti di malignità. (3)

All'anamnesi segue l'esame clinico: la palpazione fornisce elementi utili riguardo il numero, le dimensioni e la consistenza dei noduli ed anche sulle caratteristiche della ghiandola tiroidea e sulla presenza di adenopatie cervicali. Gli elementi che insospettiscono, pur non essendo patognomonicamente di malignità, sono la presenza di adenopatie palpabili, durezza e irregolarità

del nodulo, fissità rispetto ai tessuti vicini e paralisi di una corda vocale. Sono infine da ricercare segni di ipo- e di ipertiroidismo.

Il carcinoma papillare della tiroide spesso si accompagna ad infiltrati linfocitari focali o anche diffusi con titoli di anticorpi variabili, anche molto alti; il dosaggio della Tg non fornisce alcuna informazione utile riguardo la natura del nodulo, mentre la calcitonina permette di far diagnosi preoperatoria di CMT.

Per quanto riguarda la diagnostica per immagini, l'ecografia è il primo esame da svolgere: permette lo studio di tutto il parenchima tiroideo, di ottenere una misura precisa della dimensione dei noduli, del loro numero esatto, del loro contenuto (solido, cistico o misto), delle caratteristiche della capsula e della vascolarizzazione. I noduli ipoecogeni sono più frequentemente maligni rispetto ai noduli iperecogeni. L'ecografia permette inoltre di distinguere, nel caso di una tiroidite, gli pseudonoduli dai veri noduli tiroidei. Dovranno essere studiate le stazioni linfonodali cervicali e l'infiltrazione loco-regionali. Per la diagnosi differenziale tra noduli tiroidei TAC e RMN non forniscono alcun elemento aggiuntivo.

Tabella I: Elementi clinico-anamnestici che indirizzano verso la diagnosi di carcinoma tiroideo

Elementi clinico anamnestici	Grado di rischio
Età: <20 o >60 anni	+
Sesso: maschi < femmine	+
Irradiazione su testa e/o collo	+++
Familiarità per carcinoma midollare	+++
Familiarità per carcinoma papillare	+
Nodulo singolo	+/-
Rapido accrescimento del nodulo	+
Crescita con terapia soppressiva con L-T4	++
Fissità, consistenza dura	++
Dolore, sintomi da compressione (disfagia, disfonia, dispnea)	++
Linfoadenopatia	++

Gli esami citati sino ad ora forniscono solo indicazioni di presunzione sulla natura di un nodulo, ma è solo l'esame citologico del materiale agoaspirato (FNA: Fine Needle Aspiration) che fornisce importanti elementi diagnostici.

Il prelievo viene eseguito con il paziente in posizione eretta, seduta o supina, a seconda della localizzazione del nodulo; si utilizza una siringa da 10-20 ml con ago da 22-25 G; il materiale ottenuto viene strisciato su uno o più vetrini e colorato con Papanicolau e May-Grunwald-Giemsa. Per poter far diagnosi è necessaria una certa quantità di cellule: secondo alcuni Autori almeno 10 gruppi di circa 20 tireociti (4). Ai fini della diagnosi è necessario che l'operatore abbia una buona manualità; nel caso di lesioni difficilmente palpabili il prelievo può essere eseguito sotto guida ecografia. Tale metodica è semplice, poco costosa, ben tollerata dal paziente e non richiede anestesia. Nel caso di gozzo multinodulare, considerata la possibile coesistenza di lesioni benigne e maligne, è indicato pungere i noduli di dimensioni significative o con aspetti ecografici sospetti.

I principali quadri citologici sono:

a) Noduli benigni

- *Gozzo nodulare*: la colloide è abbondante, sottoforma di materiale amorfo, omogeneo, con screpolature lineari; le cellule appaiono cubiche con scarso citoplasma, isolate o disposte in gruppi regolari di differenti dimensioni; la cromatina dei nuclei è leggermente granulare. Nei noduli cistici il materiale è variabile per quantità, colore e presenza di componente cellulare (nella maggior parte dei casi è ricco di

macrofagi frammati a sangue, raramente sono presenti tireociti);

- *Tiroiditi*: nelle forme granulomatose tipo la tiroidite di De Quervain sono presenti cellule giganti di tipo istiocitario, cellule epitelioidi, leucociti e tireociti con vistose alterazioni reessive; per le forme linfocitarie nello striscio vi sono numerosi linfociti in diversi stadi di maturazione, plasmacellule e cellule ossifile;
- *Adenomi macrofollicolari e normofollicolari*: presentano caratteri simili al gozzo nodulare.

b) **Neoplasie follicolari**: proliferazioni caratterizzate dalla presenza di follicoli di piccole dimensioni con sovrapposizione di nuclei e scarsa o assente colloide, in associazione con atipie citologiche nucleari: alla diagnosi istologica nel 85% dei casi si tratta di adenoma follicolare e nel 15% di carcinoma follicolare. La diagnosi differenziale tra neoplasia follicolare benigna e maligna non è possibile con la citologia, perché questa diagnosi viene fatta valutando l'invasione della capsula e dei vasi. Le neoplasie a cellule di Hurtle e solo la diagnosi istologica può accertarne la benignità o la malignità, solitamente caratterizzata da un alterato rapporto nucleo/citoplasma, irregolarità della membrana nucleare e la presenza di macronucleoli.

c) **Noduli maligni**:

- *Carcinoma papillare*: frammenti monostratificati di tessuto, strutture papillari, invaginazioni del citoplasma all'interno del nucleo, corpi psammomatosi e cellule giganti plurinucleate sono le caratteristiche principali. Nella variante follicolare di

tale carcinoma sono presenti numerosi follicoli; esiste infine una forma di carcinoma a cellule alte.

- *Carcinoma insulare*: si caratterizza per ammassi disordinati di cellule o può eventualmente mostrare un'organizzazione trasecolare; tipico è il fondo necrotico.
- *Carcinoma midollare*: si distingue per la presenza di cellule poligonali, triangolari o fusate, spesso binucleate. La presenza di sostanza amiloide può essere rivelata dalla colorazione con Rosso-Congo, mentre i caratteristici granuli citoplasmatici sono evidenziabili con la colorazione May-Grunwald-Giemsa. Sono utili le indagini immunocitochimiche per la calcitonina e la cromogranina.
- *Carcinoma anaplastico*: i vari istotipi presentano caratteri di malignità solitamente evidenti, come uno spiccato pleomorfismo cellulare, nuclei spesso multipli, grandi, ipercromatici o con cromatina distribuita irregolarmente, mitosi frequenti.
- *Linfomi e metastasi*: si caratterizzano entrambi per la marcata anaplasia cellulare; per individuare i linfomi più differenziati e per distinguere i linfomi ad alto grado dai carcinomi è spesso indispensabile l'indagine immunocitochimica.

I limiti principali della FNA sono la presenza di falsi negativi, falsi positivi, campionamento inadeguato (5,6,7,8,9) e, come già accennato, difficile distinzione tra patologie follicolari benigne e maligne. (10,11) In un recente studio sono stati valutati i risultati ottenuti con citologia e quelli con istologia ed i primi hanno mostrato una sensibilità di 96,4%, una specificità di 81,6%, 11,6% di falsi positivi (FP) e 6,1% di falsi negativi (FN). Le percentuali di FN non si discostano da quelle riportate

in Letteratura (5,6,7,8,12,13), mentre quella dei FP è un po' superiore a quelle riportate (4-8%) (5,8,9) probabilmente per la presenza di alterazioni nucleari atipiche.

Considerati i limiti della FNA, per aumentarne sensibilità e specificità, si è proposto di ripetere l'esame sotto guida ecografica nei casi dubbi ed anche di utilizzare markers immunoistochimici.

3.12 Galectina

Sebbene la FNA costituisca il principale strumento diagnostico nell'inquadramento della patologia nodulare tiroidea, nel 15-20% delle lesioni nodulari si repertano "lesioni follicolari indeterminate o d'incerto potenziale maligno": si tratta di lesioni riconoscibili sul piano istologico a patologia sia benigna che maligna. Tali lesioni richiedono l'exeresi, ma solo il 18-24% dei soggetti operati presenta diagnosi definitiva di malignità, evidenziando la frequente inutilità dell'intervento chirurgico. (9,14,15) Si è pertanto proposto l'impiego di marcatori immunoistochimici di malignità nella diagnosi differenziale della patologia nodulare tiroidea.

Durante la trasformazione e la progressione neoplastica avvengono cambiamenti fenotipici che condizionano le interazioni tra le cellule tumorali e tessuti dell'ospite con neoespressione e/o modulazione di molecole della superficie cellulare, del citosol, e della matrice extracellulare che svolgono un ruolo funzionale nella crescita e migrazione delle cellule neoplastiche. Particolarmente importante è l'individuazione di molecole definite "antigeni tumore-associati", preferenzialmente espresse nelle cellule trasformate

rispetto a quelle normali. Nell'ambito delle modificazioni fenotipiche riguardanti le cellule follicolari, ha destato particolare interesse la *Galectina-3*, una glicoproteina di 31 kDa coinvolta nella regolazione dell'espressione genica e delle interazioni eterotipiche tra cellule e matrice extracellulare; l'espressione di tale molecola appare limitata ai tireociti che hanno subito una trasformazione maligna. Studi retrospettivi in vitro (RT-PCR) ed in vivo (immunocitochimici), hanno messo in evidenza il valore predittivo di malignità dell'espressione di Galectina-3 (16-19). Galectina-3 è un *target* fisiologico dell'attività trascrizionale di p53 ed è stato anche dimostrato che ai fini dell'apoptosi mediata da p53, è richiesta una *down-regulation* della Galectina-3 sempre ad opera della stessa p53: ciò significa che un'espressione aberrante di Galectina-3 è in grado di arrestare il programma di apoptosi. Nel corso di uno studio multicentrico (20,21) l'espressione di Galectina-3 è stata valutata su oltre 1000 noduli tiroidei, utilizzando un approccio immunoistocitochimico ed un anticorpo monoclonale specifico per Galectina-3. la sensibilità è risultata pari al 99%, la specificità al 98%, il valore predittivo positivo al 92% e l'accuratezza diagnostica al 99%.

Da un nostro studio del 2002 si è confermato che l'utilizzo di Galectina-3 nell'inquadramento preoperatorio dei nodi tiroidei è un test altamente accurato, anche se non possiede valore assoluto nel definire la benignità o la malignità di una determinata lesione.

Recentemente Bartolazzi e altri (22) hanno condotto uno studio da cui è emerso che il *Galectine-3 thyrotest* presenta sensibilità del 78%, specificità del 93%, valore predittivo positivo 82%, valore predittivo negativo 91%, alla luce di 9% di falsi negativi

e 17% di falsi positivi. Da ciò consegue che tale test non può rimpiazzare la citologia convenzionale, ma è piuttosto un metodo diagnostico complementare per quei noduli di significato incerto. Esistono anche studi discordanti con quelli appena citati, probabilmente per una differente valutazione del grado di invasione capsulare e vascolare. (23-26)

Oltre a Galectina-3 è stata studiata anche Galectina-7 (27,28): sembra non esservi alcuna differenza tra l'espressione di questa molecola in noduli benigni e maligni.

Nel 2005 Saggiorato e altri (29) hanno condotto un interessante studio per individuare dei markers immunocistochimici da affiancare alla FNA, nei casi in cui questa risultasse dubbia. Oltre alla già nota Galectina-3, essi analizzarono anche HBME-1, proteina che individua un epitomo di superficie cellulare sconosciuto espresso nei mesoteliomi e nella maggioranza dei carcinomi tiroidei (30,31), TPO, Citocheratina-19 (CK-19) presente nell'epitelio semplice e nelle cellule basali dell'epitelio stratificato, Keratan-solfato (KS). Ne è risultato che tutti e cinque i markers sono significativamente più espressi nei carcinomi piuttosto che negli adenomi; inoltre l'espressione di Galectina-3, HBME-1, CK-19 e KS è più frequente nei carcinomi papillari che nei follicolari. Il medesimo gruppo ha verificato se la combinazione di più markers potesse essere vantaggiosa: le associazioni più valide sono risultate Galectina-3 + HBME-1 (accuratezza 94,4%) e Galectina-3 + CK-19 (92,8%); la combinazione invece di tre marker non è risultata vantaggiosa.

3.13 Anatomia patologica della tiroide

Tumori benigni di origine follicolare

Si tratta di tumori piuttosto frequenti e l'esame anatomico-patologico consente di riconoscere gli adenomi follicolari (tumori benigni, capsulati ed unici) dai noduli (lesioni non capsulate e spesso multiple, composte da cellule non funzionanti, ben differenziate che circondano ampi follicoli ripieni di colloide). Gli adenomi follicolari possono essere formati da follicoli ben differenziati o rudimentali e addirittura i follicoli possono mancare; possono esservi inoltre delle forme intermedie. Nel caso di noduli molto voluminosi, si possono osservare anche zone emorragiche, edematose o fibrose.

L'unico criterio che permette di classificare un tumore follicolare come benigno è l'assenza di invasione vascolare e capsulare: bisogna studiare numerose sezioni e specialmente la periferia del tumore. A differenza di quanto si è osservato negli studi di carcinogenesi condotti sui topi, nell'uomo vi sono solo evidenze indirette del fatto che un carcinoma follicolare possa svilupparsi a partire da un adenoma: le neoplasie follicolari si manifestano ad un'età più avanzata rispetto agli adenomi, i micro carcinomi follicolari sono rari, all'interno degli adenomi vi sono delle aree di maggior densità cellulare che si possono considerare come zone ad espansione clonale, i carcinomi follicolari contengono delle aree la cui morfologia ricorda quella degli adenomi.

Carcinomi differenziati delle cellule follicolari

Carcinoma **papillare** della tiroide: in base alle dimensioni e all'estensione, si distinguono i microcarcinomi (diametro < 1

cm, a prognosi ottima) (32), i carcinomi intra-tiroidei e i carcinomi extra-tiroidei.

La forma istologica classica si riscontra nel 70% dei casi e si tratta di tumori di consistenza aumentata, non capsulati o solo parzialmente capsulati; alcuni carcinomi sono in parte necrotici e la presentazione sottoforma di tumefazione cistica è piuttosto rara. (33) Con una frequenza variabile tra il 20-80% i carcinomi papillari sono multifocali in uno o entrambi i lobi. (34)

A livello microscopico tali carcinomi contengono papille focali o diffuse: ogni papilla è formata da un asse connettivo-vascolare rivestito di cellule. Le papille devono essere distinte dalle pseudo-papille e dalle macro-papille osservabili nel morbo di Basedow, nei noduli benigni o nei gozzi con ipotiroidismo. Oltre alle papille si possono riconoscere follicoli ripieni di colloide con un aspetto più compatto, trasecolare o globulare; possono infine esservi aree di metaplasma malpighiana.

Nel 40-50% di questi tumori si apprezzano dei corpi psammomatosi, formati da depositi di calcio a livello dello stroma: sono caratteristici di tale carcinoma e si trovano a livello dell'asse delle papille o nello stroma tumorale. (35)

Infine a livello del tessuto tumorale o della periferia è tipica la presenza di aree di sclerosi. Gli aspetti sino ad ora citati non sono affatto costanti e la loro assenza non esclude la diagnosi di carcinoma papillare; la diagnosi di cancro papillare si basa infatti sulla morfologia dei nuclei: sono più voluminosi di quelli delle cellule normali, nelle varie sezioni istologiche tendono ad apparire sovrapposti, sono pallidi con aspetto a "vetro smerigliato", presentano una membrana nucleare

ispessita, alcuni possono presentarsi a forma di chicco di caffè, alcuni mostrano una pseudoinclusione di grosse dimensioni, rotonda, ben delimitata che corrisponde ad una invaginazione intranucleare del citoplasma. Alla superficie del tumore spesso si osservano linfociti sparsi.

L'invasione linfonodale del carcinoma papillare è precoce e frequentemente coinvolge le catene ricorrentiali; l'invasione dei vasi sanguigni è invece più rara; nel 5-7% dei casi si osservano metastasi a distanza che interessano soprattutto polmone e scheletro. (37)

Il 15-20% dei carcinomi follicolari ha degli aspetti istologici meno tipici e vengono inclusi tra i papillari in virtù delle anomalie nucleari. La più frequente variante è quella follicolare: è un tumore grossolanamente capsulato formato esclusivamente da follicoli ripieni di colloidi, mostra un'intensa reazione fibrosa, importante infiltrato linfocitario e corpi psammomatosi sparsi; può anche svilupparsi sino a dare metastasi polmonari, che però rispondono bene al trattamento. Tale variante follicolare colpisce solitamente soggetti giovani (rappresenta il 20% dei carcinomi papillari diagnosticati in Bielorussia dopo l'incidente di Chernobyl) (37) ed ha prognosi che si avvicina molto a quella delle forme classiche.

Esistono poi forme diffuse sclerosanti che si presentano con un ingrandimento globale della tiroide e sono solitamente multifocale; le papille sono associate a metaplasia malpighiana, a densa fibrosi e ad abbondanti corpi psammomatosi; è inoltre frequente il riscontro di un importante infiltrato linfocitario. In quasi tutti i casi sono presenti sin dall'inizio metastasi linfonodali. Tali forme hanno una prognosi meno favorevole

rispetto alle forme classiche. Sono forme che si manifestano quasi esclusivamente in bambini e giovani adulti. (38)

Infine vi sono varianti a cellule alte o cilindriche: si tratta molto spesso di neoplasie voluminose che invadono i tessuti peritiroidei. Sono composte di papille rivestite di cellule la cui altezza è almeno il doppio della larghezza e con citoplasma granuloso ed eosinofilo. Sono forme tipiche dei soggetti anziani ed hanno prognosi nettamente più severa delle forme classiche. Le forme capsulate costituiscono l'8-13% dei casi ed hanno prognosi favorevole.

Nei bambini piccoli spesso l'estensione della malattia al momento della diagnosi è avanzata; inoltre i tumori non sono solitamente capsulati, spesso sono invasivi e presentano aspetti solidi con architettura trabecolare, corpi psammomatosi ma non papille. (37)

Infine nei soggetti affetti dalla sindrome di Gardner sono frequenti carcinomi multicentrici con aspetti papillari associati a zone solide e a cellule fusate.

Carcinoma **follicolare** della tiroide: a differenza del carcinoma papillare si presenta abitualmente come un nodulo tiroideo unico, più o meno capsulato. A seconda del grado di invasione della capsula e dei vasi, si distinguono la forma minimamente e la forma altamente invasiva: l'invasione capsulare non sembra correlare con la prognosi a differenza invece del grado di angioinvasività. I carcinomi minimamente invasivi (50% dei carcinomi follicolari) sono difficili da diagnosticare. Nei carcinomi invasivi la diagnosi di invasività è più semplice grazie alla più evidente invasione vascolare, tiroidea o extratiroidea. Dal punto di vista microscopico il grado di

differenziazione è diverso da un tumore all'altro e la morfologia risulta pertanto variabile: può essere ben differenziata con follicoli di dimensioni variabili, ripieni di colloide o poco differenziata con microfollicoli ed aspetti trabecolari, privi di colloide.

Tale carcinoma presenta delle varianti: i carcinomi a cellule chiare sono rari ed hanno caratteristiche morfologiche e cliniche identiche a quelle del carcinoma follicolare; i carcinomi a cellule ossifile o di Hurtle, che si presentano microscopicamente come noduli tiroidei solitari, formati da cellule di origine follicolare di grandi dimensioni, con citoplasma abbondante, granulare per la presenza di numerosi mitocondri (39) ed eosinofilo, grandi nuclei con nucleolo prominente.

È bene ricordare che le cellule ossifile si possono osservare anche nei carcinomi papillari e nelle malattie benigne della tiroide, le tiroiditi autoimmuni, il gozzo nodulare e i noduli benigni unici. Tali carcinomi tendono ad invadere i tessuti limitrofi e sono frequenti le recidive loco-regionali.

Vi sono infine i carcinomi insulari: sono rari, differenziati e altamente invasivi, frequentemente metastatizzano sia a livello linfonodale che a distanza, ed hanno prognosi sfavorevole. (40)

Il carcinoma follicolare normalmente invade i vasi sanguigni e più raramente i linfatici; la diffusione metastatica, frequente soprattutto nelle forme altamente invasive, avviene per via ematica ai polmoni, alle ossa e più raramente all'encefalo.

Altri tumori della tiroide sono il carcinoma **anaplastico** (5-15% dei tumori tiroidei), che è uno dei tumori più aggressivi nell'uomo, il carcinoma **midollare** e altri tumori rari che includono i **linfomi primitivi**.

3.14 Generalità sui carcinomi tiroidei differenziati

L'incidenza annuale del cancro della tiroide è compresa tra 1,2-2,6/100000 negli uomini e 2,0-3,8/100000 nelle donne (41), ed in molte aree del mondo sta rapidamente aumentando (42-45): in alcuni paesi come l'Islanda e le Hawaii l'incidenza è circa due volte superiore rispetto a quella dei paesi dell'Europa del Nord, del Canada, degli USA e di Israele.

La prevalenza del PTC in USA risulta essere di circa 350000 individui (circa 270000 donne e 80000 uomini). Tale tumore rappresenta circa il 2% di tutti i nuovi tumori diagnosticati annualmente in USA, e l'età media al momento della diagnosi è di 47 anni. (46)

La mortalità annua per cancro della tiroide è compresa tra 0,2-1,2/100000 negli uomini e 0,4-2,8/100000 nelle donne; nella maggior parte dei paesi la mortalità per cancro della tiroide è due volte più elevata nelle donne che negli uomini. Si tratta di un tumore relativamente indolente, curabile, però comunque il 20% recidiva a 10 anni e il 30% a 30 anni (47). Il rischio di morte per tumore aumenta quando questo diviene chirurgicamente inoperabile e quando perde la capacità di fissare lo iodio. L'età media dei pazienti che muoiono per tumore alla tiroide è circa 73 anni (0,1% dei pazienti muoiono ad un'età al di sotto di 20 anni, 0,8% in età 20-34 anni, 3% in età 35-44, 8,8% in età 45-54, 17% in età 55-64, 24% in età 65-74 e 47% ad un'età superiore a 75 anni). (46)

La sopravvivenza a 5 anni è del 97% in USA e in Europa è del 81% nelle donne e 73% negli uomini.

L'incidenza del cancro della tiroide in funzione delle differenze etniche permette di studiare il ruolo dei fattori genetici, dei

fattori ambientali e della loro associazione: negli USA è più frequente nelle donne e negli uomini caucasici rispetto ai neri, ai portoricani e ai soggetti di origine ispanica; inoltre l'incidenza nelle donne di origine giapponese o cinese è doppia di quella osservata nei loro paesi di origine: si può pertanto avanzare l'ipotesi che tali differenze siano legate a fattori ambientali, in particolare alle abitudini alimentari.

L'influenza del sesso e dell'età sull'incidenza del cancro è ben documentata: il cancro della tiroide è 4 volte più frequente nelle donne che negli uomini (41), è raro nei bambini al di sotto dei 16 anni, nei quali ha un'incidenza annua di 0,02-0,3/100000, mentre nell'adulto l'incidenza aumenta con l'età; l'età media alla diagnosi è compresa tra 45 e 50 anni; la distribuzione delle forme istologiche è in funzione dell'apporto alimentare di iodio: nei paesi dove l'apporto è normale prevalgono i carcinomi differenziati, papillari (60-80% dei casi) e follicolari, mentre nelle regioni dove permane una carenza alimentare di iodio la percentuale del carcinoma papillare è più bassa, mentre è maggiore quella dei carcinomi follicolare e anaplastico.

In numerosi registri nazionali dei tumori è stato riportato un apparente aumento dell'incidenza di tutti i tipi istologici di carcinoma tiroideo differenziato (41) oltre che una riduzione delle dimensioni medie del tumore, della frequenza delle linfadenopatie cervicali palpabili e delle metastasi a distanza: tale aumento però è da imputare ad una maggiore accuratezza diagnostica e ad una diagnosi più precoce, ad una migliore educazione sanitaria, all'impiego diffuso dell'esame ecografico del collo ed al miglioramento delle tecniche citologiche ed istologiche.

Dai registri nazionali si può anche rilevare una diminuzione della mortalità per cancro alla tiroide: tale risultato positivo può essere in parte spiegato da un migliore apporto alimentare di iodio (che comporta la diminuzione dei casi di carcinoma follicolare e anaplastico ed un aumento delle forme papillari a prognosi più favorevole) ma anche da una diagnosi più precoce, dal miglioramento delle tecniche di trattamento e di *follow-up*.

Da diversi studi epidemiologici si sono potuti individuare i principali fattori di rischio del cancro della tiroide: precedente irradiazione esterna, storia familiare, preesistente malattia tiroidea, fattori ormonali e gravidanze, apporto alimentare di iodio ed altri fattori legati all'alimentazione e all'ambiente. (44,47-51)

- *Precedente irradiazione esterna*: lo studio dei soggetti che hanno ricevuto irradiazione esterna sul collo nell'infanzia ha suggerito l'esistenza di una predisposizione genetica a sviluppare il tumore della tiroide radioindotto;
- *Storia familiare*: alcune rare malattie familiari si associano ad un'elevata prevalenza di noduli tiroidei e di cancro della tiroide, soprattutto papillare. I soggetti affetti da *poliposi del colon* hanno un rischio 100 volte più elevato della popolazione generale di sviluppare un cancro alla tiroide (52): tali neoplasie si sviluppano soprattutto nelle donne con età inferiore a 35 anni, sono spesso multicentriche, associate ad aspetti papillari classici; al contrario la poliposi del colon è eccezionale nel cancro della tiroide. Nel 3% circa dei pazienti affetti da cancro

della tiroide, la storia familiare dimostra l'esistenza di un congiunto anch'egli affetto da carcinoma della tiroide;

- *Storia precedente di patologia tiroidea benigna*: svariati studi hanno dimostrato che una storia di nodulo tiroideo benigno e anche di gozzo, seppur in misura minore, è frequente nei soggetti affetti da cancro della tiroide. (41,53) il tasso di malignità dei noduli è aumentato in alcuni pazienti con morbo di Basedow ma non nel caso di tiroidite di Hashimoto: Larson e altri hanno condotto uno studio da cui è emerso che il 37,75% dei PTC si sviluppa in ghiandole affette dalla tiroidite di Hashimoto. Ne hanno concluso che i pazienti con tiroidite di Hashimoto hanno una probabilità maggiore (circa 3 volte) di sviluppare cancro alla tiroide ipotizzando l'esistenza di una forte associazione tra l'infiammazione cronica e lo sviluppo della neoplasia. Sempre nel medesimo studio si è documentata una "over-espressione" di PI3k/Akt sia nelle tiroiditi di Hashimoto che in tumori tiroidei ben differenziati, suggerendo che la via PI3k/Akt potrebbe avere un ruolo nel processo di carcinogenesi; sono però necessari ulteriori approfondimenti per stabilire il ruolo di questi fattori. (54) Anche un'iperstimolazione significativa e prolungata da parte del TSH, come avviene ad esempio nel gozzo congenito da disormonogenesi, può favorire l'insorgenza di un carcinoma differenziato clinicamente manifesto;
- *Fattori ormonali e gravidanze*: il rapporto F/M è circa 1 prima della pubertà e dopo la menopausa; è invece variabile tra 2 e 4 nell'età media. Nonostante le numerose associazioni descritte, non è ancora chiarito il motivo della predominanza del

carcinoma tiroideo nelle donne: quelle che hanno avuto una pubertà precoce e cicli mestruali regolari sembrano avere un rischio più basso di sviluppare cancro, mentre quelle che hanno sofferto di cisti ovariche o che hanno avuto una menopausa tardiva hanno un rischio lievemente superiore. Inoltre le donne che hanno portato a termine una o più gravidanze, che hanno avuto una prima gravidanza in età avanzata, che hanno avuto aborti spontanei, soprattutto nel corso della prima gravidanza o quelle donne che hanno sofferto di infertilità per carenza di progesterone hanno un rischio relativamente più alto di sviluppare il cancro della tiroide. L'uso di contraccettivi estro-progestinici o di estrogeni per il trattamento della menopausa, non aumenta il rischio di cancro alla tiroide; potrebbe esservi anche una associazione tra neoplasie tiroidee e cancro della mammella, ma sono in corso degli studi per chiarire la questione;

- *Apporto alimentare di iodio*: nelle regioni carenti di iodio la prevalenza dei noduli tiroidei è più elevata rispetto alle regioni dove l'apporto è sufficiente e quindi l'incidenza di cancro alla tiroide è lievemente maggiore. Rispetto alle regioni con normale apporto iodico, i tipi istologici follicolare e anaplastico sono più frequenti rispetto alle forme papillari. (41,55) Quindi la profilassi iodica è seguita da un aumento relativo dei cancri papillari ed una diminuzione di quelli follicolari e anaplastici.

3.15 Fattori prognostici

La grande maggioranza dei pazienti con carcinoma tiroideo differenziato hanno una alta probabilità di guarigione completa e una bassa probabilità di recidiva; tuttavia una piccola percentuale di pazienti è ad “alto rischio” di recidiva e morte: tali pazienti possono essere identificati al momento della diagnosi grazie all’esame di alcuni fattori prognostici e quindi indirizzati verso un trattamento e monitoraggio post-chirurgici adeguati.

I fattori prognostici più significativi possono essere suddivisi in personali, demografici, istopatologici, molecolari e legati alle dimensioni del tessuto tumorale; esistono anche implicazioni prognostiche correlate al tipo di trattamento iniziale e ai livelli di tireoglobulina post-operatori.

- *Età e sesso*: l’età alla diagnosi è di gran lunga il fattore prognostico più importante per i carcinomi tiroidei differenziati. Il rischio di morte e di recidiva aumentano significativamente con l’aumentare dell’età alla diagnosi. (56,57) Il rischio aumenta in modo lineare, specialmente oltre i 40-45 anni; nei pazienti oltre i 60 anni il tumore tende ad essere localmente invasivo, frequentemente associato a metastasi a distanza, di variante istologica spesso meno differenziata. Tali caratteristiche non sono comunque sufficienti a spiegare la prognosi meno favorevole; si ipotizza che il rischio aumenti con l’avanzare dell’età perché interverrebbero eventi genetici successivi rispetto all’inizio della malattia;

- *Coesistenza di patologia tiroidea autoimmune*: l'associazione di autoanticorpi anti-tiroide e carcinoma tiroideo è presente nel 20% dei pazienti (58); l'andamento clinico e la risposta alla terapia nei pazienti con o senza autoanticorpi al momento della diagnosi sono del tutto sovrapponibili. La scomparsa degli autoanticorpi dopo il trattamento del tumore conferma l'avvenuta eradicazione;
- *Varianti istologiche*: il carcinoma papillare è di gran lunga il più frequente (circa il 70-80% dei casi (42,43,59)), soprattutto nelle aree geografiche con adeguato apporto di iodio. La forma "classica" di tale tumore ha la miglior prognosi, assieme alla variante "incapsulata" e a quella "follicolare", mentre una prognosi molto sfavorevole è legata alle varianti "a cellule alte", "a cellule colonnari" e a "cellule ossifile", le forme "sclerosanti" hanno una prognosi intermedia: l'aggressività del tumore va via via decrescendo se si passa dal PTC a cellule alte, a quello classico ed infine alla forma follicolare. (42,60-63) La prognosi dei carcinomi follicolari dipende in larga misura dal potenziale di invasività del tumore a livello micro- e macro-scopico: la prognosi è buona quando si tratta di carcinomi scarsamente invasivi, mentre diventa sfavorevole se sono più invasivi. È più importante ai fini prognostici l'invasione vascolare rispetto a quella capsulare. Tra le forme follicolari le varianti a prognosi peggiore sono quelle a cellule di Hurtle (ossifile) e quelle "insulari". Infine qualsiasi carcinoma differenziato che mostri foci di dedifferenziazione al suo interno deve essere considerato e trattato come un carcinoma anaplastico.

- *Estensione del tumore*: comprende sia le dimensioni del tumore primitivo che la presenza e l'estensione di eventuali metastasi locali e a distanza. Come già riportato, le dimensioni dei tumori sono piuttosto variabili: da 1 cm (microcarcinomi) a 5 cm (macrocarcinomi). I microcarcinomi hanno un'eccellente prognosi sebbene possano associarsi a metastasi linfonodali; la prognosi va invece peggiorando all'aumentare delle dimensioni del tumore primitivo, sia in termini di rischio di recidive che di mortalità tumore-specifica. (64,65) La multifocalità del tumore primitivo, frequente nei tumori papillari piuttosto che nei follicolari, è un parametro sfavorevole in termini di probabilità di metastasi linfonodali, di persistenza di malattia locale, di recidive regionali, di metastasi a distanza e mortalità. (55,66)
- *Metastasi linfonodali e a distanza*: in passato la presenza di metastasi linfonodali era considerata ininfluenza ai fini prognostici, mentre più recentemente si è osservato che si associa a recidive e aumentata mortalità con una frequenza significativa. (65,67) La presenza di metastasi a distanza al momento della diagnosi è il fattore prognostico più sfavorevole nel carcinoma tiroideo differenziato, sia papillare (65,67-69) che follicolare. I fattori che aggravano la prognosi legata alle metastasi a distanza sono rappresentati dalle molteplicità delle metastasi, dalla localizzazione allo scheletro, dalle dimensioni, dall'età più avanzata e dalla mancanza di attività iodio-captante. La prognosi migliore si ha nel caso di micrometastasi diffuse a livello polmonare, non visibili con RX standard del torace, captanti il radioiodio in soggetti giovani. (69)
- *Fattori prognostici legati al trattamento iniziale*: la prognosi finale è fortemente influenzata dal trattamento iniziale, infatti la rimozione incompleta di foci tumorali, così come una

tiroidectomia subtotale si associano ad elevato rischio di recidiva e ad una prognosi peggiore. La tiroidectomia totale o quasi totale riduce significativamente il rischio di recidive; inoltre è stata dimostrata una maggior frequenza di recidive nei pazienti non sottoposti a radioablazione del residuo tiroideo rispetto a quelli “radio-ablati”: il rationale per l’ablazione del residuo con radioiodio è la possibilità di distruggere eventuali microfoni tumorali che permangono dopo l’intervento chirurgico. Nei pazienti a basso rischio al momento della diagnosi trattati con tiroidectomia totale l’ablazione del residuo non sembra conferire una prognosi migliore rispetto a quella dei pazienti non sottoposti a radio-ablazione.

Esistono vari sistemi prognostici di stadiazione del rischio che si basano sulla combinazione di più fattori di rischio in analisi multivariata, allo scopo di suddividere i pazienti in gruppi con rischio elevato, intermedio o basso di recidiva e/o di morte.

I sistemi più significativi sono: EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), IGR (sviluppato dall’Istituto Gustave Roussy di Villejuif), TNM (messo a punto dall’International Union Against Cancer), Università di Chicago, MACIS (Mayo Clinic), Ohio State University.

Il sistema internazionale di riferimento più utilizzato è senza dubbio il TNM: esso prende in considerazione, separatamente per i vari istotipi, l’età, l’estensione del tumore primitivo, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza. Identifica quattro classi di pazienti con un rischio di morte a 11,3 anni rispettivamente del 1,7%, 15,8 %, 30% e 60,9%.

3.16 Tireoglobulina

La Tireoglobulina (Tg) è una glicoproteina composta di due subunità di 330 kDa, tra loro uguali ed è prodotta solo dalle cellule follicolari tiroidee. La trascrizione del gene della Tg (cromosoma 8q24.2-8q24.3) è regolata da TTF1, TTF2, Pax8 e può essere influenzata da ormoni come TSH, dagli anticorpi che vanno a stimolare il TSH-R (TSI), tipici del morbo di Basedow, IL-1, insulina, IGF1, che stimolano l'espressione di tale proteina (70-74); EGF, IFN γ , TNF α inibiscono invece l'espressione genica della TG. (75-81)

La Tg viene misurata attraverso le tecniche IMA (ImmunoMetric Assay) o RIA (RadioImmuno Assay). Il limite maggiore di queste tecniche è la presenza di anticorpi anti-Tg che possono interferire con le misurazioni. È pertanto necessario accertarsi della presenza di anticorpi anti-Tg contestualmente alla misurazione della Tg.

Tutti i soggetti normali presentano valori rilevabili di Tg e la misurazione di tali concentrazioni è il risultato di tre fattori: 1) massa tiroidea; 2) presenza di danno tiroideo in seguito a chirurgia, tiroiditi, emorragie, radiazioni, agenti chimici, farmaci; 3) TSH, hCG, TSI. (70,82-90)

La gran parte dei tumori tiroidei differenziati mantiene la capacità di produrre Tg, sebbene il contenuto cellulare di mRNA di Tg tenda ad essere minore che nel tessuto tiroideo normale. (91-93) Il contenuto in mRNA e proteina Tg è variabile nei carcinomi tiroidei e correla poco con le concentrazioni di Tg sierica. (94-97) I carcinomi anaplastici producono una scarsa quantità di Tg, mentre nei tumori tiroidei differenziati la produzione di Tg varia a seconda del grado di

differenziazione del tumore (92,98): quando questi carcinomi si dedifferenziano diminuiscono i valori di NIS, TSHR ed anche la concentrazione di Tg, rispettivamente in ordine di scomparsa.

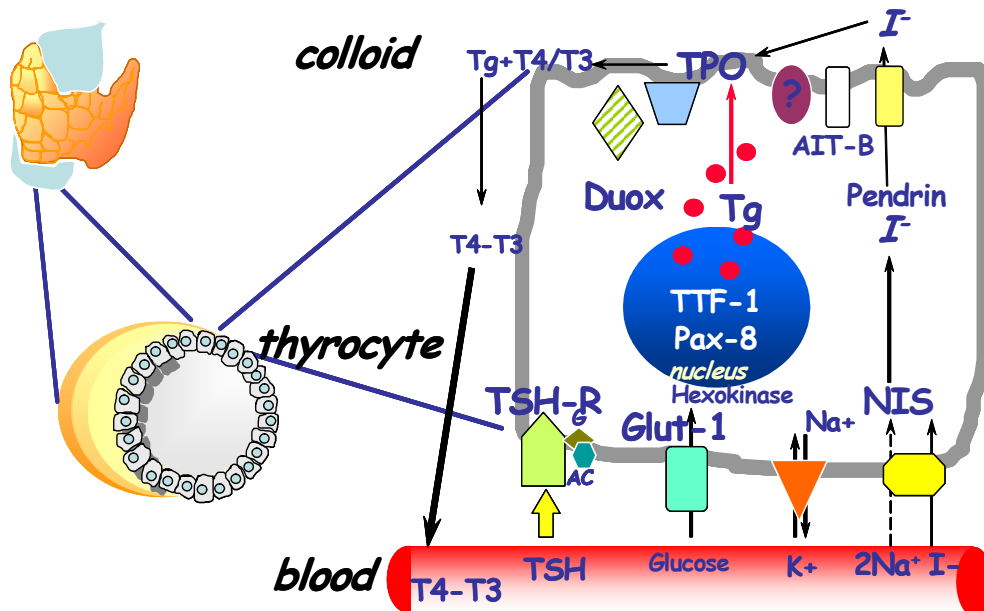
Molti pazienti con carcinoma tiroideo, specialmente follicolare, al momento della diagnosi presentano livelli elevati di Tg (99-100); bisogna comunque ricordare che alte concentrazioni di Tg non necessariamente sono associate a patologia neoplastica, in quanto anche pazienti con noduli benigni funzionanti possono avere alti valori di Tg. (99) Nei pazienti con carcinoma tiroideo, i valori preoperatori della concentrazione di Tg correlano con il grado di differenziazione e con l'estensione del tumore (99-103) ed in particolare i pazienti che presentano già metastasi (in particolare ossee) hanno le più alte concentrazioni di Tg (spesso > 1000 µg/L). (104,105) Un'alta concentrazione sierica di Tg preoperatoria non solo indica che il tumore produce Tg, ma anche che la misurazione postoperatoria di Tg potrà essere utile per valutare la radicalità dell'intervento chirurgico (106-107); pazienti con un tumore più esteso al momento della diagnosi tendono ad avere valori di Tg postoperatoria più alti. (106,108,109)

Dopo la tiroidectomia e la terapia radioablativa, i pazienti vengono monitorati per molto tempo, al fine di individuare precocemente eventuali recidive, attraverso controlli seriatî della Tg. (109,110) La specificità della misurazione della Tg è superiore in quei pazienti che non hanno alcun residuo tiroideo. (107-111). Le concentrazioni postoperatorie di Tg dovrebbero essere sempre valutate tenendo conto del tipo di analisi utilizzata, dell'estensione dell'intervento chirurgico, dell'eventuale somministrazione di radioiodio, della

concentrazione di TSH sierico. Circa l'80% dei pazienti con tumore tiroideo hanno valori postoperatori di Tg non rilevabili ($< 1\mu\text{g/L}$) mentre sono in terapia soppressiva con L-Tiroxina (112), e nel 20% di questi pazienti, una volta sospesa la terapia con L-Tiroxina o somministrato TSH, la Tg raggiunge valori misurabili (113): questi pazienti devono essere valutati con l'ecografia del collo ed altre tecniche di *imaging* per scoprire la possibile recidiva (113,114). Non tutti i pazienti che presentano un rialzo della concentrazione sierica di Tg hanno una recidiva del tumore: in alcuni l'aumento della Tg è da imputare alla persistenza di tessuto tiroideo sia dopo l'intervento chirurgico che dopo la terapia radio ablativa (111,115,116), in altri l'ecografia e la diagnostica con radioiodio non dimostrano alcuna evidenza di recidiva (113,117-120). In alcuni infine la recidiva è visibile soltanto dopo somministrazione di ^{131}I ad alte dosi (118-122). Quando i tumori progressivamente si dedifferenziano perdendo la capacità di captare radioiodio per una diminuzione nell'espressione di NIS, oltre alla perdita dei TSHR, sarà necessario eseguire la PET-TC previa somministrazione di ^{18}F -FDG. (123,124)

Nonostante alcune discrepanze tra i valori di Tg e le tecniche di *imaging* utilizzate per studiare un'eventuale recidiva, il valore della misurazione della Tg sierica resta comunque alto, soprattutto dopo stimolazione con TSH. Tra i pazienti con Tg $< 1\mu\text{g/L}$, l'80% dopo stimolazione con TSH non presenta alcun incremento di Tg, indicando che tali pazienti possono essere considerati liberi dalla malattia; tra i pazienti invece che dopo stimolo con TSH mostrano un aumentato livello di Tg, meno del 50% mostra un'evidenza di recidiva. (113,114,125-130)

Figura 1: caratteristiche funzionali della cellula tiroidea



Le cellule neoplastiche mantengono alcune caratteristiche tipiche delle cellule follicolari: oltre alla capacità di produrre Tg, nel 70-80% dei casi mantengono la capacità di captare lo iodio e di crescere in maniera dipendente dal TSH, caratteristiche utili per il *follow-up*.

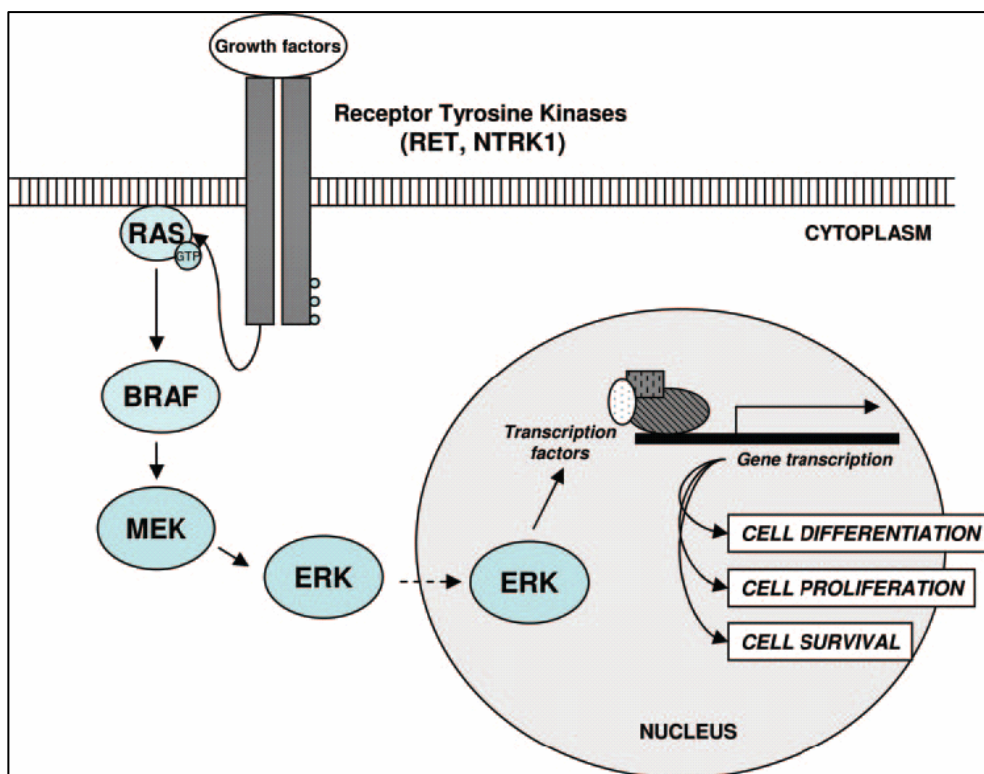
3.17 Genetica

Nei carcinomi tiroidei sono state identificate numerose anomalie genetiche che portano ad una attivazione della cascata MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase): tale cascata intracellulare regola la crescita cellulare, la differenziazione e la risposta a fattori di crescita, ormoni e citochine che interagiscono con i recettori tirosin-chinasici

presenti sulla superficie cellulare, l'apoptosi e la sopravvivenza della cellula.

Le alterazioni molecolari trovate nel carcinoma papillare della tiroide coinvolgono geni che codificano per i recettori tirosin-chinasici RET e NTRK1, e per due effettori intracellulari della via MAPK, vale a dire RAS, una GTP proteina, e BRAF, una serin-treonina chinasi. In più del 70% dei carcinomi papillari si può trovare mutato uno, o più raramente più di uno, dei geni sopraccitati, suggerendo che l'attivazione di questo *pathway* è essenziale per l'inizio del processo di carcinogenesi e che l'alterazione di un singolo effettore sia sufficiente a provocare la trasformazione cellulare. (131-133) i geni più spesso mutati sono RET (134,135) e BRAF.

Figura 2: Illustrazione schematica della via di segnalazione intracellulare MAPK.



I riarrangiamenti del gene RET, riconosciuti da circa 20 anni, si trovano nel 5-30% dei PTC comparsi in assenza di pregressa esposizione a radiazioni ionizzanti. La loro frequenza aumenta fino al 60-80% dopo esposizione a radiazioni ionizzanti durante l'infanzia, sia a seguito di irradiazione estera sia per contaminazione interna da iodio radioattivo. Il proto-oncogene RET è localizzato nel cromosoma 10q11.2 e codifica per un recettore tirosin-chinasico situato nella membrana cellulare. (136,137) Tale recettore contiene tre domini funzionali: un dominio extracellulare cui si lega il ligando, un dominio idrofobico transmembrana ed un dominio intracellulare tirosin-chinasico. I ligandi del recettore RET sono fattori di crescita che appartengono alla famiglia dei fattori neurotrofici derivati dalla linea delle cellule gliali. Il ligando che si unisce al recettore determina la dimerizzazione e l'autofosforilazione dei residui tirosinici a livello del dominio intracellulare e quindi l'attivazione della cascata. Nella ghiandola tiroidea il gene RET è espresso a livelli elevati nelle cellule C (parafollicolari), ma non nelle cellule follicolari, dove però può essere attivato in seguito alla fusione dell'estremità 3' con l'estremità 5' di molti geni *house-keeping* ubiquitariamente espressi a livello cellulare, formando i cosiddetti riarrangiamenti RET/PTC. (134,135) Questi sono circa 11, i più frequenti dei quali sono RET/PTC1 e RET/PTC3; la porzione C terminale contenente il residuo tirosinico del gene RET, viene fusa con la porzione N-terminale, contenente la regione promotrice di diversi geni partner. Nei geni chimerici RET/PTC la sequenza C-terminale di RET passa sotto il controllo di trascrizione regolato dal promotore di geni normalmente espressi in ambito tiroideo: ne risulta

un'attivazione costitutiva della funzione tirosin-chinasica di RET nel tireocita, con la propagazione del segnale attraverso diverse vie tra cui MAPK. (138,139) I carcinomi papillari con riarrangiamenti RET/PTC, si manifestano generalmente in età più giovane ed hanno un più alto rischio di metastasi linfonodali, tipica istologia papillare e probabilmente una prognosi migliore. (140) Si è recentemente osservato che i riarrangiamenti RET/PTC3 sono più frequenti nei PTC con dimensioni maggiori e con stadio più avanzato al momento della diagnosi, mentre i riarrangiamenti RET/PTC1 sembrano non correlare con alcuna caratteristica clinico-patologica. (141)

L'altro gene frequentemente coinvolto è BRAF: esso è localizzato nel cromosoma 7, è composto di 119 paia di basi (bp) ed appartiene alla famiglia delle proteine RAF (A-RAF, B-RAF, C-RAF) (142,143), effettori intracellulari della cascata di segnalazione MAPK (144). La fisiologica attivazione di RAS avviene dopo che svariati fattori di crescita, ormoni e citochine si legano ai loro recettori posti sulla membrana cellulare e successivamente all'interazione con GTP, la proteina RAS attiva le RAF che a sua volta fosforilano ed attivano MEK1 e MEK2, che fosforilano ed attivano ERK1 e ERK2: questi fosforilano altre proteine, molte delle quali sono anch'esse chinasi, determinando così delle alterazioni nell'espressione di vari geni.

Tra i tre tipi di RAF citati, BRAF è il più espresso a livello tiroideo ed è dotato dell'attività chinasica basale più elevata ed è anche il più potente attivatore di MEK. (144-146)

Nel 2000 Davies ed altri (147) diedero la giusta collocazione di BRAF all'interno del processo di carcinogenesi, evidenziando

le mutazioni puntiformi che avvengono a livello del dominio chinasi in tumori come melanoma, carcinoma del colon-retto, ovario ed altri. (48,149)

Tra le 40 e oltre mutazioni scoperte, la più comune è T1799A, che determina a livello di basi nucleotidiche, la sostituzione di una timida con una adenina e a livello amminoacidico la sostituzione di una valina con un acido glutammico a livello del codone 600 della proteina (V600E). La V600E e le altre mutazioni scoperte nel dominio chinasi coinvolgono o il loop di attivazione (*A loop*) o quello in cui si lega l'ATP (*P loop*) portando ad un'attivazione costitutiva della chinasi A: nella proteina *wild-type* defosforilata le interazioni idrofobiche tra il loop di attivazione e quello di legame con l'ATP mantengono la proteina in una conformazione inattiva, mentre la sostituzione V600E interrompe tali interazioni determinandone la formazione di nuove, che mantengono la proteina in una conformazione "cataliticamente competente", con continua fosforilazione di MEK. (149)

È stato spesso ipotizzato che le mutazioni di BRAF abbiano un ruolo nel processo di tumorigenesi e nella dedifferenziazione ed anche una possibile correlazione con una maggiore aggressività del tumore. A tal proposito sono stati condotti degli studi su topi transgenici portatori della mutazione V600E nella tiroide (150), ed essi sviluppavano carcinoma papillare della tiroide con una penetranza alta e con le medesime alterazioni microscopiche dei carcinomi tiroidei umani. Inoltre tali tumori frequentemente mostravano caratteristiche tipiche delle forme più aggressive: invasione della rete vasale, della capsula tiroidea e coinvolgimento dei muscoli pretiroidei, progressione multifocale verso il carcinoma scarsamente

differenziato. In tale modello animale BRAF V600E non solo iniziava il processo di tumorigenesi, ma era fondamentale nella progressione della malattia. (151-156) A conferma di tale assunto, studi successivi hanno evidenziato un'associazione tra BRAF V600E ed un'anomala mutilazione di molti geni oncosoppressori, come ad esempio TIMP3 (Tissue Inhibitors of Matrix MetalloProteinase-3), DAPK (Death-Associated Protein Kinase), SLC5A8 e RAR β 2 (Retinoic Acid Receptor β 2). In uno studio del 2006, si è potuta verificare la presenza di una certa associazione tra l'aumentata espressione di VEGF e BRAF V600E (157) e ciò potrebbe fornire una spiegazione alla spiccata tendenza ad invadere i tessuti extratiroidi e la rete vasale sanguigna.

La prevalenza di mutazioni BRAF nei tumori tiroidei papillari è piuttosto alta (131,158) e molti studi hanno confermato che la V600E è la mutazione più comune: la sua prevalenza, peraltro alquanto variabile, si aggira attorno al 39%. Vi sono delle discrepanze riguardo la frequenza di BRAF V600E in PTC, la prevalenza nelle varianti istologiche di PTC ed anche nelle relazioni che intercorrono tra la mutazione ed i parametri clinico-patologici: ciò è dovuto ad un insieme di fattori, come ad esempio la sensibilità della tecnica utilizzata per metterle in evidenza, errori nella segnalazione dei pazienti, dimensione e sede dei campionamenti, eterogeneità intratumorale, diversità dei criteri diagnostici utilizzati ed anche la composizione istologica. (142,159,160)

La mutazione V600E è la più comune, ma ne sono state trovate altre: una mutazione puntiforme K601E (161,162), un'inserzione V599Ins (163), una delezione K601del (161,164), una delezione amminoacidica da V600 a S605

(165), AKAP9-BRAF (166), BRAF V600E+K601 del (166,167), V600D+FGLAT601-605 ins (167).

A differenza dei carcinomi papillari negli adulti, i tumori pediatrici (sia sporadici che indotti da radiazioni) presentano mutazioni di BRAF in una percentuale che va dal 10% al 12% (168-170): nei PTC pediatrici che mostrano la mutazione BRAF V600E, il tumore tende a dedifferenziarsi e la prognosi è più infausta. (171)

Oltre che nei tumori papillari le mutazioni di BRAF sono state trovate anche nei carcinomi anaplastici e scarsamente differenziati, soprattutto in quelli che presentano anche aree ben differenziate. (172,173) Le mutazioni di BRAF sono presenti soprattutto in carcinomi papillari e nelle varianti di questi a cellule alte, mentre sono rare nella variante follicolare. (174)

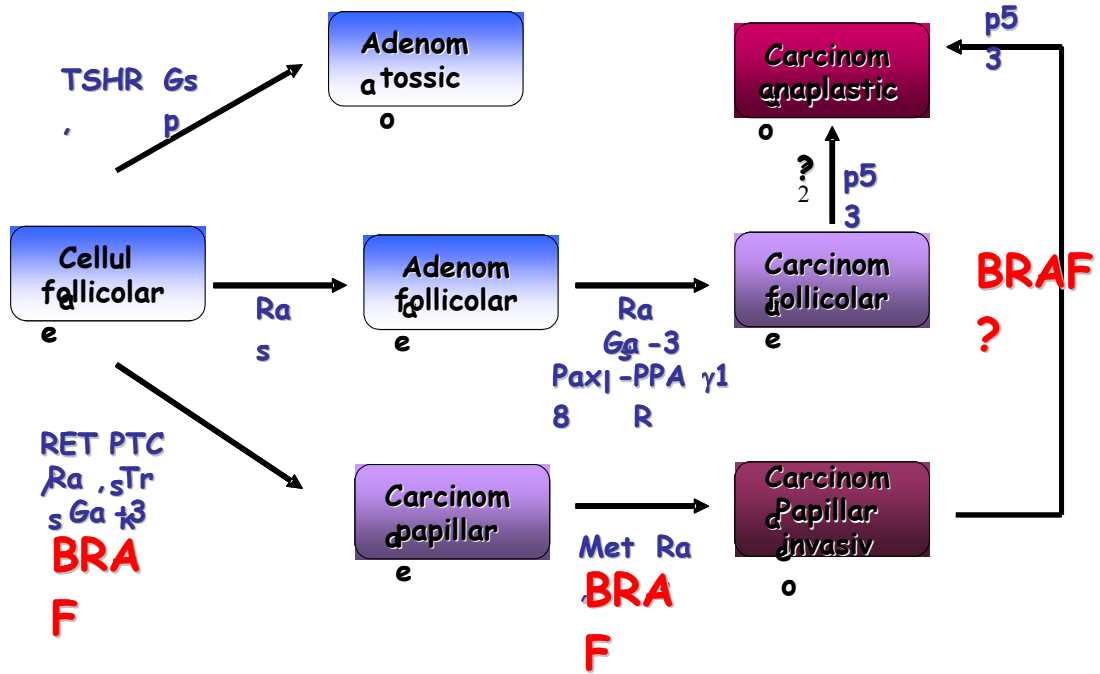
Numerosi studi hanno indagato la possibile relazione tra la mutazione di BRAF con le caratteristiche clinico-patologiche di PTC (140,157,160,162,173,175-199) e sembra esservi una certa relazione con l'età più avanzata dei pazienti, una più frequente invasione extratiroidea, uno stadio avanzato alla diagnosi, un maggior rischio di recidiva (109,140,172,177,179-184,186,189,190,194,195,197-199); inoltre nella maggior parte dei carcinomi papillari BRAF viene identificato come predittore indipendente di recidiva, anche in pazienti con malattia in stadio I o II. (198) Uno studio recente, tuttavia, ha osservato che BRAF mutato "di per sè" non sarebbe sufficiente ad indurre un comportamento aggressivo del tumore: la mutazione indurrebbe una certa instabilità genomica e un'augmentata predisposizione delle cellule mutate di acquisire difetti addizionali (ad esempio mutazioni di *ras*), che

nell'insieme possono spiegare la maggiore aggressività riscontrata nei PTC con BRAF mutato.

Le mutazioni di BRAF sono anche associate ad una diminuita capacità di legare lo I¹³¹-I, rendendone così inutile l'impiego per individuare e distruggere una eventuale persistenza di malattia o recidive (194,198).

Il nostro gruppo in collaborazione con l'Istituto di Endocrinologia in uno studio recente ha dimostrato che nelle recidive tumorali con BRAF mutato, oltre ad una diminuita espressione di NIS (194), si osservano anche una riduzione di TPO (176,201-203), di TG (176), della pendrina (211), responsabile del trasporto passivo a livello della superficie apicale. Il silenziamento di questi geni avviene a causa di mutazioni promosse da BRAF V600E, come dimostrato in altri studi. Inoltre il nostro studio ha evidenziato che la mutazione di BRAF è associata ad un'aumentata espressione del trasportatore del glucosio GLUT1 (176,211): l'attivazione costitutiva di BRAF, attraverso l'attivazione di MAPK, potrebbe indurre l'espressione di HIF1, che a sua volta determina l'*up-regulation* di GLUT-1, essendo questo un *target* di HIF1. (204) In questi casi potrebbe essere utile l'impiego di tecniche di *imaging*, ad esempio la PET che utilizza il 2-(18F)fluoro-2-deossi-D-glucosio.

Figura 3: rappresentazione schematica delle alterazioni geniche in corso di cancerogenesi tiroidea



4. MATERIALI E METODI

Sono state riviste tutte le cartelle cliniche relative ai 2008 pazienti che, nel periodo gennaio 2001- dicembre 2008, sono giunti alla nostra osservazione perchè affetti da neoplasia maligna della tiroide, di cui 1816 carcinomi differenziati (CDT), e, più precisamente, 1760 di istotipo papillare e 56 follicolare. Tutti sono stati sottoposti a intervento chirurgico e, fatta eccezione per i microcarcinomi senza interessamento linfonodale, a successivo trattamento radiometabolico con ¹³¹I presso la Medicina Nucleare 2° .

L'iter diagnostico terapeutico post chirurgico nei pazienti sottoposti a tiroidectomia totale, con o senza dissezione linfonodale, prevede l'esame clinico del collo, il dosaggio della Tg e degli anticorpi antitireoglobulina in sospensione o sotto stimolo con rTSH, la scintigrafia corporea total body con ¹³¹I e l'ecotomografia ad alta risoluzione del collo.

In base ai risultati ottenuti da queste indagini cliniche-laboratoristiche- strumentali i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi:

- 1) pazienti con normale concentrazione sierica di Tg e ¹³¹I - T.B. negativo, considerati liberi da malattia in cui nel follow up è sufficiente il controllo annuale clinico-ecografico associato al dosaggio di Tg e Anticorpi anti Tg;
- 2) pazienti con elevati livelli sierici di Tg e scintigrafia con ¹³¹I positiva, candidati a ulteriore terapia radiometabolica;
- 3) pazienti con elevati livelli sierici di Tg e/o reperto ecografico di recidiva al collo e scintigrafia con ¹³¹I negativa.

Il successivo follow up si è basato sul dosaggio della Tg e su controlli periodici scintigrafici con ¹³¹I, ricorrendo a eventuali nuove terapie radiometaboliche in caso di positività. La terapia radiometabolica è stata impartita secondo il seguente schema:

- 1) per residui tiroidei: 100 mCi di ¹³¹I;
- 2) per i linfonodi positivi. 150 mCi di ¹³¹I;
- 3) per metastasi a distanza: 200 mCi di ¹³¹I.

Terapia e follow up sono stati quelli standardizzati per i primi due gruppi; nei pazienti del terzo gruppo, non suscettibili di terapia radioIodimetabolica, abbiamo scelto la chirurgia come terapia con finalità curative.

La presenza di malattia metastatica è stata indicata da elevati livelli di Tg circolante in tutti i pazienti con malattia non Iodocaptante; gli anticorpo positivi in 11: la sede di malattia è stata documentata con ecotomografia del collo in tutti i pazienti; in 37/42 con ¹⁸F-FDG-PET-TC.

La caratterizzazione molecolare della lesione è stata effettuata in 37 pazienti, mediante prelievo ex- vivo di frammento di tessuto. Sono stati determinati:

- 1) livelli di mRNA di espressione genica di NIS, Tireoglobulina, Tireoperossidasi (TPO), pendrina;
- 2) livelli di mRNA di espressione del metabolismo glicolitico: GLUT-1, esochinasi I e II;
- 3) mutazioni di BRAF.

4.1 Esami di laboratorio

La tireoglobulina (Tg) è misurata nel siero con metodo immunoradiometrico (IRMA, sorin, Italy). Il coefficiente di variazione (CV) inter-assay era 6,5% e il CV intra-assay era il 3,1%. Il limite per distinguere i valori patologici da quelli non patologici del nostro laboratorio è di 2 ng/ml (4 tesi vecchia), cioè i pazienti con valori di Tg inferiore a 2 ng/ml vengono considerati liberi da malattia. Inoltre i livelli sierici degli anticorpi anti-Tg (Tg Ab) sono misurati con metodo radioimmunologico (RIA, Biodata, Italy). Il CV inter-assay era 6,7 e il CV intra-assay era 6,3 %. Livelli di Tg Ab inferiori a 50 U/ml sono stati considerati negativi (15 v.t.). Valori elevati di Tg Ab possono interferire con il dosaggio della Tg: in particolare utilizzando il metodo IRMA per il dosaggio della Tg, la presenza di Tg Ab può determinare una sottostima di livelli di Tg circolanti. Tra l'altro è anche stato riportato che elevati livelli di Tg Ab pur in presenza di Tg indosabile, possono di per sé suggerire la presenza di malattia metastatica.

4.2 Ecotomografia ad alta risoluzione e citologia ecoguidata

Per lo studio ecotomografico del collo si usa una sonda ad alta risoluzione small-part da 10 MHz (Technosi-Esaote, Italy) che permette di ricercare la presenza di residui tiroidei e linfonodi sia del compartimento centrale che latero-cervicale. Il diametro limite per individuare queste strutture è di 3-4 mm. I linfonodi sospetti sono quelli in cui il rapporto tra i due principali

diametri tende al valore 1 (superiore a 0.65). Anche la presenza al Color-doppler di ipervascularizzazione periferica e centrale irregolare può essere un segno di elevato sospetto di invasione secondaria. Infine l'ecografia può essere di guida per una citologia con ago sottile che è stata eseguita in tutti i 10 casi. Il materiale prelevato con ago sottile (21-23G) viene immediatamente strisciato su vetrino, quindi in parte fissato con alcol assoluto e inviato all'Anatomo Patologo per la colorazione e l'esame istologico.

4.3 Esame scintigrafico con 131-I

Per lo studio scintigrafico viene usata una gamma camera con ampio campo di vista (LFVO) (Orbiter, 7500, Siemens, USA) dotata di un collimatore ad alta energia per il 131I e uno a bassa energia e di elevata risoluzione per il 99mTc.

L'acquisizione delle immagini scintigrafiche con il 131-I è ottenuta a 72 ore dopo la somministrazione di una dose diagnostica di 185 MBq (5mCi) in condizioni di ipotiroidismo (TSH > 40 U/ml); sono registrate immagini total body antero-posteriori e immagini statiche di 10 min. Inoltre si sono ottenute immagini scintigrafiche con 131-I 4-5 giorni dopo la somministrazione della dose terapeutica variabile da 3,7 a 7,4 GBq (100-200 mCi) (33). La concentrazione urinaria di iodio (UIC) è stata misurata in duplicato ed è stata trovata al di sotto di 30 µg/L in tutti i pazienti.

Le immagini scintigrafiche sono state acquisite con matrice 128 x 128 e successivamente elaborate con un computer dedicato (Microvax, 11 digital, workstation ICON, Siemens, USA).

4.4 18-FDG-PET-TC

Per l'esecuzione di tale metodica i pazienti venivano mantenuti a digiuno per almeno 6 ore prima della somministrazione del 18-FDG e incoraggiati a bere acqua. Un campione di sangue veniva prelevato a tutti i pazienti prima dell'iniezione del tracciante radioattivo e livelli di glucosio inferiori a 200 mg/dl risultavano adeguati per l'esecuzione dell'esame. I pazienti venivano posti in posizione supina su di un lettino per i primi 20 minuti successivi all'iniezione endovenosa che consisteva in una dose media di 370 MBq (330-440 MBq) di 18-FDG; i pazienti venivano quindi invitati a rimanere seduti e tranquilli fino all'esecuzione dell'indagine PET-TC. Le scansioni PET-TC venivano acquisite in 3D (Siemens Byograph HR) circa 60 minuti dopo l'iniezione del tracciante, utilizzando 3 minuti di acquisizione per lettino. Per la compensazione dell'attenuazione dei tessuti superficiali rispetto ai profondi, e per ottenere un riferimento anatomico, venivano utilizzate le immagini TC. L'indagine PET veniva considerata positiva quando veniva registrato un *uptake* focale maggiore rispetto al *background* dei tessuti circostanti. Tali aree venivano indicate con regioni circolari e di esse veniva quindi calcolato il SUV (*Standard Uptake Value*) in base ai mg di glucosio consumati per mg di tessuto. Tale dato veniva infine inserito nel database del paziente. Il valore di SUV è stato riportato in maniera semiquantitativa nei pazienti presi in considerazione in relazione all'estensione della captazione e al numero di foci captanti (+/+++).

4.5 Note di tecnica chirurgica

La tiroide è avvolta da una guaina che si addensa in alcuni punti a formare dei legamenti sospensori dei quali, quelli laterali sono detti Berry e costituiscono i reperti più importanti per i loro rapporti con l'ingresso dei nervi ricorrenti in laringe. L'irrorazione sanguigna è affidata a due arterie tiroidee superiori, destra e sinistra, e a due inferiori, destra e sinistra. L'arteria tiroidea superiore, ramo della carotide esterna, contrae rapporti con la branca esterna del nervo laringeo superiore, motore, che concorre alla formazione della voce regolandone il tono. L'arteria tiroidea inferiore, che nasce dalla succlavia, contrae rapporti con il nervo laringeo inferiore o ricorrente da cui dipende la motilità della corda vocale omolaterale (la paralisi della corda vocale è causa di disfonia o afonia). Quest'ultima arteria irrorava generalmente anche le paratiroidi (due a destra e due a sinistra) che hanno dimensioni di circa 5-7 mm, una vascolarizzazione di tipo terminale e si trovano in stretta connessione con la tiroide. Ogni intervento chirurgico sulla tiroide inizia con la mobilizzazione del lobo tiroideo interessato mediante la legatura e sezione della vena tiroidea media omolaterale. Il polo superiore viene liberato sezionando i vasi arteriosi e venosi in tutta prossimità della capsula tiroidea in modo da risparmiare la branca esterna del nervo laringeo superiore. Nella maggior parte dei casi tale struttura nervosa scende a stretto contatto con i vasi polari superiori e nel 20% dei casi decorre fra i rami di divisione dell'arteria tiroidea superiore rendendosi facilmente vulnerabile. E' pertanto da evitare la legatura in blocco del peduncolo superiore ed è raccomandata quella separata dei singoli rami.

Successivamente si apre lo spazio pretracheale sottoistmico per procedere alla legatura e sezione delle vene tiroidee inferiori. Tali manovre consentono la lussazione controlaterale del lobo tiroideo ed ottimale esposizione delle strutture che decorrono nel tessuto aureolare latero-tracheale (in particolare l'arteria tiroidea inferiore e il nervo ricorrente che si incrociano). Il campo deve essere mantenuto totalmente esangue per individuare le paratiroidi e i rapporti che il nervo ricorrente contrae con l'arteria tiroidea inferiore. Sono infatti da tener presenti solo le numerose variazioni di decorso del nervo ricorrente rispetto all'arteria tiroidea inferiore e ai suoi rami di divisione (sono stati trovati 28 differenti tipi di rapporto) ed eventuale, ma rara (1%), evenienza di nervo laringeo non ricorrente, ma anche la possibilità di ramificazione del nervo stesso con suddivisione in 2-6 rami. La lesione anche di un solo ramo può essere causa di disfonia.

Sono ancora da tener presenti dislocazioni del nervo da parte di propaggini tiroidee esofitiche o di gozzi a sviluppo retrotracheale o mediastinico. E' quindi indispensabile affidarsi a regole anatomiche per eseguire una resezione tiroidea senza la individuazione del nervo. Pari attenzione va rivolta al reperimento delle paratiroidi di solito agevolmente riconoscibili per il loro colorito camoscio, per la loro particolare mobilità nel contesto del tessuto che le avvolge, per la loro posizione all'estremità di rancoli vasali a cui sembrano appese. Allo scopo di preservare il nervo ricorrente o le paratiroidi con la loro vascolarizzazione è raccomandata la legatura distale dei rami di divisione dell'arteria tiroidea inferiore, al di là dei rami nutritivi per le paratiroidi, in un piano del tutto extra-capsulare. Il punto cruciale rimane il

legamento del Berry a livello del quale il nervo ricorrente si porta in stretto rapporto con la capsula tiroidea e dal quale può risultare difficilmente clivabile. A questo punto si trova generalmente collocata la paratiroide superiore. In taluni casi può rendersi necessario lasciare a protezione del nervo una pastiglia di parenchima tiroideo per non incorrere nella sua lesione. Le principali complicanze della chirurgia tiroidea sono costituite dall'emorragia intra-operatoria e post-operatoria, dalla lesione del nervo ricorrente, dall'ipoparatiroidismo. Per quanto concerne la lesione del nervo ricorrente, la conoscenza dei rapporti tra arteria tiroide inferiore e nervo laringeo inferiore ha molta importanza per evitare danni iatrogeni. Così pure sono fondamentali una corretta e cauta legatura dei vasi tiroidei senza applicazione di pinze emostatiche alla cieca e un campo esangue. Per evitare ciò tutti gli Autori consigliano la dissezione o quanto meno la individuazione del nervo ricorrente, indipendentemente dal tipo di exeresi tiroidea (Attie, Thompson, Rossi, Pelizzo).

Oggi comunque l'exeresi di minima raccomandata è la lobectomia tiroidea, procedura che ha il vantaggio di evitare reinterventi omolaterali. Di necessità tuttavia l'intervento può estendersi fino alla tiroidectomia totale in rapporto all'estensione anche controlaterale del coinvolgimento tiroideo da parte del processo patologico o all'accertata malignità. Exeresi meno estese come la tiroidectomia subtotale di per sé non garantiscono un minor rischio di lesioni se condotte alla cieca, anzi possono produrre false sicurezze. In ogni caso la visualizzazione del nervo ricorrente dalla sua emergenza dal mediastino fino all'ingresso in laringe e la preservazione delle paratiroidi richiedono una minuziosa dissezione del nervo e di

variabili localizzazioni delle paratiroidi rispetto al piano capsulare tiroideo. Talora la preservazione del nervo e delle paratiroidi, che è consensuale, richiede un prudente risparmio di frammenti di tessuto tiroideo laddove sia difficile apportare delle legature separate ai piccoli rami di divisione delle arterie tiroidee inferiori destinate alla paratiroidi. In particolare questa legatura arteriosa distale è fondamentale per preservare dal danno ischemico le paratiroidi, la cui funzionalità è condizionata anche da un ottimale apporto arterioso.

Inoltre la delicata strutturazione del parenchima ghiandolare paratiroideo richiede una tecnica di manipolazione non contusiva (*no touch*). Anche la lesione del nervo ricorrente può occorrere per traumatismi, dovuti a manovre brusche di trazione o di posizionamento di pinze emostatiche o a elettrocoagulazione o a sezione. La dissezione linfonodale del VI° livello o compartimento centrale è indicata per carcinoma differenziato della tiroide con evidenza di metastasi linfonodali eseguita contestualmente alla tiroidectomia totale. Sebbene in letteratura sia ampiamente dimostrato che, in presenza di carcinoma papillare della tiroide, frequentemente coesistono micrometastasi nelle stazioni linfonodali del compartimento centrale, a tutt'oggi, in caso di tumore differenziato, senza evidenza clinica di localizzazioni linfonodali, non è ritenuta obbligatoria l'esecuzione di una linfadenectomia profilattica di tale compartimento. E' invece fortemente consigliata nei CDT ancorché in assenza di metastasi linfonodali evidenti, se sono presenti fattori prognostici (età, T, istologia) e fattori locali (infiltrazione della capsula tiroidea e/o dei muscoli pretiroidei) sfavorevoli.

4.6 Anatomia patologica

Durante l'intervento il chirurgo può acquisire informazioni estemporanee sulla natura della lesione o inviare il pezzo di exeresi per esame istologico definitivo previa fissazione in formalina (peso, dimensioni, colore, forma, etc.).

Lo scopo della fissazione istologica è di preservare la struttura protoplasmatica dal resto conseguenti alla morte della cellula, con il minimo cambiamento di struttura. La fissazione determina la morte immediata delle cellule ad inattivare rapidamente gli enzimi litici. I migliori fissativi sono quelli che determinano una precipitazione dei componenti cellulari in minutissimi granuli, quali la formalina e il cloruro mercurio. Per fissare il tessuto si usano di solito delle miscele di varie sostanze: le più note sono le miscele di Bouin, di Zenker, di Susa, di Carnoy, di Orth. Il tessuto da esaminare può essere osservato direttamente al microscopio, dopo asciugamento o disidratazione con alcol etilico con o senza colorazione.

I frammenti di tessuto per poter essere osservati al microscopio devono essere sezionati al microtomo in sezioni sottili di 3-4 μm di spessore. A questo scopo è necessario infiltrare il tessuto con un mezzo di inclusione, paraffina, gelatina, celloidina o con un materiale plastico che successivamente solidifica.

Metodi particolari di fissazione sono quelli al "microtomo congelatore" nel quale il tessuto fresco o previamente fissato viene congelato con anidride carbonica e immediatamente sezionato. Un altro metodo molto usato nelle ricerche istochimiche è quello del criostato: si tratta di un frigorifero mantenuto a $-10/30^{\circ}\text{C}$, contenente il microtomo che può essere manovrato dall'esterno.

Fig. 4 Classificazione TNM, IV edizione (2002)

T

- TX** Tumore primitiva di dimensioni non valutabile
- T0** Assenza di tumore primitivo alla tiroide
- T1** Tumore limitato alla tiroide di diametro <2 cm
- T2** Tumore limitato alla tiroide di diametro 2-4 cm
- T3** Tumore limitato alla tiroide di diametro >4 cm o di qualsiasi dimensione e minima estensione extra-tiroidea
- T4a** Tumore di qualsiasi dimensione esteso oltre la capsula tiroidea e che invade sottocute, laringe, trachea, esofago o nervo ricorrente
- T4b** Tumore che invade la fascia prevertebrale, la carotide o i vasi mediastinici.

Il carcinoma anaplastico va sempre considerato T4:

T4a: carcinoma anaplastico intratiroideo chirurgicamente resecabile

T4b: carcinoma anaplastico extratiroideo non resecabile chirurgicamente

N

- Nx** Metastasi ai linfonodi regionali non valutabile
- N0** Assenza di metastasi ai linfonodi regionali
- N1a** Metastasi ai linfonodi pretracheali, paratracheali, prelaringei
- N1b** Metastasi unilaterali, bilaterali o controlaterali dei linfonodi cervicali o mediastinici superiori

M

- Mx** Metastasi a distanza non valutabili
- M0** Assenza di metastasi a distanza
- M1** Presenza di metastasi a distanza

4.7 Estrazione di RNA e DNA da paraffinato

Il campione di tessuto paraffinato (circa 25 mg) è stato fornito dall'anatomia patologica in eppendorf da 1,5 ml e conservato in frigorifero ad una temperatura di + 4 °C.

Il DNA è stato estratto dal campione per mezzo del kit di estrazione "Dneasy Blood & Tissue Handbook" (50), Qiagen.

L'RNA è stato estratto tramite TRI-Reagent secondo il protocollo del fornitore. È stato successivamente retroscritto e quindi amplificato il gene della tireoglobulina al fine di accertare l'origine tiroidea del tessuto.

4.8 Determinazione della concentrazione di DNA e controllo qualitativo

Il DNA estratto viene quantificato allo spettrofotometro, uno strumento che permette di calcolare la concentrazione degli acidi nucleici, mediante la lettura della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Per effettuare la misurazione si mescolano 20 microl di DNA e 980 microl di H₂O ottenendo una soluzione diluita 50 volte rispetto alla soluzione madre.

Poiché una soluzione di DNA di 50 micro/ml ha un'assorbanza uguale a 1, la concentrazione di ciascun campione è data da:

$$(\text{DNA}) = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ micro/ml} \times 50$$

La soluzione diluita di DNA viene esaminata a 3 lunghezze d'onda: 260, 280 e 320 nm. Si misura l'assorbanza a 260 nm, che fornisce un valore da cui poter ricavare la concentrazione

di DNA dell'aliquota. La lettura alla lunghezza d'onda di 280 nm corrisponde al picco di assorbimento delle proteine, che costituiscono la principale fonte contaminante. Infine, la presenza di assorbimento a 320 nm indica una contaminazione del DNA da parte di solventi organici.

Facendo l'opportuno rapporto tra le assorbanze a 260 e 280 nm, si ottiene il grado di purezza, i cui valori vengono accettati se maggiori o uguali a 1.750. Nel caso si ottengano valori inferiori è opportuno effettuare una ulteriore estrazione.

Per definire in modo più dettagliato la quantità di DNA presente nell'aliquota, è possibile combinare alla lettura allo spettrofotometro una corsa elettroforetica del DNA su gel di agarosi, affiancato da un marcatore di peso molecolare.

4.9 Amplificazione del DNA mediante PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica biomolecolare molto rapida che permette di amplificare selettivamente, in vitro, specifiche sequenze presenti nel DNA genomico o in una popolazione complessa di cDNA. L'amplificazione richiede due oligonucleotidi sintetici (*primer*) complementari alle sequenze che delimitano la regione da amplificare. In tale posizione, essi sono in grado di innescare la sintesi di DNA catalizzata dalla polimerasi in presenza di dNTPs.

L'amplificazione avviene in cicli consecutivi costituiti da tre fasi:

- **Denaturazione:** il DNA a doppia elica viene svolto per poter essere disponibile come stampo a filamento singolo (ssDNA). La temperatura è generalmente di 95°C.
- **Appaiamento (annealing):** i *primer* vengono appaiati con il filamento stampo di DNA alle due estremità 3' terminale: essi sono complementari a due sequenze che fiancheggiano la regione *target*. La sequenza degli oligonucleotidi è orientata in modo tale da poter dirigere la polimerizzazione nel senso 5'→3' del DNA template. La temperatura in questo caso varia a seconda della temperatura di melting dei *primer* utilizzati, ma generalmente è compresa tra i 40° e i 60°C.
- **Polimerizzazione (estensione):** con l'incorporazione dei dNTPs, viene prodotto un nuovo filamento di DNA, grazie all'estensione da parte della DNA polimerasi a partire dai *primer* ibridati sulla sequenza da amplificare. I *primer* vengono estesi in direzione opposta l'uno rispetto all'altro, dando come risultato la sintesi di due molecole di dsDNA, copie della regione *target* del template. Si utilizza una temperatura di 72°C, ottimale per le DNA polimerasi termostabili.
Si tratta di una amplificazione esponenziale, visto che ogni filamento prodotto può essere utilizzato come stampo per cicli successivi. In questo modo si effettua una reazione a catena il cui risultato consiste nell'accumulo di filamenti di DNA in modo esponenziale relativamente al numero di cicli di reazione.

Alla fine dei cicli di PCR è possibile stimare l'efficienza attraverso la formula:

$$Y_n = A(1+E)^n$$

Dove A corrisponde alla concentrazione di template di partenza, E è un fattore di efficienza compreso tra 0.7 e 0.8, mentre n è il numero di cicli.

I principali problemi che si devono affrontare nella determinazione delle condizioni ottimali di amplificazione derivano dall'elevata sensibilità della PCR, che la rende suscettibile a contaminazioni, e dalla progettazione di primer efficienti.

Tabella I: Sequenze *primer* utilizzate nell'analisi genetica.

GENE	PRIMER FORWARD 5' – 3'	PRIMER REVERSE 5' – 3'
BRAF EX 15 (119bp)	GCA CAG GGC ATG GAT TAC TT	GAT GAC TTC TGG TGC CAT CC

Controllo dell'amplificazione del DNA mediante elettroforesi su gel di agarosio

L'efficacia di ogni reazione di amplificazione e l'assenza di contaminazioni vengono verificate mediante un'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% (P/V) in TAE (50X) costituito da:

- Tris-acetato 40 Mm 242 g
- Acido acetico glaciale 57.1 ml
- EDTA 1 Mm a pH 8.0 57.1 ml
- H2O deionizzata fino ad un volume finale di 1 litro.

Il gel viene preparato sciogliendo l'agarosio, in polvere, in TAE (1X) e scaldando in un forno a microonde la soluzione fino a che diventa limpida.

Sotto cappa, si aggiunge **Etidio Bromuro** 10 mg/ml in rapporto 1/10000 V/V e si versa il tutto in una vaschetta elettroforetica munita di pettini che formeranno i pozzetti su cui si caricheranno i campioni da testare.

A polimerizzazione avvenuta si tolgono i pettini, si copre il gel con tampone di TAE 1X e in ogni pozzetto si caricano 4 µl di amplificato e 2 µl di tampone carico di Orange G (glicerolo 30%, Orange G 0,25%, EDTA 25 Mm). Inoltre in un pozzetto viene caricato un marcatore di peso molecolare (Marker VIII ROCHE) contenente frammenti di DNA con peso molecolare noto, da 67 a 1100 bp, che servirà per verificare se la lunghezza dell'amplificato sia quella attesa. La corsa elettroforetica viene eseguita applicando una differenza di potenziale di 6 V/cm di lunghezza del gel per un tempo adeguato.

Al termine della corsa elettroforetica di circa 30 minuti, il gel verrà osservato al transilluminatore a raggi UV; il DNA risulterà visibile in bande in quanto l'Etidio Bromuro, che è una molecola intercalante il DNA, emette fluorescenza a 590 nm (regione rosso-arancio dello spettro visibile) quando è irradiato da luce UV a 266/300 nm.

La banda di DNA nitida e intensa, viene rapportata al marcatore di peso molecolare noto.

Il suddetto rapporto tra marcatore e banda ci permette poi di quantificare (in ng/ μ l) il DNA amplificato.

Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione dei prodotti di PCR necessaria per eliminare Sali, proteine, resine, *primer*, viene eseguita mediante colonnine Microcon (centrifugal filter devices) Millipore.

PCR di sequenza e successiva purificazione

La PCR di sequenza del prodotto purificato viene eseguita seguendo il protocollo Big-dye Terminator.

Al termine del ciclo Big-dye il prodotto viene purificato da Sali, dNTPs e molecole a basso peso molecolare usando colonnine autoSeq G-50 Dye terminator Removal Kit (GE Healthcare).

Il purificato così ottenuto è pronto per essere processato al sequenziatore automatico ABI PRISM (Applied Biosystem) che determina la sequenza dell'esone 15 di BRAF.

MASA (Mutant Allele- Specific Amplification)

Si tratta di una metodica innovativa di amplificazione di DNA con mutazione nota: si utilizzano due diversi *primer forward*, uno (F1) che si lega al gene BRAF *wild type*, l'altro (F2) che si lega al gene BRAF V600E. Il *primer reverse* è comune ad entrambi. F2 è designato appositamente, in quanto presenta l'ultima base modificata, che risulta così complementare alla base mutata, in modo che possa appaiarsi e quindi amplificare solo il filamento di DNA che presenti la mutazione nota.

È un metodo più sensibile, specifico ed affidabile rispetto alla SSCP e al sequenziamento di DNA a partire dai prodotti di amplificazione della PCR, in quanto è in grado di evidenziare piccole quantità (10% del campione) di *target* mutato mentre sia per la SSCP che per il sequenziamento è necessario che almeno il 40% delle cellule del campione presenti la mutazione ricercata.

I vantaggi di tale metodica sono la rapidità e la facilità di esecuzione e la modica quantità di DNA necessaria; lo svantaggio principale è l'identificazione della sola mutazione cercata (160).

Tabella II: Sequenze *primer* utilizzate per l'analisi MASA.

GENE	PRIMER FORWARD 5' – 3'	PRIMER REVERSE 5' – 3'
BRAF EX 15 (119bp)	GTG ATT TTG GTC TAG CTA CAG T	GTG ATT TTG GTC TAG CTA CAG A

5. RISULTATI

Tutti i pazienti operati sono risultati affetti da variante classica di carcinoma papillare della tiroide, eccetto due, di cui uno (paziente n.42) presentava un carcinoma misto papillare e follicolare e uno (paziente n.25) un carcinoma papillare a cellule alte. L'età media alla diagnosi era di 40 anni, la mediana 35 anni (min 16, max 79). L'età media al momento della recidiva era di 45 anni, la mediana 43 (min 16, max 18).

Secondo la classificazione pTNM, VI edizione (2002) i pazienti sono stati così suddivisi:

- I° stadio: 1 paziente
- II° stadio: 1 paziente
- III° stadio: 19 pazienti
- IV° stadio: 21 pazienti

In base alle dimensioni della lesione primitiva è risultato:

- T1: 26 % (12/42)
- T2: 19% (8/42)
- T3: 10% (4/42)
- T4: 43% (20/42)

Il tumore era multifocale nel 17% (7/42) dei casi.

In base all'interessamento linfonodale risultavano così ripartiti:

- N0: 12% (5/42)
- N1: 74% (31/42)
- Nx: 10% (4/42)

Le metastasi a distanza erano presenti nel 7% (3/42) dei casi.

La media dei valori di Tg durante la terapia soppressiva era 181, mentre la mediana era 7 ng/ml (min <0,5 max. 3344). 11/42 pazienti presentavano positività/persistenza degli anticorpi anti-Tg durante il follow-up.

L'intervallo medio fra intervento e comparsa di recidiva era di 5 anni (min 1 max 10).

Delle 42 recidive 41 (99%) perdevano la capacità di fissare lo iodio e 1/42 (1%) manteneva una debole capacità di fissare lo iodio durante il follow up.

BRAF veniva ricercato in 37 delle 42 recidive e risultava mutato in 20/37 (55%) delle recidive non iodofissanti e il 1/5 (20%) di quelle debolmente iodofissanti.

Dei pazienti con recidiva non iodofissante 21/41 venivano sottoposti a 18-FDG-PET-TC e tutti presentavano foci di captazione patologica di 18-FDG.

Il paziente con recidiva debolmente iodofissante veniva sottoposto a 18-FDG-PET-TC che risultava positiva (100%).

Abbiamo correlato la presenza di mutazioni BRAF con la capacità di captare il radioiodio e il 18-FDG (15 casi).

Tabella III: relazione tra la presenza della mutazione V600E di BRAF e capacità di concentrare lo iodio 131 e/o il 18-FDG

BRAF mutato (15 casi)	FDG – PET – CT -	FDG – PET – CT -
SCINTIGRAFIA con 131-I +	1/15 (7%)	0/15 (0%)
SCINTIGRAFIA con 131-I -	10/15 (73%)	3/15 (20%)

Di tali 15 casi, tutti erano recidive non iodofissanti, Nell'insieme delle recidive BRAF-mutate, le non iodofissanti captavano il 18-FDG e l'unica recidiva debolmente iodofissante BRAF-mutata era anch'essa BRAF-positiva. Inoltre la presenza della mutazione correlava con gli indici di *uptake* più elevati (++++).

In 10 casi l'analisi delle mutazioni di BRAF è stata condotta simultaneamente sul tumore primitivo (K0) e sulla prima recidiva non iodofissante (R1) asportata chirurgicamente e sulle eventuali successive (R2); infine, in 7/10 (70%) anche il linfonodo metastatico alla diagnosi è stato analizzato (N1). 3/10 (30%) presentavano un tumore multifocale.

BRAF risultava mutato in 2/10 (20%) tumori primitivi, 3/7 (42%) metastasi linfonodali al momento della diagnosi e in 7/10 (70%) prime recidive non iodofissanti e in 2/2 (100%) seconde recidive non iodofissanti (tabella IV).

Tabella IV: BRAF status nei pazienti in cui il tumore primitivo (K0), il linfonodo metastatico (N1), le recidive (R1,R2) non iodofissanti sono state analizzate contemporaneamente

pazienti	TNM	BRAF K0	BRAF N1	BRAF R1	BRAF R2	PET (SUV)
1	T4bN1bM0	WT	WT	WT	NA	+
2	T4N1bM1	WT	WT	WT	NA	++
3	T4N1bM1	WT	NA	V600E	NA	+++
4	T4N0M0	WT	NA	WT	NA	++
5	T4N1bM0	WT	V600E	V600E	V600E	+++
6	T1bN0M1	WT	WT	V600E	NA	++++
7	T4bN1bM0	WT	V600E	V600E	NA	++++
8	T1N1Mx	WT	WT	V600E	NA	+
9	T3N1M0	V600E	NA	V600E	NA	++++
10	T2N1M0	V600E	V600E	V600E	V600E	+++

WT: esone 15 di BRAF non mutato; V600E: presenza della mutazione del codone 600 dell'esone 15 di BRAF;
NA: risultato non disponibile.

In tutti i casi la PET risultava positiva con un indice di uptake variabile (SUV): delle 7 prime recidive con mutazione BRAF, 5 presentavano un indice di captazione intenso

Tabella V : Caratteristiche cliniche dei pazienti con recidiva

Pazienti N°	sess	Età 1	TNM	Età 2	TG sopp	TG Sosp	BRAF status
1	F	23	T4N1bM0	24	++	++	WT
2	F	67	T4N1bM0	82	275	313	V600E
3	F	53	T2N1M0	61	57	28073	WT
4	F	79	T4N0M0	82	99	211	WT
5	F	66	T2N1M0	72	<0.5	56.9	WT
6	F	51	T4NibM0	52	12	333.4	V600E
7	M	58	T1bN1bM0	60	4.9	82.3	V600E
8	F	20	T4N1bM0	33	3.5	3	S602F
9	M	32	T3N1M0	44	1.5	1.1	V600E
10	M	50	T4N1bM0	63	2.9	88.4	WT
11	F	35	T1bNxM0	37	2	4.7	WT
12	F	30	T4N1M0	37	4	126	WT
13	F	60	T4N1M0	65	<1	9.8	V600E
14	F	68	T4N1M0	71	++	++	V600E
15	M	33	T1bN1bM0	34	3	10	WT
16	F	38	T1NxM0	61	++	++	WT
17	F	35	T1N1bM0	37	54.6	139	WT
18	F	26	T1N1bM0	32	6	4.1	WT
19	F	51	T2NxM0	62	++	++	WT
20	F	36	T4N1aM0	60	NA	9	WT
21	M	20	T4N1M0	36	++	++	WT
22	F	64	T1N1M0	70	++	++	V600E
23	F	44	T3N1M0	49	<1	43	V600E
24	M	27	T3N1bM0	30	54	49	V600E
25	F	57	T4N1aM0	61	++	++	V600E
26	M	21	T2N1M0	24	1.5	19	V600E
27	F	17	T2N1M0	18	112	NA	WT
28	F	25	T4N0M0	27	13.62	372	V600E
29	M	40	T4N1M0	45	NA	NA	WT

30	F	34	T2N1M0	40	++	++	V600E
31	F	51	T1bN1M0	58	NA	20	WT
32	F	17	T4N1M0	30	235	859.8	V600E
33	F	36	T2bN1M0	38	++	++	V600E
34	M	26	T4N1M0	29	8	223	V600E
35	M	27	T4N1bM1	28	++	++	WT
36	M	76	T1bN0M1	77	3344	6769	V600E
37	F	16	T4aN1bM1	16	++	++	WT
38	M	26	T4bN1bM0	28	50	2858	V600E
39	M	64	T4N0M0	67	<1	<1	V600E
40	F	25	T3N1M0	43	2	28	WT
41	F	35	T2N0M0	44	5.9	2.2	WT
42	M	46	T1N1M0	69	0.6	73	V600E

Sesso: M: maschio; F: femmina; Età1: età alla diagnosi; Età2: età alla recidiva; TNM: estensione tumorale, linfonodi metastatici e metastasi a distanza al momento della diagnosi. Tg Sopp./Sosp.: livelli di Tireoglobulina (ng/ml) in soppressione e/o in sospensione dalla terapia con L-T4; ++: presenza di Anticorpi anti-Tg. BRAF Status: WT: esone 15 di BRAF non mutato; V600E: presenza della mutazione del codone 600 dell'esone 15 di BRAF; S602F: mutazione del codone 602 dell'esone 15 di BRAF. NA: risultato non disponibile.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I carcinomi papillari tiroidei (PTCs) costituiscono la neoplasia endocrina più frequente e si caratterizzano per un decorso indolente e una bassa mortalità, dovuta principalmente alla capacità di questi tumori di concentrare lo iodio e alla possibilità di essere efficacemente trattati con iodio radioattivo (¹³¹I). Tuttavia in circa un terzo dei pazienti, in particolare in corso di malattia persistente o ricorrente, viene persa la capacità di captare lo ¹³¹I (223).

Una mutazione somatica interessante l'esone 15 della serina-treonina-chinasi BRAF, realizzante la sostituzione di una Valina con Glutammato (V600E), rappresenta l'evento genico più frequente alla base dello sviluppo del carcinoma papillare tiroideo, documentabile nel 36-48% dei casi. Diversi studi hanno messo in evidenza che i carcinomi papillari con mutazione di BRAF hanno un atteggiamento più aggressivo, presentandosi in stadio avanzato alla diagnosi e potendo evolvere verso istotipi meno differenziati o anaplastici nel follow-up. (191) Un recente studio multicentrico ha messo in luce che BRAF potrebbe rappresentare un nuovo fattore prognostico indipendente, in grado di identificare i carcinomi papillari a maggior rischio di recidiva e di perdita della capacità di concentrare lo ¹³¹I. In particolare tale studio metteva in evidenza che il 23% dei PTC BRAF-positivi verso lo 0% dei PTC BRAF-negativi perdevano la capacità di concentrare lo iodio nella successiva recidiva (198).

A conferma di tali dati, uno studio successivo condotto dal nostro gruppo in collaborazione con l'Endocrinologia, metteva in evidenza che le mutazioni di BRAF erano effettivamente

estremamente frequenti nelle recidive non iodofissanti rispetto ai tumori primitivi e alle recidive iodofissanti (203). La comparsa *de novo* di mutazioni di BRAF nelle metastasi linfonodali era stata già dimostrata in due studi precedenti che avevano analizzato contemporaneamente il tumore primitivo e la metastasi linfonodale alla diagnosi, sottolineando l'importanza del *milieu* linfonodale nel favorire la comparsa e sopravvivenza di cellule con mutazione BRAF (164,224).

Oltre il 90% delle mutazioni di BRAF descritte in Letteratura sono rappresentate dalla sostituzioni V600E: quest'ultima determina un aumento pari a 500 volte dell'attività chinasi dell'oncogene BRAF, in quanto la sostituzione di un residuo aminoacidico neutro - acido glutaminico - modifica le interazioni fra *loop* di attivazione (*A loop*) e *loop* di legame dell'ATP (*P loop*), determinando una attivazione costitutiva della proteina.

La maggior frequenza di BRAF mutato nelle recidive rispetto ai relativi tumori primitivi confermerebbe gli studi precedenti, proponendo BRAF come un marcatore molecolare di prognosi povera, in grado di promuovere lo sviluppo di recidive più aggressive, meno differenziate e meno iodocaptanti (142).

Nelle recidive non iodofissanti, la chirurgia rappresenta l'unico trattamento curativo, essendo la chemioterapia e la radioterapia misure palliative. L'intervento chirurgico per essere curativo presuppone l'esistenza di tecniche di imaging affidabili e accurate. In tale scenario accanto all'ecografia del collo e alla TAC, la PET viene utilizzata per identificare la sede della malattia residua. Inoltre essa riveste un ruolo peculiare nel definire la prognosi del paziente.

Benché la 18-FDG-PET-TC sia una procedura di imaging ampiamente utilizzata in campo oncologico, si tratta di un'indagine alquanto costosa. In ambito tiroideo, la sensibilità della 18-FDG-PET-TC è estremamente variabile dal 45 al 95%, mentre si segnala una buona specificità (90-100%). Per tale ragione l'identificazione di criteri in grado di selezionare i pazienti candidati a questo tipo di indagine, rappresenta un pre-requisito per la sua corretta utilizzazione (225).

Per quanto riguarda il ruolo prognostico della 18-FDG-PET-TC, studi recenti hanno mostrato una correlazione inversa tra captazione del 18-FDG e la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma tiroideo (225). In particolare l'entità della captazione del 18-FDG, definita in modo semiquantitativo attraverso il valore *uptake* standardizzato (SUV) e l'estensione del residuo visualizzato alla PET, rappresentano i maggiori predittori di mortalità dovuta a malattia.

In questo studio abbiamo analizzato le recidive di carcinoma papillare con mutazioni di BRAF correlando la presenza di mutazione con la capacità di concentrare lo 131-I e il 18-FDG. I nostri dati sembrano confermare la non trascurabile associazione tra la presenza della mutazione nel CDT e la capacità o meno di captare lo 131-I e il 18-FDG: esiste, infatti, una correlazione inversa tra la presenza della mutazione e la capacità di fissare lo iodio, infatti il 93% delle mutazioni sono state rinvenute in recidive non iodofissanti; esiste invece un'associazione diretta tra la presenza della mutazione e la capacità di captare il 18-FDG, in quanto l'80% delle recidive mutate erano PET-positive. Ancor più interessante, le recidive che mostravano la mutazione V600E avevano un indice di captazione elevato, suggerendo quindi la presenza di una

correlazione tra il grado di captazione di 18-FDG e la presenza della mutazione.

In conclusione il nostro studio conferma che BRAF rappresenta un nuovo marcatore di prognosi sfavorevole e si associa ad un rischio maggiore di recidiva, allo sviluppo di fenotipi più aggressivi e meno differenziati nonché alla capacità di captare il 18-FDG.

La possibilità di ricercare preoperatoriamente la mutazione BRAF V600E anche nei campioni da agoaspirato potrà essere di grande utilità anche per il chirurgo che potrà procedere in questi casi con un trattamento di exeresi allargata. Inoltre questi pazienti selezionati dovranno essere sottoposti ad un *follow-up* con frequenti indagini strumentali dato il maggior rischio di recidiva.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Sawin CT, Santisteban P, Mubarak AG, Mubarak AS, Kovacs K, Horvath E: History, development, anatomy. In: *The Thyroid, a fundamental and clinical text*. Bravermann LE, Utiger RD eds, Lippincott Williams & Wilkins publ, Philadelphia, USA, 2005, pp 3-36.
2. Jameson JL, Weetman AP: Malattie della tiroide. In: *Harrison, Principi di Medicina Interna*. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL eds, McGraw-Hill publ, New York, USA, pp 2388-2416.
3. Favus MJ, Schneider AB, Stachura ME, Arnold JE, Ryo UY, Pinsky SM, Colman M, Arnold MJ, Frohman LA: Thyroid cancer occurring as a late consequence of head- and neck-irradiation. *New Eng J Med* 1976; 294: 1019-1025.
4. Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM: Fine-needle aspiration biopsy cytology of the thyroid. Its value and limitations in the diagnosis and the management of solitary thyroid nodules. *Pathol Annu* 1991; 26: 63-91.
5. Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, Gordon DL, Pitale SU, Herrman H, Wojcik EM: Fine needle aspiration of the thyroid: rate and causes of cytohistopathologic discordance. *Diagn cytopathol* 2000; 23: 233-237.

6. Settakorn J, Chaiwun B, Thamprasert K, Wisedmongkol W, Rangdaeng S: Fine needle aspiration of the thyroid gland. *J Med Assoc Thai* 2001; 84: 1401-1406.
7. Baloch ZW, Sack MJ, Yu GH, LiVolsi VA, Gupta PK: Fine needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid* 1998; 8: 565-569.
8. Sclabas GM, Staerkel Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, Lee JE, Evans DB: Fine needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg* 2003; 186: 702-709.
9. Sidawky MK, DelVecchio DM, Knoll SM: Fine needle aspiration of thyroid nodules: correlation between cytology and histology and evaluation of discrepant cases. *Cancer* 1997; 81: 253-259.
10. Logani S, Gupta PK, LiVolsi VA, Mandel S, Baloch ZW: Thyroid nodules with FNA cytology suspicious for follicular variant of papillary thyroid carcinoma: follow-up and management. *Diagn Cytopathol* 2000; 23: 380-385.
11. Baloch ZW, LiVolsi VA: Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 143-150.
12. Gharib H, Goellner JR: Fine needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993; 118: 282-289.

13. DeVos tot Nederveen Cappel RJ, Bouvy ND, Bonjer HJ, VanMuiswinkel JM, Chadha S: Fine needle aspiration cytology of thyroid nodules: how accurate is it and what are the causes of discrepant cases? *Cytopathology* 2001; 12: 399-405.
14. Gharib H, Goellner JR, Zimmerster AR, Grant CS, VanHeerden JA: Fine needle aspiration of the thyroid. The problem of suspicious cytologic findings. *Ann Int Med* 1984; 101: 25-28.
15. Block MA, Dailey GE, Robb JA: Thyroid nodules indeterminate by needle biopsy. *Am J surg* 1983; 146: 72-78.
16. Gasbarri A, Martegani MP, DelPrete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A: Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3494-3502.
17. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T: Expression of Galectin-3 in fine needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999; 85: 2475-2484.
18. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, DeGiuli P, Angeli A: Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3015-3020.

19. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka f, Yasuoka H, Kakudo K, Inohara H, Kuma K, Miyauchi A: Galectin-3 expression in follicular tumours. An immunohistochemical study of its use as a marker of follicular carcinoma. *Pathol* 2005. 37. 296-298.
20. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vecchione A, Tecce R, Larsson O: Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 357: 1644-1650.
21. Saggiorato E, Cappia S, DeGiuli P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, Angeli A, Orlandi F: Galectin-3 as a presurgical immunocyto-diagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5152-5158.
22. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, Palestini N, Ghigo E, Papotti M, Bussolati G, Martegani MP, Pantellini F, Carpi A, Giovagnoli MR, Monti S, Toscano V, Sciacchiato S, Pennelli GM, Mian C, Pelizzo MR, Ruge M, Troncone G, Palombini L, Chiappetta G, Botti G, Vecchione A, Bellocco R: Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 543-549.

23. Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G : Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology* 2002; 40: 80-87.
24. Cvejic D, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Sinadinovic J: Immunoistochemical localization of galectin-3 in malignant and benign human thyroid tissue. *Anticancer Res* 1998, 18: 2637-2642.
25. Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, Sanjuan X, Cordesa A, Liu FT, Sobel ME: Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997; 181. 80-86.
26. Kovacs RB, Foldes J, Winkler G, Bodo M, Sapi Z: The investigation of Galectin-3 in diseases of the thyroid gland. *Eur J Endocrinol* 2003, 149: 449-453.
27. Than TH, Swethadri GK, Ahmad T, Jamil D, Maganlal RK, Hamdi MM, Abdullah MS: Expression of Galectin-3 and Galectin-7 in thyroid malignancy as potential diagnostic indicators. *Singapore Med J* 2008; 49: 333-338.
28. Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, André S, Kaltner H, Kuwabara I, Liu FT, Gabius HJ, Kiss R, Salmon I: Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod Pathol* 2002; 15: 1294-1301.

29. Saggiorato E, DePompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M: Characterization of thyroid follicular neoplasms in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Rel Cancer* 2005; 12: 305-317.
30. Miettinen M, Karkkainen P: Differential reactivity of HBME-1 and CD-15 antibodies with benign and malignant thyroid tumors. Preferential reactivity with malignant tumors. *Virch Arch* 1996; 429: 213-219.
31. VanHoeven KH, Kovatich AJ, Miettinen M: Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD-15 (Leu-M1) in fine-needle aspirates of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 1998; 18: 93-97.
32. Nasir A, Chaudhry AZ, Gillespie J, Kaiser HE: Papillary micro carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic and prognostic review. *In Vivo* 2000; 14: 367-376.
33. Hammer M, Wortsman J, Folse R: Cancer in cystic lesions of the thyroid. *Arch Surg* 1982; 117: 1020-1023.
34. Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A: Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer* 1992; 70: 1585-1590.

35. Pacini F, Elisei R, Capezzone M, Miccoli P, Molinaro E, Basolo F, Agate L, Bottici V, Raffaelli M, Pinchera A: Controlateral papillary thyroid cancer is frequent at completion thyroidectomy with no difference in low- and high- risk patients. *Thyroid* 2001; 11: 877-881.
36. Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M, Finseth I, Pilstrom L: Papillary carcinomas have pore-deficient nuclei. *Int J Cancer* 1982; 30: 409-411.
37. Rosai J, Zampi, G, Carcangiu ML: Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 809-817.
38. Furmanchuk AW, Averkin JI, Egloff B, Ruchti C, Abelin T, Schappi W, Korotkevich EA: Pathomorphological findings in thyroid cancers of children from the Republic of Belarus: a study of 86 cases occurring between 1986 (post-Chernobyl) and 1991. *Histopathology* 1992; 21: 401-408.
39. Fisher ER, Kim WS: Primary clear cell thyroid carcinoma with squamous features. *Cancer* 1977; 39: 2497-2502.
40. Herrera MF, Hay ID, Wu PS, Goellner JR, Ryan JJ, Ebersold JR, Bergstralh EJ, Grant CS: hurtle cell (oxyphilic) papillary thyroid carcinoma: a variant with more aggressive biologic behaviour. *World J Surg* 1992; 16: 669-674.

41. Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, LaVechhia C, Burt AD, Kerr DJ, MacFarlane GJ: The epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog* 1993; 4:25-52.
42. Davies L, Welch HG: Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295: 2164-2167.
43. Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L: Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004; 14: 1056-1060.
44. Mazzaferri EL: A novel view of the management of thyroid cancer. In : Mazzaferri EL, Harmer C, Mallick UK, Kendall-Taylor P, eds. *Practical management of thyroid cancer: a multidisciplinary approach*. London: Springer-Verlag 2006; 1-28.
45. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Howlader N, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK: *SEER cancer Statistics Review, 1975-2004*. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2007.
46. Grubbs EG, Rich TA, Li G, Sturgis EM, Younes MN, Myers JN, Edeiken-Monroe B, Fornage BD, Monroe DP, Staerkel GA, Williams MD, Waguespack SG, Hu MI, Cote G, Gagel RF, Cohen J, Webers RS, Anaya DA, Holsonger FC, Perrier ND, Clayman GL, Evans DB: Recent advances in thyroid cancer. *Curr Probl Surg* 2008;45: 156-250.

47. Mazzaferri EL, Jhiang SM: Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418-428.
48. Sherman SI, Angelos P, Ball DW, Beenken SV, Byrd D, Clark OH, Daniels GH, Dilawari RA, Ehya H, Farrar WB, Gagel RF, Kandeel F, Kloos RT, Kopp P, Lamonica DM, Loree TR, Lydiatt WM, McCaffrey J, Olson Jr JA, Ridge JA, Robbins R, Shah JP, Sisson JC, Thompson NW: Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2005; 3: 404-457.
49. Mazzaferri EL, Kloos RT: Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1447-1463.
50. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, Haugen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon III HR: Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* 1998; 83: 1012-1021.
51. Tanaka K, Sonoo H, Hirono M, Ohkubo S, Nomura T, Ikeda M, Nakajima K, Kurebayashi J: Retrospective analysis of predictive factors for recurrence after curatively resected papillary thyroid carcinoma. *Surg Today* 2005; 35: 714-719.

52. Harach HR, Williams CT, Williams ED: Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma : a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 1994, 25: 549-561.
53. Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, LiVolsi VA, Flanery JT, Fraumeni JF Jr: A population-based case control study of thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1-12.
54. Larson SD, Jackson LN, Riall TS, Uchida T, Thomas RP, Qiu S, Evers BM: Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with Hashimoto thyroiditis and the role of the PI3k/Akt pathway. *J Am Coll Surg* 2007; 204. 764-773.
55. Belfiore A, LaRosa GL, LaPorta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C, Vigneri R: Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *Am J Med* 1992; 93: 363-369.
56. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J: Papillary carcinoma of the thyroid : a clinico-pathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 1985; 70: 205-209.
57. Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW, Begg C, Vlamis V: Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg* 1992; 164: 658-661.
58. Pacini F, Mariotti S, Formica N, Elisei R, Anelli S, Capotorti E, Pinchera A: Thyroid autoantibodies in thyroid

cancer: incidence and relationship with tumor outcome. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 119: 373-380.

59. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR: A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer* 1998; 83: 2638-2648.

60. Chan JK: Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants. *Histol Histopathol* 1990; 5: 241-257.

61. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam AK, Wan KY: Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathological features and long-term outcome. *World J Surg* 2006; 30: 752-758.

62. Keelawat S, Poumsuk U: Association between different variants of papillary thyroid carcinoma and risk-group according to AMES (age, metastasis, extent and size) classification system. *J Med Assoc Thai* 2006; 89: 484-489.

63. Michels JJ, Jacques M, Henry-Amar M, Bardet S: Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2007; 38: 212-219.

64. Cady B, Rossi R: An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988, 104: 947-953.

65. Hay ID: Prognostic factors in thyroid carcinoma. *Thyroid Today* 1989; 12: 1.
66. Mazzaferri EL: Impact of initial tumor features and treatment selected on the long-term course of differentiated thyroid cancer. *Thyroid Today* 1995; XVIII, No 3.
67. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCornick M, Straus FH: Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 414-424.
68. Beierwaltes WH, Nishiyama RH, Thompson NW, Copp JE, Kubo A: Survival time and "cure" in papillary and follicular thyroid carcinoma with distant metastases: statistics following University of Michigan therapy. *J Nucl Med* 1982; 23: 561-568.
69. Casara D, Rubello D, Saladini G, Masarotto G, Favero A, Girelli ME, Busnardo B: Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate analysis of prognostic variables. *J Nucl Med* 1993; 34: 1626-1631.
70. Kung AW, Collison K, Banga JP, McGregor AM: Effect of Graves' IgG on gene transcription in human thyroid cell cultures. Thyroglobulin gene activation. *FEBS Lett* 1988; 232: 12-16.
71. Kung AW, Lau KS: Interleukin-1 beta modulates thyrotropin-induced thyroglobulin mRNA transcription through

3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 1990; 127: 1369-1374.

72. Santisteban P, Acebron A, Schwarz MP, DiLauro R: insulin and insulin-like growth factor 1 regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1310-1317.

73. Ortiz L, Zannini M, DiLauro R, Santesteban P: Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 1997; 272: 2334-23339.

74. Rasmussen AK, Bendtzen K, Feldt-Rasmussen U: Thyrocyteinterleukin-1 interactions. *Exp Clin endocrinol Diabetes* 2000; 108: 67-71.

75. Pohl V, Roger PP, Christophe D, Pattyn G, Vassart G, Dumont JE: Differentiation expression during proliferative activity induced through different pathways: in situ hybridization study of thyroglobulin gene expression in thyroid epithelial cells. *J Cell Biol* 1990; 111: 663-672.

76. Namba H, Yamashita S, Morita S, Villadolid MC, Kimura H, Yokoyama N, Izumi M, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S: Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression. *J Endocrinol Invest* 1993; 16: 87-93.

77. Holting T, Siperstein AE, Clark OH: Epidermal growth factor enhances proliferation, migration and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 401.
78. Kung WQ, Lau KS: Gamma-interferon activates a nuclear protein that binds to gamma-interferon activation site of the thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* 1998, 20: 293.
79. Tang KT, Braverman LE, DeVito WJ: Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, thyroid peroxidase, and thyroglobulin in FTRL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* 1995; 136: 881-888.
80. Holting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY: Transforming growth factor beta-1 is a negative growth regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, mitration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 806-813.
81. Rasmussen AK, Kayser L, Feldt-Rasmussen U, Bendtzen K: Influence of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-beta and interferon-gamma, separately and added together with interleukin-1 beta, on the function of cultured human thyroid cells. *J Endocrinol* 1994; 143: 359-365.
82. Haugen BR, Pacini F, Reiners C: A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone

withdrawal for detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3877-3885.

83. Knudsen N, Bulow I, Jorgensen T, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P: Serum Tg- a sensitive marker of thyroid abnormalities and iodine deficiency in epidemiological studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3599-3603.

84. Feldt-Rasmussen U, Blichert-Toft M, Christiansen C, Date J: Serum thyroglobulin and its autoantibody following subtotal thyroid resection of Graves' disease. *Eur J Clin Invest* 1982; 12: 203-208.

85. Nakazato N, Yoshida K, Mori K, Kiso Y, Sayama N, Tani JI, Nakagawa Y, Ito S : Antithyroid drugs inhibit radioiodine-induced increases in thyroid autoantibodies in hyperthyroid Graves' disease. *Thyroid* 1999; 9: 775-779.

86. Date J, Feldt-Rasmussen U, Blichert-Toft M, Hegedus SL, Graversen HP: Long-term observation of serum thyroglobulin after resection of nontoxic goiter and relation to ultrasonographically demonstrated relapse. *World J Surg* 1996; 20: 351-356.

87. Bayraktar M, Ergin M, Boyacioglu A, Demir S: A preliminary report of thyroglobulin release after fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Int Med Res* 1990; 18: 253-255.

88. Muller E, Franke WG, Koch R: Thyroglobulin and violent asphyxia. *Forensis Sci Int* 1997; 90: 165-170.

89. Kawamura S, Kishino B, Tajima K, Mashita K, Tarui S: Elevated serum thyroglobulin as a manifestation of acute haemorrhage into the thyroid gland. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1984; 20: 213-219.
90. Smallridge RC, DeKeyser FM, VanHerle AJ, Butkus NE, Wartofsky L: Thyroid iodine content and serum thyroglobulin: clues to the natural history of destruction-induced thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1213-1219.
91. Bejarano PA, Nikiforov YE, Swenson ES, Biddinger PW: Thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in thyroid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8: 189-194.
92. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, Iacconi P, Miccoli P, Pacini F: N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 2000; 10: 19-23.
93. Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, Tuttle RM: Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol* 2001, 14: 289-296.
94. Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K, Amino N: Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA

in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer* 2001; 85: 102-106.

95. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Endocrinol Metab* 1999; 84: 4037-4042.

96. Biscolla RP, Cerruti JM, Maciel RM: Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3623-3627.

97. Eszlinger M, Neumann S, Otto L, Paschke R: Thyroglobulin mRNA quantification in the peripheral blood is not a reliable marker for the follow-up of patients with thyroid differentiated cancer. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 575-582.

98. Ohta K, Endo T, Onaya T,: The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic thyroid tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 1148-1153.

99. Ericsson UB, Tegler L, Lennquist S, Christensen SB, Stahl E, Thorell JI: Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 367-375.
100. Hrafkelsson J, Tulinius H, Kjeld M, Sigvaldason H, Jonasson JG: Serum thyroglobulin as a risk factor for thyroid carcinoma. *Acta Oncol* 2000; 39: 973-977.
101. Dralle H, Schwarzrock R, Lang W, Bocker W, Ziegler H, Schroder S, Geerlings H: Comparison of histology and immunohistochemistry with thyroglobulin serum levels and radioiodine uptake in recurrences and metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985; 108: 504-510.
102. Okamoto K, Kanbe M, Iihara M, Yamazaki K, Okamoto J, Yamashita T, Ito Y, Kawakami M, Obara T: Measuring serum thyroglobulin in patients with follicular thyroid nodule: its diagnostic implications. *Endocr J* 1997; 44: 187-193.
103. Sharma AK, Sarda AK, Chattopadhyay TK, Kapur MM: the role of estimation of the ratio of preoperative serum thyroglobulin to the thyroid mass in predicting the behaviour of well differentiated thyroid cancers. *J Postgrad Med* 1996; 42: 39-42.
104. Shah DH, Dandekar SR, Jeevanram RK, Kumar A, Sharma SM, Ganata RD: Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma: histological and metastatic classification. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981; 98: 222-226.

105. Edmonds CJ, Willis CL: Serum thyroglobulin in the investigation of patients presenting with metastases. *Br J Radiol* 1988; 61: 317-319.
106. Bachelot A, Cailleux AF, Klain M, Baudin E, Ricard M, Bellon N, Caillon B, Travagli JP, Schlumberger M: Relationship between tumor burden and serum thyroglobulin level in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 2002; 12: 707-711.
107. Ozata M, Suzuki S, Miyamoto T, Liu RT, Fierro-Renoy F, DeGroot LS: serum thyroglobulin in the follow-up of patients with treated differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 98-105.
108. Ronga G, Filesi M, Ventroni G, Vestri AR, Signore A: Value of the first serum thyroglobulin level after total thyroidectomy for the diagnosis of metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 1999; 26: 1448-1452.
109. Lima N, Cavalieri H, Tomimori E, Knobel M, Medeiros-Neto G: Prognostic value of serial serum thyroglobulin determinations after total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 110-115.
110. Baudin E, DoCao C, Cailleux AF, Lebouilleux S, Travagli JP, Schlumberger M: Positive predictive value of serum thyroglobulin levels, measured during the first year of follow-

up after thyroid hormone withdrawal, in thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1107-1111.

111. Savelli G, Chiti A, Rodari M, Schreiner F, Maccauro M, Aliberti G, Gerdi A, Bombardieri E: Predictive value of thyroglobulin changes for the efficacy of thyroid remnant ablation. *Tumori* 2001; 87: 42-46.

112. VanDeGraaf SA, Ris-Stalpers C, Veenboer GJM, Cammenga M, Santos C, Targovnik HM, DeVijlder JJ, Medeiros-Neto G: A premature stop codon in thyroglobulin mRNA results in a familial goiter and moderate hypotiroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2537-2542.

113. Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, Haugen BR, Sherman SI, Cooper DS, Braunstein GD, Lee S, Davies TF, Arafah BM, Ladenson PW, Pinchera A: A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1433-1441.

114. Pacini F, Molinaro E, Castagna MG, Agate L, Elisei R, Ceccarelli C, Lippi F, Taddei D, Grasso L, Pinchera A: Recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin combined with neck ultrasonography has the highest sensivity in monitoring differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3668-3673.

115. Siddiqui AR, Edmondson J, Wellman HN, Hamaker RC, Lingeman RE, Park HM, Johnston CC: Feasibility of low doses of I-131 for thyroid ablation in postsurgical patients with thyroid carcinoma. *Clin Nucl Med* 1981; 6: 158-161.
116. Arslan N, Ilgan S, Serdengeçti M, Ozguven MA, Bayhan H, Okuyucu K, Gulec SA: Post-surgical ablation of thyroid remnants with high-dose (131)I in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Nucl med Commun* 2001; 22: 1021-1027.
117. Torlontano M, Crocetti U, D'Aloiso L, Bonfitto N, Di Giorgio A, Modoni S, Valle G, Frusciante V, Bisceglia M, Filetti S, Schlumberger M, Trischitta V : Serum thyroglobulin and 131I whole body scan after recombinant human TSH stimulation in the follow-up of low-risk patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 19-24.
118. Schlumberger M, Baudin E: Serum thyroglobulin in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 249-252.
119. Pachucki J, Burmeister LA: Evaluation and treatment of persistent thyroglobulinemia in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 254-261.
120. VanTol KM, Jager PL, DeVries EG, Piers DA, Boezen HM, Sluiter WJ, Dullaart RP, Links TP: Outcome in patients with differentiated thyroid cancer with negative diagnostic

whole-body scanning and detectable stimulated thyroglobulin. Eur J Endocrinol 2003; 148: 589-596.

121. Fatourechi V, Hay ID, Mullan BP, Wiseman GA, Eghbali-Fatourechi GZ, Thorson LM, Gorman CA: Are posttherapy radioiodine scans informative and do they influence subsequent therapy of patients with differentiated thyroid cancer? Thyroid 2000; 10: 573-577.

122. Fatourechi V, Hay ID, Javedan H, Wiseman GA, Mullan BP, Gorman CA: Lack of impact of radioiodine therapy in Tg-positive, diagnostic whole-body scan-negative patients with follicular cell-derived thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 1521-1526.

123. Hung MC, Wu HS, Kao CH, Chen WK, Changla SP: F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in detecting metastatic papillary thyroid carcinoma with elevated human serum thyroglobulin levels but negative I-131 whole body scan. Endocr Res 2003; 29: 169-175.

124. Lowe VJ, Mullan BP, Hay CH, McIver B, Kasperbauer JL: 18F-FDG PET of patients with Hurtle cell carcinoma. J Nucl Med 2003; 44: 1402-1406.

125. Giovanni V, Arianna LG, Antonio C, Francesco F, Michele K, Giovanni S, Marco S, Giovanni L: The use of recombinant human TSH in the follow-up of differentiated thyroid cancer: experience from a large patient cohort in a single centre. Clin Endocrinol (Oxf) 2002; 56: 247-252.

126. Haugen BR, Ridgway EC, McLaughlin, McDermott MT: Clinical comparison of whole-body radioiodine scan and serum thyroglobulin after stimulation with recombinant human thyrotropin. *Thyroid* 2002; 12: 37-43.
127. Mazzaferri EL, Kloos RT: Is diagnostic iodine-131 scanning with recombinant human TSH useful in the follow-up of differentiated thyroid cancer after thyroid ablation? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1490.
128. Pacini F, Molinaris E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, Taddei D, Elisei R, Capezzone M, Pinchera A: Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86: 5686-5690.
129. Robbins RJ, Chon JT, Fleisher M, Larson SM, Tuttle RM: Is the serum thyroglobulin response to recombinant human thyrotropin sufficient , by itself, to monitor for residual thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3242-3247.
130. Wartofsky L: Management of low-risk well-differentiated thyroid cancer based only on thyroglobulin measurement after recombinant human thyrotropin. *Thyroid* 2002; 12: 583-590.
131. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the

RET/PTC- RAS-BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1454-1457.

132. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M: BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; 22: 4578-4580.

133. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A: Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2004; 23: 7436-7440.

134. Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, Della Porta G, Vecchio G: A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 1987; 328: 170-172.

135. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G: PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990; 60: 557-563.

136. Takahashi M: Structure and expression of the ret transforming gene. *IARC Sci Publ* 1988; 92: 189-197.

137. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM: Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 581-588.
138. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G: Molecular mechanisms of RET activation in human cancers. *Ann NY Acad Sci* 2002; 963: 116-121.
139. Dirick K, Yao VJ, Borrello MG, Bongarzone I, Pierotti MA, Taylor SS: Tyrosines outside the kinase core and dimerization are requisite for the oncogenic activity of RET/PTC2. *J Biol Chem* 1995; 272: 24642-24645.
140. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE: Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 216-222.
141. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, Basolo F, Miccoli P, Pacini F, Pinchera A, Elisei R: BRAF V600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxydase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 511-520.
142. Xing M: BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28: 742-762.

143. Marais R, Marshall CJ: Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 1996; 27: 101-125.
144. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ: Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 4378-4383.
145. Peyssonnaud C, Eyche A: The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93: 53-62.
146. Mercer KE, Pritchard CA: Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 25-40.
147. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.

148. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M: Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signalling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18: 813-822.
149. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116: 855-867.
150. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA: Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 2005; 65: 4238-4245.
151. Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, Wild CP, Casson AG: Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer* 2005; 115: 351-358.
152. Hong C, Maunakea A, Jun P, Bollen AW, Hodgson JG, Goldenberg DD, Weiss WA, Costello JF: Shared epigenetic mechanism in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Res* 2005; 65: 3617-3623.

153. Li H, Myeroff I, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, Lutterbaugh J, Rerko RM, Casey G, Issa JP, Willis J, Willson JK, Plass C, Markowitz SD: SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8412-8417.

154. Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz Jr S, Mariadason JM, Augenlicht LH, Eskandari S, Carrasco N: Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad sci USA* 2006; 103: 7270-7275.

155. Scheider-Stock R, Roessner A, Ullrich O: DAP-kinase-protector or enemy in apoptotic cell death. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1736-1767.

156. Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao I, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Lotan R: Hypermethylation of the retinoic acid receptor- β (2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1733-1742.

157. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK, Kim JM, Shong M: Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3667-3670.

158. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D: BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625-627.
159. Ciampi R, Nikiforov YE: Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005; 16: 163-171.
160. Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, Fenzi G, Vitale M: Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant-allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 341-348.
161. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M: BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004, 202: 247-251.
162. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA: High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 4561-4567.
163. Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, Avenia N, Barbi F, Carta C, Cavaliere A, Melillo RM, Passeri L, Santeusanio F, Tartaglia M, Santoro M, Puxeddu E: Biochemical and molecular characterization of the novel bRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 4235-4240.

164. Oler G, Ebina KN, Michaluart Jr P, Kimura ET, Cerutti J: Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 509-511.
165. Barzon L, Masi G, Merante Boschini I, Lavezzo E, Pacenti M, Casadei E, Tonziato A, Toppo S, Palù G, Pelizzo MR: Characterization of a novel complex BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 77-80.
166. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE: Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 94-101.
167. Hou P, Liu D, Xing M: Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-181ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle* 2007;6: 377-379.
168. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simoes M: BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4267-4271.

169. Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, Ishikawa N, Sugino K, Ito K, Jeremiah S, Thomas GA, Bogdanova TI, Tronko MD, Nagayasu T, Shibata Y, Yamashita S: Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4280-4284.

170. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD, Fagin JA, Nikiforov YE: Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 2004; 209: 1-6.

171. Kumagai A, Namba H, Mitsutake N, Saenko VA, Ohtsuru A, Ito M, Noh JY, Sugino K, Ito K, Yamashita S: Childhood thyroid carcinoma with BRAF1799A mutation shows unique pathological features of poor differentiation. *Oncol Rep* 2006; 16: 123-126.

172. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S: Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4393-4397.

173. Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH: BRAF mutation in anaplastic thyroid carcinoma: implication for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol* 2004; 17: 1359-1363.

174. Xing M: BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245-262.

175. Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, Namba H, Lushnikov E, Mitsutake N, Yamashita S: Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *Int J Cancer* 2007; 120: 196-200.

176. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D: BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2840-2843.

177. Frasca F, Nucera C, Belfiore A, Piero G, Attard M, Stella M, Pellegriti G, Giordano C, Trimarchi F, Vigneri R: BRAF T1799A mutation in thyroid cancer predicts progressive disease. Program of the 88th Annual Meeting of The Endocrine Society, June 24-27, 2006, Boston, MA (Abstract OR 20-2).

178. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, Beck-Peccoz P: BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61: 239-243.

179. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A,

Santeusanio F, Elisei R: Correlation between B-RAFV600E mutation and clinicopathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 455-464.

180. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, Johnson MR, Lloyd RV: BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15:136-143.

181. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shibru D, Bastian B, Griffin A: The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 466-471.

182. Kim J, Giuliano AE, Turner RR, Gaffney RE, Umetani N, Kitago M, Elashoff D, Hoon DS: Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2006; 244: 799-804.

183. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY: Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004; 45: 818-821.

184. Kim KH, Suh KS, Kang DW, Kang DY: Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. *Pathol Int* 2005; 55: 540-545.

185. Kim Ty, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK: The BRAF mutation is

not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 588-593.

186. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK: The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 364-368.

187. Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS: BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas. *Pathology* 2006; 38: 201-204.

188. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, Huang CC, Cheng JT: No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 461-466.

189. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F: Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathologic outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4085-4090.

190. Mistiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Poulaki V, Batt D, Mitsiades N: Targeting BRAFV600E in

thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1070-1078.

191. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE: BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5399-5404.

192. Park SY, Park YJ, Lee HS, Choi SH, Choe G, Jang HC, Park SH, Park do J, Cho BY: Analysis of differential BRAF (V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer* 2006; 107: 1831-1838.

193. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci r, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F: BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2414-2420.

194. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P: The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 257-269.

195. Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, Richiusa P, Gebbia N, Martorana A, Russo A, Amato MC, Galluzzo A, Giordano C: BRAF (V600E) mutation and p27 (kip1) expression in papillary carcinomas of the thyroid ≤ 1 cm and their paired lymph node metastases. *Cancer* 2007; 110: 1218-1226.
196. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, Lushnikov E, Kumagai A, Nakashima M, Meirmanov S, Mine M, Hayashi T, Yamashita S: The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid micro carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25: 1729-1735.
197. Trovisco V, Soares P, Preto A, De Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhaes J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M: Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumor aggressiveness. *Virchows Arch* 2005; 446: 589-595.
198. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6373-6379.

199. Powell N, Jeremiah S, Morishita M, Dudley E, Bethel J, Bogdanova T, Tronko M, Thomas G: Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol* 2005; 205: 558-564.
200. Smyth P, Finn S, Cahill S, O'Regan E, Flavin R, O'Leary JJ, Sheils O: Ret/PTC and BRAF act as distinct molecular, time-dependant triggers in a sporadic Irish cohort of papillary thyroid carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2005; 13: 1-8.
201. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, Zhu Z, Ciampi R, Roh M, Shedden K, Gauger P, Doherty G, Thompson NW, Hanash S, Koenig RJ, Nikiforov YE: Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 6646-6656.
- 202 Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, DeMicco C: Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 485-495.
203. Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, Mazzarotto R, Casara D, Nacamulli D, Mantero F, Opocher G, Busnardo B, Girelli ME: Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no ¹³¹I uptake. *Clin Endocrinology* 2008; 68: 108-116.

204. Lim JH, Lee ES, You HJ, Park JW, Chun YS: Ras-dependent induction of HIF- α 785 via the RAF/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras mediated tumor promotion. *Oncogene* 2004; 23: 9427-9431.
205. Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, Batt D, Fagin JA: Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1785-1793.
206. Chiloeches A, Marais R: Is BRAF the Achilles' Heel of thyroid cancer? *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1661-1664.
207. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N: BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358-362.
208. Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF: Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 1991; 350: 158-160.
209. Miller FD, Kaplan DR: On Trk for retrograde signaling. *Neuron* 2001; 32: 767-770.
210. Carniti C, Perego C, Mondellini P, Pierotti MA, Bongarzone I: PP1 inhibitor induces degradation of

RETMEN2A and RETMEN2B oncoproteins through proteosomal targeting. *Cancer Res* 2003; 63: 2234-2243.

211. Fagin JA: Genetic basis of endocrine disease 3:molecular defects in thyroid gland neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1398-1400.

212. Suarez HG: Genetic alterations in human epithelial thyroid tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48: 531-546.

213. Wynford-Thomas D: Molecular basis of tumors arising in thyroid follicular cells. *Ann Chir* 1999; 53: 237-24

214. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen C, Mueller E, Spigelman BM, Fletcher J: PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000; 289: 1357-1360.

215. Kozmik Z, Kurzbauer R, Dorfler P, Busslinger M: Alternative splicing of Pax-8 gene transcripts is developmentally regulated and generates isoforms with different transactivation properties. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6024-6035.

216. Miettinen M, Franssila KO: Variable expression of keratins and nearly uniform lack of thyroid transcription factor 1 in thyroid anaplastic carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31: 1139-1145.

217. Fresno Vara JA, Casado E, DeCastro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzales-Baron M: PI3k/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 193-204.
218. Samuels Y, Ericson K: Oncogenic PI3k/Akt and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 2006; 18: 77-82.
219. Liu Z, Hou P, Ji H, Studeman K, Jensen K, Vasko V, ElNaggar AK, Xing M: Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and PI3k/Akt and MAP kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008; epub ahead of print.
220. Sebolt-Leopold JS, Herrera R: Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 937-947.
221. Rodriguez-Viciano P, Tetsuo O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F: Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 461-467.
222. WHO, UNICEF, ICCID: Indicators for Assessing iodine Deficiency Disorders and their Control through salt iodization. World Health Organization: Geneva.
223. Schlumberger M: Papillary and follicular thyroid carcinoma. *New England Journal of Medicine* 1998; 338: 297-306.

224. Vasko V, Hu S, Wu G, Xing JC, Larin A, Savchenko V, Trink B, Xing M: High prevalence and possible *de novo* formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *The Journal of Clinical Endocrinology* 2005; 90: 5265-5269.
225. Leboulleux S, Schroeder PR, Schlumberger M, Ladenson PW: The role of PET in follow-up of patients treated for differentiated epithelial thyroid cancers. *Nature Clinical Practice* 2007; 3: 112-121.
226. Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, reibke R, Gonen M, Strauss W, Tuttle RM, drucker W, Larson SM: real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[¹⁸F] Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose-Positron Emission Tomography scanning. *The Journal of Clinical Endocrinology* 2006; 91: 498-505.