



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : ONCOLOGIA E ONCOLOGIA
CHIRURGICA

CICLO: XXII

TITOLO TESI:

MUTAZIONI BRAF NEL CARCINOMA PAPILLARE DELLA TIROIDE

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

Supervisore :Ch.ma Prof. Ssa Maria Rosa Pelizzo

Dottorando : Dott.ssa Isabella Merante Boschini

INDICE

Riassunto	pag.2
Abstract	pag.3
1. Introduzione	pag.6
1.1 Il carcinoma papillare della tiroide (CPT)	pag.6
1.2 Scopo dello studio	pag.7
2. Generalità sul CPT	pag.8
2.1 Epidemiologia	pag.8
2.2 Fattori di rischio	pag.11
2.2.1 Esposizione a radiazioni ionizzanti	pag.11
2.2.2 Carenza di Iodio	pag.12
2.2.3 Genetica	pag.13
2.3 Stadiazione	pag.20
2.4 Diagnosi	pag.22
2.5 Terapia	pag.23
2.6 Tecnica chirurgica	pag.28
2.7 Complicanze postoperatorie	pag.31
3. Materiali e metodi	pag.34
4. Risultati	pag.39
5. Discussione e conclusioni	pag.47
6. Bibliografia	pag.52

Riassunto

Introduzione

Il carcinoma papillare della tiroide (CPT) è il più frequente delle neoplasie tiroidee e il suo trattamento rimane per alcuni aspetti controverso, soprattutto per le scarse informazioni preoperatorie sul livello di aggressività del tumore stesso.

Scopo dello studio

Questo studio si propone di verificare il ruolo prognostico della mutazione BRAFV600E e di conseguenza la ricaduta di tale mutazione sul trattamento in termini di estensione dell'intervento chirurgico e terapia radioiodometabolica.

Materiali e metodi

Abbiamo considerato 136 casi di CPT all'esame istologico e li abbiamo distinti in 2 gruppi BRAF + e BRAF- confrontandoli sulla base delle seguenti variabili: sesso, età, istologia definitiva, diametro della lesione, stadiazione, metastasi linfonodali, infiltrazione della capsula, Tireoglobulina (Tg) nel follow up. Abbiamo inoltre ricercato la mutazione BRAFV600E su agoaspirato tiroideo in 266 casi sottoposti a intervento chirurgico di tiroidectomia totale +/- dissezione linfonodale tra ottobre 2008 e settembre 2009 distinti nelle 5 categorie citodiagnostiche (THY1, THY2, THY3, THY4, THY5) e per ciascuna categoria

abbiamo verificato la diagnosi istologica di CPT distinguendo i casi BRAF + e BRAF –.

Risultati

La prevalenza di BRAF mutato nei pazienti operati con diagnosi istologica di CPT è risultata pari a 69%. La mutazione BRAFV600E si è associata a una maggior età, ad una minore frequenza di istotipo papillare variante follicolare e una più elevata frequenza di variante a cellule alte, ad una prevalenza degli stadi 3 e 4 nei pazienti di età > 45 anni. La ricerca di mutazione BRAFV600E ha incrementato la sensibilità della sola citologia dall'84 all'88%.

Conclusioni

Si conferma una associazione statisticamente significativa tra la presenza di mutazione in BRAF e caratteristiche clinico patologiche più aggressive del CPT, quali età più elevata, varianti istologiche a prognosi peggiore (variante tall cell), stadio più avanzato di malattia. La ricerca di mutazioni BRAF migliora la sensibilità della sola indagine citologica, in particolare in nodi la cui diagnosi citologica possa essere non conclusiva.

Abstract

Introduction

The papillary thyroid carcinoma (PTC) represents the majority of the differentiated thyroid cancers and its

treatment is still debate considering the rare preoperative informations on the prognosis.

Aim

We proposed to assess the prognostic value of BRAF V600E mutation in PTC in view of a better therapeutic approach in terms of surgical and radiometabolic treatment.

Materials and methods

We considered 136 cases of PTC, between October 2008 and September 2009, subdivided in BRAF + and BRAF – and we compared these 2 groups on the basis of sex, age, histothype, TNM, size of the lesion, extracapsular extension, node metastases, multifocality, postoperative Tg level. BRAF V600E mutation analysis was performed, in parallel to classic cytology, in thyroid citoaspirates of 266 patients subdivided in the 5 cytodiagnostic cathegories (THY1, THY2, THY3, THY4, THY5) and subsequently underwent to thyroidectomy+/- node dissection. For each cytodiagnostic cathegory we considered the definitive histological diagnosis of PTC and the presence of BRAFV600E mutation.

Results

The BRAFV600E mutation is associated to age, histological variant of PTC, stages in patients with age>45 years. The prevalence of BRAF V600E mutation among histologically diagnosed PTC patients

was 69% and it improved the FNAC diagnostic sensitivity from 84% to 88%.

Conclusions

The BRAF V600E mutation analysis increases the sensitivity of cytology and it represents an useful adjuvant tool in presurgical characterization of thyroid nodules. There is an association between the BRAFV600E mutation and clinicopathological characteristics of the CPT such as age, histological variant and stages.

1.INTRODUZIONE

1.1 IL CARCINOMA PAPILLARE DELLA TIROIDE (CPT)

Il carcinoma papillare della tiroide (CPT) costituisce l'85-95% delle neoplasie tiroidee; esso deriva dalle cellule follicolari e mantiene la capacità di captare lo iodio e di produrre Tireoglobulina (Tg), caratteristiche che risultano fondamentali per l'iter diagnostico terapeutico e per il successivo follow up (1-3). Il CPT, considerato raro fino agli anni '70, divenne poi più visibile per una serie di fattori, come l'esame istologico microseriato, l'attenzione alle patologie tiroidee a seguito dei disastri nucleari e della radioterapia esterna e dell'agoaspirato sotto guida ecografica nella diagnosi. Inoltre è più frequente la diagnosi del micro CPT definito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come un tumore con diametro maggiore pari o inferiore a 1 cm (3-5). Il CPT presenta in genere un decorso indolente e una prognosi favorevole, con una sopravvivenza a 10 anni stimata superiore al 90% (range 80-100%). Tuttavia in una quota di pazienti, in genere di età avanzata e affetti da varianti meno differenziate di CPT, il decorso della malattia è più aggressivo e può portare ad un esito fatale (6,7). L'estensione del trattamento chirurgico iniziale dovrebbe mirare a ridurre le recidive e la mortalità e, allo stesso tempo, minimizzare le potenziali complicanze derivate da un intervento esteso. La

strategia chirurgica ottimale da adottare rimane però per alcuni aspetti controversa soprattutto per le scarse informazioni preoperatorie sul livello di aggressività del tumore (8-10). Risulta pertanto fondamentale la ricerca di fattori prognostici coinvolti nell'outcome dei pazienti affetti da CPT: i più noti sono l'età al momento della diagnosi, il sesso, la dimensione e l'estensione del tumore primitivo, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza, le caratteristiche istologiche, l'estensione del trattamento chirurgico iniziale, la somministrazione postoperatoria di 131I (3,6,7). Inoltre i numerosi progressi della biologia molecolare hanno permesso di dimostrare la correlazione tra le alterazioni genetiche presenti nel CPT e la prognosi (29-33). La mutazione T1799A a carico del gene BRAF è la più frequente alterazione genetica nel CPT dell'adulto; la prevalenza di questa mutazione si attesta attorno al 50% di tutti i CPT. Studi recenti inoltre hanno dimostrato una stretta associazione tra la presenza di mutazione in BRAF e caratteristiche clinico patologiche più aggressive del CPT, quali l'estensione extratiroidea, la presenza di metastasi linfonodali, varianti istologiche a prognosi peggiore (variante tall cell), stadio più avanzato di malattia e recidiva di malattia.

1.2 SCOPO DELLO STUDIO

In questo studio ci siamo proposti di verificare le caratteristiche clinico-patologiche dei CPT con

mutazione BRAF V600E vs i CPT senza mutazione BRAF V600E.

Inoltre abbiamo valutato in termini di sensibilità e specificità la ricerca di mutazione BRAFV600E negli ago aspirati di nodi tiroidei isolati e/o con caratteristiche ecografiche sospette, in un'ampia casistica di pazienti sottoposti successivamente a intervento chirurgico. E' stata quindi nostra intenzione verificare se il riscontro della mutazione BRAFV600E possa avere un'utilità non solo nel selezionare i pazienti affetti da patologia tiroidea da sottoporre a intervento chirurgico, ma anche nel modulare il trattamento del CPT, che si avvale di chirurgia e terapia radioiodio metabolica. Tale mutazione influirebbe sull'estensione del trattamento chirurgico sia sul T (di tipo conservativo oppure radicale, ovvero lobectomia vs tiroidectomia totale) sia sull'N (dissezione linfonodale del compartimento centrale e di quello laterocervicale di principio vs di necessità) e consentirebbe di selezionare i pazienti da candidare alla terapia radioiodio metabolica.

2. GENERALITA' SUL CPT

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Il CPT è un tumore raro (<1%) ma rappresenta il più frequente tumore endocrino. L'incidenza annuale varia in diverse regioni del mondo da un minimo di 0.5 casi a un massimo di 10 casi/ 100.000. Negli Stati Uniti l'incidenza è di 3.5/100.000/anno e 9.5/100.000/anno

per maschi e femmine rispettivamente (12-14); in Europa l'incidenza di CPT è 1.9/100.000/anno e 3.4/100.000/anno rispettivamente per maschi e femmine (15-17). In Italia sono stati stimati 675 nuovi casi all'anno nella popolazione maschile e 2579 in quella femminile. L'incidenza del CPT risulta in costante aumento(11-17).

In passato si poteva riscontrare un'importante differenza tra l'incidenza clinica (<2%) e l'incidenza autoptica (35-50%) del CPT, confrontato con altri tumori. Questo era evidente in particolare prima della diffusione dell'ecografia, quando la diagnosi era basata sull'esame clinico e sulla scintigrafia. Successivamente l'introduzione dell'ecografia e l'uso dell'agoaspirato hanno favorito la diagnosi preoperatoria del CPT e in particolare del micro CPT.

Secondo Davies e coll. L'incidenza del CPT è aumentata dal 3.6 all' 8.7 /100.000 tra il 1973 e il 2000, principalmente per l'incrementata diagnosi di piccoli CPT. Gli Autori hanno valutato le dimensioni delle neoplasie e usando i dati ricavati dal National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Cancer Statistic data base, hanno osservato un significativo decremento del diametro medio delle neoplasie e conclusero che l'aumento dell'incidenza era dovuto all'aumentata diagnosi di tumori di piccole dimensioni dovuta al miglioramento nelle tecniche diagnostiche di imaging (11).

Kent WD e coll. realizzarono uno studio in cui identificarono 7422 casi di CPT diagnosticati tra il 1990 e il 2001 usando l'Ontario Cancer Registry. Gli Autori conclusero che il più frequente uso di tecniche d'imaging aveva favorito l'incremento nella diagnosi di tumori piccoli, oltre alla maggiore attenzione verso le patologie tiroidee dopo i disastri nucleari e allo sviluppo di metodi istologici micro serati (14).

Anche la casistica del nostro Istituto conferma il costante aumento negli ultimi 9 anni dell'incidenza del CPT (Tabella 1).

Tabella 1. Casistica del nostro Istituto dall'anno 2000 all'anno 2008.

	Anno 2000	Anno 2001	Anno 2002	Anno 2003	Anno 2004	Anno 2005	Anno 2006	Anno 2007	Anno 2008
Tiroidi operate	874	989	1371	1278	1173	805	768	778	792
Carcinoma papillare	114 (86%)	119 (84%)	167 (93%)	194 (91%)	267 (95%)	202 (85%)	232 (88%)	201 (89%)	238 (90%)
Carcinoma follicolare	8	10	6	6	4	17	15	10	8
Carcinoma midollare	8	9	6	7	7	19	16	14	15
Carcinoma anaplastico	1	4	1	4	1	1	1	2	2
Carcinoma insulare	0	0	0	1	2	0	0	0	0
Totale carcinomi	132 (15%)	142 (14%)	180 (13%)	213 (17%)	282 (24%)	239 (30%)	264 (34.5 %)	227 (29%)	263 (33%)

2.2 FATTORI DI RISCHIO

Numerosi studi hanno permesso di identificare i potenziali fattori di rischio che incidono nello sviluppo di CPT, tra i quali rientrano l'esposizione a radiazioni ionizzanti, la carenza di Iodio e la familiarità per CPT.

2.2.1 ESPOSIZIONE A RADIAZIONI IONIZZANTI

L'esposizione a radiazioni ionizzanti rappresenta un fattore di rischio ormai consolidato del CPT. La stretta correlazione tra esposizione a radiazioni di testa e collo nei bambini e carcinoma della tiroide fu riportato già 50 anni fa e fu confermato poi da diversi studi (18-20).

In particolare quest'associazione è stata documentata in bambini di età dai 10 ai 20 anni esposti a radiazioni in seguito all'esplosione di Hiroshima e Nagasaki e nei pazienti che in età infantile erano stati esposti a radioterapia a scopo terapeutico per patologie benigne a carico della testa e del collo, come patologie timiche, la tinea capitis o per trattamenti di patologie maligne cervicali come i linfomi. Dopo il disastro di Chernobyl del 1986, un aumentato rischio di CPT è stato osservato in Bielorussia, Ucraina ed est Europa, in particolare nei bambini di età inferiore ai 5 anni al momento del disastro, i quali sviluppavano un CPT dopo circa 4-5 anni dall'esposizione (20,24,26,27).

Secondo alcuni Autori le alte dosi di radiazioni e la carenza di Iodio possono spiegare il precoce sviluppo

di CPT in queste aree (21,22). Molti studi inoltre hanno dimostrato come l'età al momento dell'esposizione modifichi il rischio di carcinoma tiroideo. Nei sopravvissuti alla bomba atomica si è visto che il rischio diminuiva con l'aumentare dell'età, cosicché intorno ai 20 anni di età il rischio di carcinoma tiroideo aumentava ma non in maniera statisticamente significativa e dopo i 40 anni non vi era alcun aumento del rischio. I fattori responsabili di questo aumento del rischio nei bambini dopo esposizione a radiazioni rimangono sconosciuti. E' stato ipotizzato che questo sia dovuto alla modalità di replicazione delle cellule tumorali tiroidee, che proliferano attivamente nel bambino, mentre hanno un potenziale replicativo limitato nell'adulto (25-27).

2.2.2 CARENZA DI IODIO

La carenza di Iodio è considerata un fattore di rischio per lo sviluppo di CPT. Essa si associa infatti ad una lenta ma continua iperstimolazione della ghiandola tiroidea da parte del TSH. Non è ancora stato chiarito se nelle aree geografiche carenti di Iodio vi sia un reale aumento delle neoplasie tiroidee ma è certo che in queste aree i carcinomi tiroidei follicolare (CFT) e anaplastico sono i più frequenti istotipi riscontrati. Galanti MR e coll. realizzarono uno studio caso-controllo in due regioni della Svezia e della Norvegia per verificare se esiste una correlazione tra abitudini alimentari e rischio di carcinoma tiroideo. Si è visto

che tale rischio era ridotto in quelle regioni nelle quali si utilizzava sale iodato. Tale studio evidenziava un ruolo importante della dieta e in generale dell'ambiente nello sviluppo del carcinoma tiroideo (28).

2.2.3 GENETICA

Nello sviluppo del CPT sono implicate numerose alterazioni geniche, sia riarrangiamenti che mutazioni puntiformi (29,30). Le più frequenti comprendono i riarrangiamenti a carico del proto oncogene RET (RET/PTC) e del gene NTRK1, che codificano per due recettori tirosin chinasi, e le mutazioni puntiformi a carico dei geni BRAF e RAS, due effettori intracellulari della cascata MAPK(30-33). La caratteristica che accomuna RET, NTRK1, BRAF e RAS è il loro coinvolgimento nella cascata di segnali 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 chinasi presenti sulla superficie cellulare, l'apoptosi e la sopravvivenza della cellula.

La mutazione a carico di uno di questi geni viene identificata nel 70% e oltre dei CPT, 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.

I geni più spesso mutati sono RET e BRAF.

Mentre i riarrangiamenti RET/PTCs sono particolarmente frequenti nei pazienti pediatrici (50-60%) e nei pazienti esposti a radiazioni durante l'infanzia (fino all'87% dei pazienti pediatrici dopo il disastro di Chernobyl), le mutazioni puntiformi a carico di BRAF sono più frequenti nell'adulto rispetto al bambino (50% vs 0-12%).

Il gene BRAF wild type è localizzato a livello del cromosoma 7q24, è composto di 119 paia di basi (BP) e codifica per una serin-treonin kinasi citosolica. Tale proteina appartiene alla famiglia delle proteine RAF (A-RAF, B-RAF, C-RAF), effettori intracellulari della cascata di segnalazione MAPK. 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 ed ERK2: questi fosforilano altre proteine molte delle quali sono anch'esse chinasi, determinando così delle alterazioni nell'espressione di vari geni.

Tra i 3 tipi di RAF citati, BRAF è il più espresso a livello tiroideo ed è dotato dell'attività chinasi basale più elevata ed è anche il più potente attivatore di MEK.

Nel 2000 Davies H e coll. 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 il melanoma, carcinoma del colon retto, ovarico ed altri (34).

Tra le 40 e oltre mutazioni scoperte a carico di BRAF, la più comune è T1799A, che determina a livello di basi nucleotidiche la sostituzione di una timina con una adenina, e a livello aminoacidico 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 una attivazione costitutiva della chinasi BRAF: 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 e attivazione di MEK.

Tra le altre mutazioni di BRAF ricordiamo: una mutazione puntiforme K601E, un'inserzione V599Ins, una delezione K601del, una delezione amminoacidica da V600 a S605, AKAP9-BRAF, BRAFV600E+K601 del, V600D+FLAGT601-605 ins.

E' 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, ed essi sviluppavano CPT con una penetranza alta e con le stesse alterazioni microscopiche dei carcinomi tiroidei umani.

Inoltre tali tumori frequentemente mostravano caratteristiche tipiche delle forme più aggressive: invasione della rete vasale, della capsula tiroidea, coinvolgimento dei muscoli tiroidei, progressione multifocale verso il carcinoma scarsamente differenziato.

In tale modello animale BRAF V600E non solo iniziava il processo di tumori genesi ma era fondamentale nella progressione della malattia.

A conferma di ciò studi successivi hanno evidenziato un'associazione tra BRAF V600E ed un'anomala metilazione di geni oncosoppressori come TIMP3 (Tissue Inhibitors of Matrix Metallo Proteinase-3), DAPK (Death Associated Protein Kinase), SLC5A8, 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 e ciò potrebbe fornire una spiegazione alla spiccata tendenza ad invadere i tessuti extratiroidei e la rete vasale sanguigna (35).

La prevalenza di mutazioni di BRAF nei CPT è piuttosto alta e molti studi hanno confermato che la V600E è la mutazione più comune: la sua prevalenza peraltro alquanto variabile si aggira intorno al 39% (30-33).

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

Oltre che nei CPT, le mutazioni di BRAF sono state trovate anche in carcinomi anaplastici e scarsamente differenziati, soprattutto in quelli che presentano anche aree ben differenziate.

Le mutazioni di BRAF sono presenti soprattutto in CPT nella variante a cellule alte, mentre sono rare nella variante follicolare.

Numerosi studi hanno indagato la possibile relazione tra la mutazione di BRAF con le caratteristiche clinico patologiche di PTC 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; inoltre nella maggior parte dei CPT BRAF viene identificato come predittore indipendente di recidiva, anche in pazienti con malattia in stadio I e II (31-33, 35).

Uno studio recente ha osservato che BRAF mutato di per sé non sarebbe sufficiente a indurre un comportamento aggressivo del tumore: la mutazione indurrebbe una certa instabilità genomica e un'aumentata predisposizione delle cellule mutate di acquisire difetti addizionali (ad esempio mutazioni di RAS) che nell'insieme possono spiegare la maggiore aggressività riscontrata nei CPT con BRAF mutato (37).

Le mutazioni di BRAF sono anche associate ad una diminuita capacità di legare lo Iodio, rendendone così inutile l'impiego per individuare e distruggere una eventuale persistenza di malattia o recidive. In uno studio recente è stato dimostrato che nelle recidive tumorali con BRAF mutato, oltre ad una diminuita espressione di NIS, si osservano anche una riduzione di TPO, di Tg, della pendrina, responsabile del trasporto passivo di Iodio a livello della superficie apicale. Il silenziamento di questi geni avviene a causa di metilazioni promosse da BRAF V600E come dimostrato in altri studi. Inoltre è stato evidenziato che la mutazione di BRAF è associata ad un'aumentata espressione del trasportatore del glucosio GLUT1: 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 GLUT1, essendo questo un target di HIF1, 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 (38). Nei CPT sono state descritte mutazioni più rare coinvolgenti altri geni: nel 5-15% dei CPT si sono osservati riarrangiamenti che interessano il proto oncogene NTRK (Neurotrophic receptor tyrosine Kinase) che codifica per il recettore tirosin-chinasico trans membrana per il fattore di crescita neurotrofico. Nel 10-50% degli adenomi benigni e nei carcinomi maligni (papillari e soprattutto follicolari) sono presenti mutazioni puntiformi attivanti l'oncogene RAS. Sono state descritte altre alterazioni genetiche, come l'aumento dell'espressione del protooncogene *met* nei CPT, o le mutazioni inattivanti il gene oncosoppressore p-53 nei carcinomi anaplastici. Nei carcinomi follicolari (CFT) è stato scoperto un riarrangiamento cromosomico che coinvolge i geni PPAR α (3p25) e Pax8 (2q13). Nella regolazione dei geni espressi dalla tiroide giocano un ruolo fondamentale i fattori TTF-1 (implicato nello sviluppo ghiandolare e nell'espressione del gene della Tg e in misura minore della TPO), TTF-2 (espresso in modo transitorio durante lo sviluppo embrionario della tiroide e dell'ipofisi anteriore e riespresso nell'adulto dove agisce come attivatore dell'espressione genica) e Pax 8. L'espressione di TTF-1 e Pax8 è abolita nei

carcinomi anaplastici. Il riarrangiamento cromosomico Pax8-PPAR α 1 è specifico per l'istotipo follicolare del carcinoma tiroideo(29-31).

2.3 STADIAZIONE

Vi sono diversi sistemi prognostici di stadi azione del rischio, i più significativi sono le classificazioni MACIS, UICC/AJCC, TNM, EORTC (39-44). Il sistema internazionale di riferimento più utilizzato è senza dubbio il TNM che prende in considerazione l'età, l'estensione del tumore, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza.

T (tumore primitivo):

Tx: tumore primitivo non valutabile

T0: non evidenziabile

T1: <2 cm, limitato alla tiroide

T2: compreso tra 2 e 4 cm, limitato alla tiroide

T3: >4 cm limitato alla tiroide o di qualsiasi dimensione ma con minima invasione extratiroidea (muscoli pretiroidei).

T4a: tumore extratiroideo infiltrante laringe, trachea, esofago o nervo ricorrente.

T4b: tumore extratiroideo infiltrante la fascia prevertebrale o la carotide o i vasi mediastinici.

N (linfonodi regionali):

Nx: LFN non valutabili

N0: LFN esenti da metastasi

N1a: metastasi ai LFN dell'area VI

N1b: metastasi ai LFN laterocervicali o mediastinici superiori

M (metastasi a distanza)

Mx: metastasi non valutabili

M0: non evidenza di metastasi

M1: metastasi a distanza

Stadiazione AJCC

Età ≤ 45 anni

Stadio 1: ogni T, ogni N, M0

Stadio 2: ogni T, ogni N, M1

Età > 45 anni

Stadio 1: T1, N0, M0

Stadio 2: T2, N0, M0

Stadio 3: T3, N0, M0

T1-3, N1a, M0

Stadio 4a: T4a, N0-1a, M0

T1-4a, N1b, M0

Stadio 4b: T4b, ogni N, M0

Stadio 4c: ogni T, ogni N, M1

2.4 DIAGNOSI

Il nodulo tiroideo è la più frequente manifestazione clinica del CPT, raramente le metastasi linfonodali cervicali ed eccezionalmente le metastasi a distanza (in questo caso generalmente metastasi ossee) (45-48).

Gli esami di primo livello comprendono l'ecografia tiroidea e le indagini di laboratorio (46-48).

L'ecografia del collo, meglio se con valutazione delle caratteristiche di vascolarizzazione nodulare (color-doppler) e con valutazione elastografica, permette di individuare gli aspetti suggestivi di malignità e meritevoli di approfondimento mediante FNAC (ipoecogenicità del nodulo, presenza di micro calcificazioni intranodulari, assenza o interruzione della continuità dell'alone periferico, margini irregolari, plurifocalità, infiltrazione capsulare, compressione e infiltrazione capsulare). Inoltre l'ecografia permette di individuare una eventuale linfadenopatia e sotto la sua guida è possibile eseguire un FNAC (45, 49).

Per quanto riguarda le indagini di laboratorio, queste possono evidenziare la associazione tra CPT e patologia autoimmune con o senza ipotiroidismo. Il dosaggio della Tg non è utile prima dell'intervento mentre ha un ruolo fondamentale nel follow up (45-48).

L'agoaspirato è un metodo efficace nella diagnosi differenziale tra benignità e malignità e può essere supportato dal dosaggio di Tg. Tuttavia esso ha dei limiti che sono l'inadeguatezza del materiale e la diagnosi di neoplasia follicolare. L'agoaspirato, se inadeguato può essere ripetuto e in mani esperte il FNAC ha una specificità e sensibilità attorno al 95%: i falsi positivi nel caso di CPT sono molto rari, circa il 2% (50-54).

2.5 TERAPIA

L'approccio terapeutico standard al CPT include il trattamento chirurgico combinato con la terapia con ¹³¹I e la terapia ormonale a dosi oppressive, considerando che le cellule neoplastiche conservano la capacità di captare lo Iodio e la dipendenza dal TSH.

Considerando che il CPT è un tumore a basso grado di malignità, le procedure chirurgiche sono controverse. La tiroidectomia totale è la procedura ottimale, consentendo di ridurre il rischio di recidiva, considerata l'alta percentuale di multifocalità della malattia, inoltre permette l'utilizzazione nel postoperatorio dello ¹³¹I e della Tg come marker sierico nel follow up. Con la tiroidectomia totale l'obiettivo è di intervenire una sola volta: il trattamento chirurgico delle recidive è infatti gravato da rischi maggiori di danno alle paratiroidi e ai nervi ricorrenti,

oltre ad essere meno radicale rispetto al trattamento iniziale (55-58).

Un intervento più conservativo è indicato nel caso di micro CPT incidentali diagnosticati dopo il trattamento chirurgico, o diagnosticati preoperatoriamente in pazienti di età inferiore a 45 anni senza metastasi. Si tratta in questo caso di tumori a basso rischio nei quali l'ecografia è in grado di identificare, nel follow up, una eventuale recidiva, che in ogni caso non influenza la sopravvivenza se precocemente diagnosticata.

Nei pazienti affetti da carcinoma tiroideo differenziato, infatti, è stato dimostrato che non vi è aumento della mortalità per lesioni di dimensioni inferiori a 1.5 cm. Inoltre, l'elevata incidenza (superiore a 35-50%) di microCPT riscontrata in studi su autopsie indica il comportamento benigno di questi tumori. Pertanto, in questi pazienti è consentita una chirurgia di tipo conservativo (59-61).

La linfadenectomia rimane l'aspetto più controverso nella gestione chirurgica del paziente affetto da CPT. L'incidenza di metastasi linfonodali nel CPT è correlato alla sede dei linfonodi coinvolti, alla varietà istologica, all'età del paziente al momento della diagnosi, all'estensione della linfadenectomia ed al numero di sezioni esaminate dall'anatomopatologo(62-65).

L'incidenza di diffusione linfonodale microscopicamente e/o clinicamente evidente alla diagnosi è elevata (tra il 15 ed il 50%), mentre ancora

più elevata risulta l'incidenza microscopica, raggiungendo l'80% nei soggetti giovani (più dell'80% nei bambini), i quali peraltro presentano una prognosi ottima. Il comportamento centrale (VI livello) è coinvolto in più del 90% dei pazienti con metastasi linfonodali, dimostrando quindi una prevalenza significativa. La frequenza di metastasi linfonodali laterocervicali nei pazienti N+ è molto alta (51-100%), con maggiore coinvolgimento dei linfonodi delle stazioni laterocervicali caudali (livello III e IV) rispetto alle stazioni craniali. Il coinvolgimento dei linfonodi sopra-clavicolari è il terzo sito coinvolto in ordine di frequenza (10-52% dei pazienti con metastasi linfonodali). Il coinvolgimento dei linfonodi mediastinici non è frequente e la localizzazione nella maggior parte dei casi è a livello mediastinico superiore (63-65).

La topografia delle metastasi cervicali non sembra correlata alla sede del tumore primitivo nel lobo tiroideo; tuttavia, quando il focus eteroplasico risulta situato al terzo superiore della ghiandola i linfonodi sotto-digastrici risultano spesso interessati ed i tumori a sede istmica possono presentare diffusione linfonodale bilaterale, sincrona e/o metacrona.

Molti Autori non considerano la diffusione metastatica linfonodale un fattore prognostico negativo in grado di influenzare la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti con CPT. Tale opinione sembra avvalorata da recenti studi di revisione estensiva della letteratura,

che confermano come il coinvolgimento linfonodale non sia correlato ad un significativo decremento della sopravvivenza. Nonostante ciò, la presenza di metastasi linfonodali appare correlata ad una maggiore incidenza di recidiva loco regionale ed il riscontro di invasione extracapsulare perilinfonodale nelle metastasi può risultare un indicatore di possibile metastatizzazione a distanza ed essere correlata ad una prognosi peggiore nei pazienti con CPT.

L'approccio chirurgico alle metastasi linfonodali, specie in sede di primo intervento, nei pazienti con CPT rimane oggetto di dibattito, in quanto il beneficio della linfoadenectomia in relazione a recidiva e sopravvivenza risulta ancora controverso (66).

E' necessario definire se la tiroidectomia totale è sufficiente, considerata l'elevata frequenza di micrometastasi del VI livello di incerto significato riportata in diversi studi (50-90%). Il trattamento chirurgico dei linfonodi del VI livello rimane controverso in quanto difficile dal punto di vista tecnico e considerato non necessario in circa il 10-15% dei casi, considerando i risultati ottenuti con la terapia radio metabolica.

D'altro canto il re intervento per metastasi residue o recidive risulta tecnicamente ancor più impegnativo e pone problemi di trattamento non completamente radicale, considerando che le attuali metodiche diagnostiche (PET-CT, rhTSH-test, ecografia ad alta

risoluzione) consentono di svelare piuttosto frequentemente ricorrenza o persistenza di malattia non iodofissanti (67).

Per cautelarsi dall'ipoparatiroidismo che grava sulla linfoadenectomia centrale, alcuni autori preferiscono eseguire solamente la dissezione linfonodale del compartimento centrale omolaterale; infatti 6 linfonodi sono necessari e sufficienti per definire lo staging su N. In alternativa alcuni autori hanno proposto la tecnica del linfonodo sentinella, utilizzando o colorante vitale o linfo-scintigrafia e sonda di rilevamento intraoperatoria, o utilizzando tecniche combinate (62).

In caso di evidenza clinica o ecografica di coinvolgimento linfonodale, non vi sono dubbi sulla necessità e sui benefici sulla prognosi di una dissezione linfonodale in aggiunta alla tiroidectomia totale. Al contrario, il trattamento di linfonodi apparentemente normali è generalmente più conservativo.

La decisione di una dissezione di principio proposta da alcuni autori è fondata sull'elevata frequenza (70-82%) di metastasi linfonodali occulte, cioè rilevate istologicamente in soggetti clinicamente N0 alla stadiazione preoperatoria, nonché sull'evidenza di maggiori recidive nei pazienti non sottoposti a linfoadenectomia profilattica (68,69).

Ad oggi non vi è evidenza assoluta in letteratura che la dissezione linfonodale profilattica di principio nei

pazienti affetti da CPT sia di reale beneficio ed abbia un impatto significativo su recidiva loco regionale e sopravvivenza a lungo termine.

2.6 TECNICA CHIRURGICA

La procedura chirurgica viene eseguita di solito in anestesia generale; CPT di piccole dimensioni possono essere trattate con tecnica mininvasiva, con possibilità di conversione qualora risulti necessario un approccio tradizionale, per problemi di radicalità e di tecnica (70).

L'incisione cutanea di lunghezza variabile a seconda della tecnica utilizzata, delle caratteristiche del tumore e del collo del paziente, viene praticata approssimativamente 1 cm sopra la linea clavicolare, estesa in profondità al sottocute e al platismo. Dopo incisione dei piani platismo cutanei, la dissezione avviene esternamente al piano della fascia superficiale utilizzando elettrocauterizzatore, estesa in alto fino al livello della cartilagine tiroidea, inferiormente fino al manubrio sternale. I piani superficiali platismo-cutanei vengono divaricati mediante retrattori. Si procede quindi ad incisione e apertura della linea alba cervicale, dal piano della cartilagine tiroidea alla superficie superiore del manubrio sternale. I muscoli pretiroidei vengono quindi disseccati per via smussa dal piano capsulare tiroideo e retratti lateralmente, fino ad esporre il margine mediale della carotide comune. Se necessario per la

presenza di tumori di grandi dimensioni o con segni di invasione extracapsulare, i muscoli pretiroidei possono essere separati mediante cauterizzazione.

Successivamente si apre lo spazio pretracheale sottoistmico per procedere alla legatura e sezione delle vene tiroidee inferiori. Parimenti si espone lo spazio laringo-tracheale sovra istmico, facendo attenzione all'exeresi del processo piramidale e alla ricerca del linfonodo delfico, la cui mancata o incompleta rimozione può simulare persistenza o recidiva scintigrafica e indurre ad utilizzare dosi maggiori di radioiodio nel postoperatorio.

La mobilizzazione del lobo tiroideo interessato procede mediante legatura e sezione della vena tiroidea media. 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 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. Tali manovre consentono la completa lussazione contro laterale del lobo tiroideo e , unitamente alla trazione laterale dell'asse carotideo, l'ottimale esposizione delle strutture che decorrono nel tessuto

areolare latero-tracheale (in particolare l'arteria tiroidea inferiore e il nervo ricorrente che s'incrociano). La ricerca del nervo laringeo inferiore è guidata, risultando più sicura da importanti landmarks anatomici: l'arteria tiroidea inferiore, il corno inferiore della cartilagine tiroidea, l'identificazione del tubercolo di Zuckerkandl (vero e proprio indice puntato sul ricorrente) (71,72).

Il campo deve essere mantenuto totalmente esangue per individuare i rapporti che con l'arteria tiroidea inferiore contrae il nervo ricorrente e per riconoscere le paratiroidi. Sono infatti da tenere presenti le numerose variazioni di decorso del nervo ricorrente rispetto all'arteria e ai suoi rami di divisione, l'eventuale ma rara (1%) evenienza di decorso non ricorrente del NLI destro, ma anche la possibilità di ramificazione del nervo con suddivisione in 2-6 rami. Pari attenzione va rivolta al reperimento delle paratiroidi, di solito agevolmente riconoscibili per il loro colorito camoscio, per la loro mobilità nel contesto del tessuto che le avvolge, per la loro posizione all'estremità di rami vasali a cui sembrano appese. La paratiroide superiore risulta più comunemente riscontrata vicino all'area di incrocio tra arteria tiroidea inferiore, nervo laringeo inferiore e tubercolo di Zuckerkandl a livello della cartilagine cricoide. La paratiroide inferiore risulta più variabile per sede: più frequentemente situata caudalmente rispetto all'arteria tiroidea inferiore ed anteriormente al nervo laringeo inferiore; in circa il

15% dei casi la paratiroide inferiore risulta allocata nel panno tireotimico o nel corno timico superiore.

Allo scopo di preservare il nervo ricorrente e le paratiroidi, è raccomandata la legatura distale paracapsulare dei rami di divisione dell'arteria tiroidea inferiore e dei rami dell'arteria tiroidea superiore. L'eventuale impossibilità di preservazione in sede, impone l'avulsione della paratiroide, il suo mantenimento in liquido e ghiaccio ed il successivo reimpianto in forma di tessuto paratiroideo frammentato nel ventre del muscolo sterno cleidomastoideo.

Una volta identificati nervo paratiroidi, la rimanente dissezione avviene in maniera relativamente rapida e sicura. Il punto cruciale rimane il ligamento di Berry, a livello del quale il ricorrente si porta in stretto rapporto con la capsula tiroidea e dal quale può risultare difficilmente clivabile. In questo punto si trova generalmente collocata anche la paratiroide superiore.

2.7 COMPLICANZE POSTOPERATORIE

Le principali complicanze della chirurgia tiroidea sono costituite dall'emorragia intraoperatoria e postoperatoria, dalla lesione del nervo ricorrente e dall'ipoparatiroidismo (73,74). Quest'ultimo rappresenta la complicanza più frequente generalmente transitoria e legata ad avulsione o danno ischemico. La lesione del nervo laringeo inferiore rappresenta la complicanza più temuta. In

letteratura l'incidenza di ipoparatiroidismo definitivo varia dallo 0% al 17%, mentre l'incidenza di lesione ricorrente varia dallo 0.5% al 6.1%. Per quanto concerne la lesione del nervo ricorrente, la conoscenza dei rapporti tra arteria tiroidea 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 ed un campo esangue. Per evitare questa complicanza tutti gli Autori consigliano la dissezione o quanto meno la individuazione del nervo ricorrente, indipendentemente dal tipo di exeresi tiroidea. L'evenienza di ipoparatiroidismo definitivo e lesione ricorrente appare in relazione alla tecnica chirurgica, all'estensione di malattia, alla concomitante linfadenectomia, pregressa cervicotomia, oltre che ad altri fattori quali anomalie anatomiche del nervo, alla vulnerabilità delle paratiroidi durante le manovre chirurgiche.

Lesioni transitorie o permanenti del nervo laringeo superiore, ed in particolare della sua branca esterna, risultano relativamente frequenti e sono probabilmente sottostimate. Fondamentali per evitare tali ingiurie risultano particolari accorgimenti di tecnica, quali la legatura e sezione iuxtacapsulare degli elementi vascolari del peduncolo superiore, da eseguire separatamente.

L'emorragia postoperatoria è una complicanza rara (1-2%) precoce (generalmente delle prime 12 ore), talora inattesa ed a volte drammatica, che compare in forma di ematoma cervicale. Se la tiroidectomia viene eseguita secondo tecnica extracapsulare, l'emorragia intraoperatoria non è frequente.

La dissezione linfonodale laterocervicale espone a complicanze legata a lesioni irritative o lesive del nervo accessorio spinale (con segni e sintomi quali atrofia del trapezio, deficit di abduzione dell'arto superiore, scapola alata, dolore alla spalla) del nervo frenico (paralisi con innalzamento dell'emidiaframma), della branca marginale del nervo facciale (paresi buccale), del nervo ipoglosso (emiatrofia linguale, deviazione della lingua e incompleta protrusione linguale), del simpatico cervicale (sindrome di Claude-Bernard Horner) o legate a lesioni del dotto toracico o di vasi linfatici tributari (75).

Quest'ultima evenienza comporta l'istituirsi di fistola linfatica (linforrea). La gestione della linforrea persistente dopo dissezione linfonodale laterocervicale prevede l'applicazione di procedure conservative non standardizzate o, laddove queste fallissero, il re intervento. In letteratura i principali accorgimenti conservativi vanno dal bendaggio compressivo alla dieta alipidica, alla nutrizione parenterale totale, all'uso di octreotide, etilefrina o ancora alla scleroterapia mediante infiltrazione locale di tetraciclina. Il re

intervento o la legatura intratoracica del dotto toracico rappresentano l'ultima opzione terapeutica nei casi non responsivi e intrattabili (76).

3. MATERIALI E METODI

In questo studio abbiamo considerato 136 pazienti sottoposti a intervento chirurgico per CPT presso il nostro reparto e alla ricerca su FNAC tiroideo di mutazione BRAFV600E condotta tramite sequenziaggio diretto e PCR specifica per l'allele mutante (MASA) da Ottobre 2008 a Settembre 2009.

Abbiamo distinto questi pazienti in 2 gruppi, BRAF + (92 casi) e BRAF- (44 casi), e li abbiamo confrontati sulla base delle seguenti variabili: sesso, età, istologia definitiva, diametro della lesione, stadiazione, metastasi linfonodali, infiltrazione della capsula, valore di Tg al follow up.

I test utilizzati per l'analisi statistica sono stati il t student per le variabili età, diametro della lesione e Tg nel follow up, il χ^2 per tutte le altre variabili. E' stato considerato statisticamente significativo un valore $p < 0.05$.

Inoltre abbiamo considerato 266 pazienti sottoposti a FNAC con ricerca di mutazione BRAFV600E condotta tramite sequenziaggio diretto e PCR specifica per l'allele mutante (MASA) e successivamente sottoposti a intervento chirurgico. Abbiamo distinto questi 266 casi nelle 5 categorie citodiagnostiche (Thy 1=

Materiale insufficiente per diagnosi, Thy 2= Benigno, Thy 3= Indeterminato (neoformazione follicolare), Thy 4= Sospetto per malignità, Thy 5= Maligno) e per ciascuna categoria abbiamo considerato la presenza di mutazione BRAFV600E su ago aspirato e la successiva diagnosi istologica definitiva. Abbiamo quindi valutato PPV (valore predittivo positivo), NPV (valore predittivo negativo), specificità e sensibilità per la diagnosi citologica, per la ricerca di mutazione BRAF V600E e per le due metodiche combinate.

Estrazione di DNA da ago aspirato.

La procedura di agoaspirazione è stata eseguita utilizzando un protocollo standardizzato. Il materiale aspirato con ago sottile è stato lavato con 3 ml di soluzione fisiologica in una Falcon da 15 ml e conservato in frigo a +4 °C. Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 3200 RCF, il pellet ottenuto è stato sottoposto a digestione overnight a 56 °C con proteinasi K (Qiagen) e l'estrazione è stata poi completata utilizzando il kit di estrazione "QIAamp DNA Kit Micro" (Qiagene). 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.

Amplificazione del DNA mediante PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica biomolecolare molto rapida che permette di amplificare

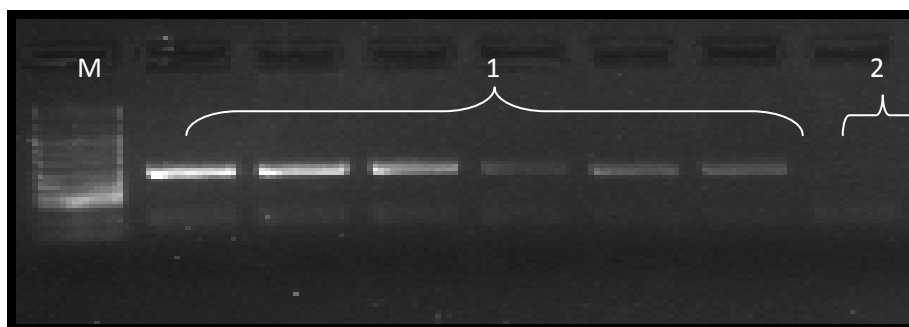
selettivamente, in vitro, specifiche sequenze presenti nel DNA genomico o in una popolazione complessa di cDNA. L'amplificazione richiede due oligonucleotidi sintetici (*primer*) (Tabella 2) complementari alle sequenze che delimitano la regione da amplificare. In tale posizione, essi sono in grado di innescare la sintesi di DNA catalizzata dalla polimerasi in presenza di dNTPs, permettendo così la sua amplificazione.

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) (Figura 1).

Tabella 2. Sequenze *primer* utilizzate nell'analisi genetica.

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

Figura 1. Elettroforesi su gel di agarosio al 2% dell'amplificato BRAF. M: marker; 1: campioni amplificati; 2: controllo negativo.



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 Biosystems) 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* (R) è comune ad entrambi (descritti nella Tabella 3), F2 è disegnato appositamente, in quanto presenta le ultime due basi modificate, che risulta così complementare alla base mutata, in modo tale che possa appaiarsi e quindi amplificare solo il filamento di DNA che presenti la mutazione nota. E' 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 (77).

Tabella 3. Sequenze *primer* utilizzate per l'analisi MASA.

GENE	PRIMER FORWARD F1 5'-3'	PRIMER FORWARD F2 5'-3'	PRIMER REVERSE 5'-3'
<i>BRAF</i> EX 15 (119bp)	GTGATTTTGGTCTAGCT ACAGT	GTGATTTTGGTCTA GCTACAAA	GTGATTTTGGT CTAGCTACAG A

Figura 2. Elettroforesi su gel di agarosio al 3% (MASA): 1: controllo negativo; 2: controllo positivo; M: marcatore di peso molecolare; 3, 4: campioni mutati.

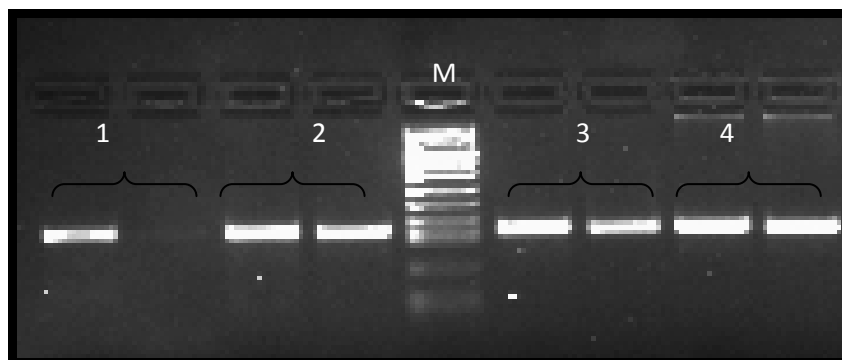
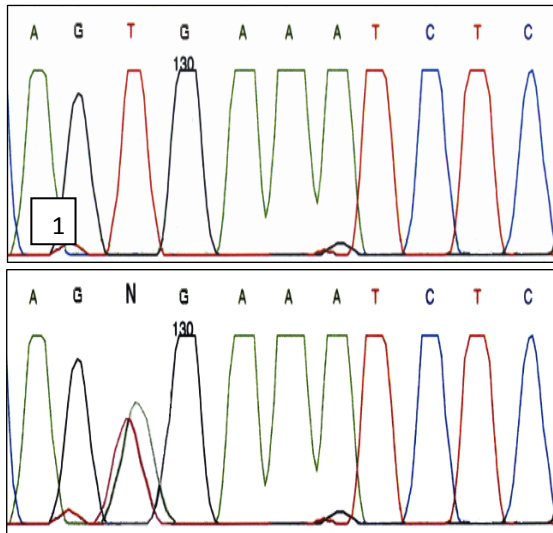


Figura 3. Cromatogramma della sequenza dell'esone 15 BRAF a livello del codone 600 nell'allele *wild-type* (1) e nell'allele mutato (2)



4. RISULTATI

Abbiamo suddiviso i 136 pazienti affetti da CPT in 2 categorie: 92 pazienti con BRAF + (68%) e 44 pazienti con BRAF – (32%).

Abbiamo quindi confrontato le caratteristiche clinico patologiche dei 92 casi di CPT BRAF + vs i 44 casi di CPT BRAF – considerando sesso, età, istologia, diametro del tumore, stadiazione distinguendo i pazienti in base all'età ≤ 45 anni o > 45 anni, infiltrazione della capsula, metastasi linfonodali, multifocalità, Tg al follow up.

I 92 pazienti BRAF + erano femmine nel 78% e maschi nel 22%; l'età media alla diagnosi era pari a

51 anni (range 25-74), 33 casi (36%) avevano età \leq 45 anni e 59 casi (59%) età $>$ 45 anni. La diagnosi istologica definitiva di CPT era variante classica in 90 casi (98%) e a cellule alte in 2 casi (2%). Il diametro della lesione primitiva era \leq 5 mm in 4 casi (4%), \leq 1 cm in 21 casi (23%) e $>$ 1 cm in 67 casi (73%).

I pazienti BRAF+ di età \leq 45 anni erano allo stadio I in 30 casi (91%) e allo stadio II in 3 casi (9%), i pazienti BRAF+ di età $>$ 45 anni erano allo stadio I in 19 casi (32%), allo stadio III in 36 casi (61%), allo stadio IV in 4 casi (7%).

L'infiltrazione della capsula era presente all'istologia in 53 casi (58%), precisamente in 2 dei 4 casi con diametro della lesione \leq 5 mm (50%), in 15 dei 21 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (71%), in 36 dei 67 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (54%).

Le metastasi linfonodali erano presenti in 36 casi (39%), precisamente in 2 dei 4 casi con diametro della lesione \leq 5 mm (50%), in 5 dei 21 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (24%) e in 29 dei 67 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (43%).

La multifocalità era presente in 45 casi (49%), precisamente in 3 dei 4 casi con diametro della lesione \leq 5 mm (75%), in 16 dei 21 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (76%) e in 26 dei 67 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (39%).

La mediana della Tg postoperatoria nei pazienti BRAF+ era pari a 0,38 ng/ml (min 0,00- max 540,00).

I 44 pazienti BRAF – erano femmine nel 77% e maschi nel 23%, l'età media alla diagnosi era pari a 44 anni (range 11-72), 20 casi avevano età \leq 45 anni (45%) e 24 casi età $>$ 45 anni (55%). La diagnosi istologica definitiva era di CPT variante classica in 38 casi (89%) e CPT variante follicolare in 6 casi (11%). Il diametro della lesione primitiva era \leq 5 mm in 2 casi (5%), \leq 1 cm in 6 casi (14%) e $>$ 1 cm in 36 casi (81%).

I pazienti BRAF- di età \leq 45 anni erano allo stadio I in 19 casi (95%) e allo stadio II in 1 caso (5%), i pazienti di età $>$ 45 anni erano allo stadio I in 12 casi (50%), allo stadio II in 1 caso (4%), allo stadio III in 8 casi (33%), allo stadio IV in 3 casi (13%).

L'infiltrazione della capsula era presente in 53 casi (58%), precisamente in 2 dei 6 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (33%) e in 22 dei 36 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (61%).

Le metastasi linfonodali erano presenti in 18 casi (41%), ovvero in 1 dei 2 casi con diametro della lesione \leq 5 mm (50%), in 2 dei 6 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (33%) e in 15 dei 36 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (42%).

La multifocalità era presente in 18 (41%) dei casi, in particolare in tutti i casi con diametro della lesione \leq 5 mm, in 3 dei 6 casi con diametro della lesione \leq 10 mm (50%), e in 13 dei 36 casi con diametro della lesione $>$ 10 mm (36%).

La mediana della Tg postoperatoria nei pazienti BRAF- era pari a 0,16 ng/ml (min 0,00- max 593,00). Confrontando i 2 gruppi BRAF + vs BRAF - osserviamo che si trattava di femmine nel 78% dei BRAF+ vs 77% dei BRAF -, i maschi erano il 22% nei BRAF + vs il 23% nei BRAF - (p=0.84). L'età media alla diagnosi era pari a 51 anni (range 25-74) per i pazienti BRAF + e 44 anni (range 11-72) per i BRAF - , con una p statisticamente significativa e pari a 0.0054. I pazienti di età inferiore a 45 anni erano pari al 36% per i BRAF + e al 45% per i BRAF-, mentre i pazienti di età superiore a 45 anni erano pari al 64% per i BRAF + e al 55% per i BRAF- (p= 0.21). Si trattava di CPT variante classica nel 98% dei casi BRAF + nel'89% dei casi BRAF -, nel 2% dei BRAF + si trattava di CPT a cellule alte e nell'11% dei BRAF - si trattava di CPT variante follicolare con un valore della p significativo e pari a 0.0014. Il diametro della lesione era ≤ 5 mm nel 4% dei BRAF + vs 5 % dei BRAF-, ≤ 10 mm nel 23 % dei BRAF+ vs 14 % dei BRAF-, > 10 mm nel 73 % dei BRAF + vs 81% dei BRAF- (p= 0.62). La Tg postoperatoria aveva una mediana pari a 0,38 ng/ml nei casi BRAF+ e 0.16 ng/ml nei BRAF- (p=0.68) (Tabella 6).

Considerando BRAF+ vs BRAF-, i pazienti di età ≤ 45 anni erano nello stadio I nel 91% vs 95%, nello stadio II nel 9% vs 5%, (p=0.92). I pazienti di età > 45 anni erano nello stadio I nel 32% vs 50%, nello stadio II 0% vs 4%, nello stadio III 61% vs 33%, nello stadio IV nel

7% vs 13%, con una p significativa e pari a 0.0318 (Tabella 7).

L'invasione della capsula tiroidea si presentava nel 58% dei BRAF + vs 55% dei BRAF – (p=0.89). Considerando BRAF+ vs BRAF – e il diametro della lesione primitiva, l'infiltrazione capsulare era presente nel 4% vs 0% nei casi con diametro \leq 5 mm , nel 28% vs 8% nei casi con diametro \leq 10 mm, nel 68% vs 92% nei casi con diametro $>$ 10 mm (p=0.109) (Tabella 8).

Le metastasi linfonodali erano presenti nel 39% dei BRAF + vs 41% dei BRAF – (p=0.59). Considerando BRAF+ vs BRAF – e il diametro della lesione primitiva, le metastasi linfonodali erano pari a 6% vs 6% nei casi con diametro \leq 5 mm, nel 14% vs 11% nei casi con diametro \leq 10 mm, nell'80% vs 83% nei casi con diametro $>$ 10 mm (p=0.94) (Tabella 9).

Il tumore era multifocale nel 50% dei BRAF + vs 41 % dei BRAF – (p=0.3). Considerando BRAF+ vs BRAF – e il diametro della lesione primitiva multifocalità era pari a 9% vs 11% nei casi con diametro \leq 5 mm, nel 35% vs 17% nei casi con diametro \leq 10 mm, nel 57% vs 72% nei casi con diametro $>$ 10 mm (p=0.26) (Tabella 10).

Nel confronto tra i due gruppi BRAF + vs BRAF – sono risultate statisticamente significative le differenze riguardo le seguenti variabili: età (p=0.0054), istologia

(p=0.0014), stadiazione nei pazienti di età > 45 anni (p=0.03).

Tabella 6. BRAFV600E e le caratteristiche clinico-patologiche dei CPT. CPT VC= CPT variante classica, CPT VF= CPT variante follicolare, CPT CA= CPT a cellule alte.

	BRAF +	BRAF -	P
Sesso	F 72 (78%) M 20 (22%)	F 34 (77%) M 10 (23%)	0,84
Età	Media 51 Min 25 Max 74	Media 44 Min 11 Max 72	0,0054
Classi di età	≤ 45 aa 33 (36%) >45 aa 59 (64%)	≤ 45 aa 20 (45%) >45 aa 24 (55%)	0,21
Istologia	CPT VC 90 (98%) CPT VF 0 CPT CA 2 (2%)	CPT VC 39 (89%) CPT FV 6 (11%) CPT CA 0	0,0014
Diametro della lesione	≤ 5 mm 4 (4%) ≤ 10 mm 21 (23%) >10 mm 67 (73%)	≤ 5 mm 2 (5%) ≤ 10 mm 6 (14%) >10 mm 36 (81%)	0,62
Tg (ng/L)	Mediana 0,38 Min 0,00 Max 540,00	Mediana 0,16 Min 0,00 Max 593,00	0,68
N° casi	92	44	

Tabella 7. BRAF+ vs BRAF-: stadiazione

Stadiazione	BRAF +	BRAF -	P value
Pazienti di età ≤ 45 anni	I 30 (91%) II 3 (9%)	I 19 (95%) II 1 (5%)	0,92
Pazienti di età > 45 anni	I 19 (32%) II 0 III 36 (61%) IV 4 (7%)	I 12 (50%) II 1 (4%) III 8 (33%) IV 3 (13%)	0,0318

Tabella 8. BRAF+ vs BRAF-: Infiltrazione capsulare

	BRAF +		BRAF -		P value
Infiltrazione capsulare	Diametro	n° casi	diametro	n° casi	0,109
	≤ 5 mm	2 (4%)	≤ 5 mm	0 (0%)	
	≤ 10 mm	15 (28%)	≤ 10 mm	2 (8%)	
	> 10 mm	36 (68%)	> 10 mm	22 (92%)	
Infiltrazione capsulare		53 (58%)		24 (55%)	0.89

Tabella 9. BRAF+ vs BRAF-: metastasi linfonodali.

	BRAF +		BRAF -		P value
Metastasi linfonodali	Diametro	n° casi	Diametro	n° casi	0,94
	≤ 5 mm	2 (6%)	≤ 5 mm	1 (6%)	
	≤ 10 mm	5 (14%)	≤ 10 mm	2 (11%)	
	> 10 mm	29 (80%)	> 10 mm	15(83%)	
Metastasi linfonodali		36 (39%)		18 (41%)	0.59

Tabella 10. BRAF+ vs BRAF-: multifocalità.

	BRAF +		BRAF -		P value
Multifocalità	diametro	n° casi	diametro	n° casi	0,26
	≤ 5 mm	3 (7%)	≤ 5 mm	2 (11%)	
	≤ 10 mm	16 (35%)	≤ 10 mm	3 (17%)	
	> 10 mm	26 (58%)	> 10 mm	13(72%)	
Multifocalità		45 (50%)		18 (41%)	0.3

BRAF e categorie citodiagnostiche

Considerando i 266 casi sottoposti a citologia su agoaspirato e intervento chirurgico, si trattava di 202 F (76%), 64 M (24%), con età media pari 47.8 anni (range 11-74). Le diagnosi citologiche preoperatorie erano le seguenti: THY 1 in 5 casi, THY2 in 4, THY3 in 119, THY4 in 45, THY5 in 93. L'istologia definitiva nei THY 1 ha dato lettura di CPT in 2 casi (40%) e CFT in

1 caso (20%) e BRAF è risultato mutato nei 2 casi di CPT (100% dei CPT e 40% dei THY1); nei THY 2 , 1 caso è risultato CPT (25%) e mutato per BRAF (100% dei CPT e 25% dei THY2); nei THY 3, 20 casi sono risultati maligni, 6 CPT (5%) e 14 CFT (12%), BRAF è risultato mutato in 2 CPT (33% dei CPT e 2% dei THY3); nei THY 4, 40 casi sono risultati CPT (89%) e BRAF è risultato mutato in 28 casi (70% dei CPT e 62% dei THY4). Infine nei THY 5, di 93 casi di CPT, 65 presentavano una mutazione di BRAF (70% dei CPT e dei THY5) (Tabella 11). Confrontando la diagnosi citologica e la ricerca di mutazione BRAF si osserva che il PPV era pari a 96% vs 100%, il NPV era pari a 81% vs 64%, la sensibilità era pari a 85% vs 62%, la specificità era pari a 95% vs 100%. Considerando entrambe le metodiche il PPV è risultato pari a 96.4%, il NPV 84%, la sensibilità a 88% e la specificità a 95% (Tabella 12).

Tabella 11. Categorie citodiagnostiche , CPT all'istologia definitiva e presenza di mutazione BRAF.

Categoria citodiagnostica	N° casi	CPT all'istologia	BRAF + (% sul n° casi per categoria citodiagnostica)	BRAF + (% sui CPT della stessa categoria diagnostica)
THY1	5	2	2 CPT (40%)	100%
THY2	4	1	1 CPT (25%)	100%
THY3	119	6	2 CPT (2%)	33%
THY4	45	40	28 CPT (62%)	70%
THY5	93	93	65 CPT (70%)	70%
TOTALE	266	142	98 CPT (37%)	69%

Tabella 12. PPV, NPV, sensibilità e specificità nella diagnosi citologica, nella mutazione BRAF V600E e in entrambe le metodiche.

	PPV (%)	NPV (%)	Sensibilità (%)	Specificità (%)
Citologia	96%	81%	85%	95%
BRAFV600E	100%	64%	62%	100%
Entrambe	96.4%	84%	88%	95%

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I CPT 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). 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 CPT, documentabile nel 36-48% dei casi.

Un recente studio multicentrico ha messo in evidenza che BRAF potrebbe rappresentare un nuovo fattore prognostico indipendente, in grado di identificare i CPT a maggior rischio di recidiva e perdita della capacità di concentrare lo ^{131}I . In particolare tale studio metteva in evidenza che il 23% dei CPT BRAF positivi verso lo 0% dei CPT BRAF negativi perdevano la capacità di concentrare lo iodio nella successiva recidiva. In

questo stesso studio la ricerca di mutazioni BRAF ha incrementato la sensibilità della sola citologia dall'84 all'88% (78) .

Si comprende pertanto che la ricerca preoperatoria di tale mutazione affiancata alla citologia potrebbe essere di estrema utilità nell'iter diagnostico terapeutico del CPT. Infatti nonostante la citologia sia l'esame cardine per la valutazione di un nodulo tiroideo, il limite maggiore di questa tecnica consiste nell'incapacità in circa il 10-20% dei casi di discriminare con certezza una neoplasia benigna da una maligna. Questi pazienti con diagnosi citologica indeterminata vengono sottoposti ad intervento chirurgico e solo nel 20% dei casi risultano affetti da CPT all'esame istologico definitivo (79,80).

Diversi studi hanno messo in evidenza che i CPT con mutazione di BRAF hanno un atteggiamento più aggressivo, presentandosi in stadio più avanzato alla diagnosi e potendo evolvere verso istotipi meno differenziati nel follow up.

In uno studio condotto da Xing e coll. su un campione di 219 pazienti affetti da CPT ha evidenziato come la presenza di mutazione si associ a invasione extratiroidea ($p < 0.001$), a metastasi linfonodali ($p < 0.001$) e ad uno stadio più avanzato di malattia ($p < 0.001$). Inoltre dallo stesso studio è emerso come la presenza della mutazione si associ ad un maggiore

rischio di progressione della malattia e recidiva anche nei pazienti in stadio 1 e 2 ($p=0.002$) (35).

La mutazione BRAF V600E si riscontra anche se con minore frequenza (24-50%), nei microCPT, ovvero in quei tumori di diametro inferiore al centimetro, considerati generalmente a basso rischio di recidiva. Recentemente Lupi e coll. hanno dimostrato che anche nei microCPT, la mutazione BRAF V600E correla in maniera significativa con l'estensione extratiroidea, con uno stadio più avanzato di malattia e con l'invasione capsulare (36).

Nel nostro studio si conferma l'associazione tra la mutazione BRAF V600E e l'età (51 anni nei BRAF+ vs 44 nei BRAF -, $p=0.0054$), la variante istologica di CPT che risulta nei BRAF+ variante classica nel 98% e variante a cellule alte nel 2%, nei BRAF- variante classica nell'89% e variante follicolare nell'11% ($p=0.0014$), la stadiazione dei pazienti di età > 45 anni che risultano, considerando BRAF+ vs BRAF- nello stadio I nel 32% vs 50%, nello stadio II 0% vs 4%, nello stadio III 61% vs 33%, nello stadio IV nel 7% vs 13% ($p=0.0318$).

Zatelli MC e coll. eseguirono l'indagine per la mutazione BRAF su ago aspirato in 469 casi di cui 166 successivamente sottoposti a intervento chirurgico e con esame istologico definitivo. Considerando la diagnosi citologica PPV e il NPV sono risultati rispettivamente pari a 92.1% e 95.9% , la sensibilità e

la specificità sono risultate pari a 77.3% e 98.8% . Considerando la ricerca di mutazione BRAF il PPV e il NPV sono risultati rispettivamente pari a 100% e 93.7% , la sensibilità e la specificità sono risultate pari a 64% e 100%. Considerando entrambe le metodiche il PPV è risultato pari a 92.9% e il NPV 97.5%, la sensibilità 86.7% e la specificità al 98.8% (81).

Nel nostro studio, confrontando la diagnosi citologica, la diagnosi istologica e la ricerca di mutazione BRAFV600E, si osserva che l'istologia definitiva nei THY 1 ha dato lettura di CPT in 2 casi (40%), entrambi BRAF + (100%), nei THY 2 , in 1 caso (25%) BRAF+ (100%), nei THY 3, in 6 casi (5%) di cui 2 sono risultati BRAF + (33%), nei THY 4, in 40 casi (89%) di cui 28 sono risultati BRAF + (70%), infine nei THY 5, l'istologia ha dato lettura di CPT in tutti i casi di cui 65 sono risultati BRAF +(70%). Confrontando la diagnosi citologica e la ricerca di mutazione BRAFV600E osserviamo che il PPV era pari a 96% vs 100%, il NPV era pari a 81% vs 64%, la sensibilità era pari a 85% vs 62%, la specificità era pari a 95% vs 100%. Considerando entrambe le metodiche il PPV, il NPV e la sensibilità aumentano rispetto alla sola citologia e risultano pari rispettivamente a 96.4%, 84%, 88%. In base ai nostri risultati quindi la ricerca di mutazione BRAFV600E migliora il PPV, l'NPV e la sensibilità della sola indagine citologica e risulta utile in particolare in nodi con caratteristiche ecografiche

sospette che, per dimensioni o aspetti citologici possano esitare in diagnosi non conclusive.

In conclusione il gene BRAF può essere utile nella diagnostica e nel follow up dei pazienti con CPT: 1) può avere un ruolo nella scelta del trattamento iniziale e nel follow up, in quanto i tumori con BRAF V600E richiedono una chirurgia più estesa. Poiché in questi tumori progressivamente l'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dello Iodio ed anche la capacità di concentrarlo sembrano ridursi, sarebbe opportuno somministrare una dose iniziale di radioiodio maggiore, per ridurre il rischio di recidiva; la presenza di mutazione può predire un eventuale fallimento del trattamento con radioiodio, visto che i CPT con BRAF mutato tendono a perdere la capacità di captare lo Iodio; 2) nel follow up un paziente con BRAF V600E deve essere monitorato più frequentemente e attentamente attraverso esami bioumorali e accurata diagnostica per immagini; 3) in questi casi si potrebbero impiegare delle tecniche di imaging diverse come ad esempio la PET che utilizza il 18-F-fluoro-2 deossi D glucosio.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Pelizzo MR, Boschin Merante I, Toniato A, Pagetta C, Casal Ide E, Mian C, Rubello D: Diagnosis, treatment, prognostic factors and long term out come in papillary thyroid carcinoma. *Minerva Endocrinologica* 2008, 33:359-79.
2. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A national cancer Data Base report on 53.856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998;83(12):2638-48.
3. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15.698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 1997;79(3):564-73.
4. Strate SM, Lee EL, Childers JH. Occult papillary carcinoma of the thyroid with distant metastases. *Cancer*. 1984 Sep 15;54(6):1093-100.
5. Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, Piotto A, Bernante P, Pagetta C et al. Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC): prognostic factors, management and outcome in 403 patients. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Dec;32(10):1144-8.
6. Shah JP, Loree TR, Dhaker D, Strong EW, Begg C, Vlamis V. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg*. 1992 Dec;164(6):658-61.

7 Cady B, Sedgwick CE, Meissner WA, Wool MS, Salzman FA, Werber J. Risk factor analysis in differentiated thyroid cancer. *Cancer*. 1979 Mar;43(3):810-20.

8 Gosnell JE, Clark OH. Surgical approaches to thyroid tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Jun;37(2):437-55.

9. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*. 1989 Mar 1;63(5):908-11.

10. Pelizzo MR, Toniato A, Grigoletto R. Surgical treatment of papillary thyroid carcinoma: uni- and multivariate analysis of prognostic factors (TNM staging system included). *J Exp Clin Cancer Res*. 1997 Sep;16(3):261-5.

11. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002.

JAMA. 2006 May 10;295(18):2164-7.

12. Haselkorn T, Bernstein L, Preston-Martin S, Cozen W, Mack WJ. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Los Angeles County, 1972-1995. *Cancer Causes Control*. 2000 Feb;11(2):163-70.

13. Liu S, Semenciw R, Ugnat AM, Mao Y. Increasing thyroid cancer incidence in Canada, 1970-1996: time

trends and age-period-cohort effects. *Br J Cancer* 2001 Nov 2;85(9):1335-9.

14. Kent WD, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, George RL, Groome PA. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ*. 2007, 177 :1357-61.

15. Reynolds RM, Weir J, Stockton DL, Brewster DH, Sandeep TC, Strachan MW. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Feb;62(2):156-62.

16. Colonna M, Grosclaude P, Remontet L, Schvartz C, Mace-Lesech J, Velten M et al. Incidence of thyroid cancer in adults recorded by French cancer registries (1978-1997). *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38(13):1762-8.

17. Leenhardt L, Bernier MO, Boin-Pineau MH, Conte Devolx B, Marechaud R, Niccoli-Sire P et al. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol*. 2004 Feb;150(2):133-9.

18 Pacini F., Vorontsova T, Demidchik EP, Molinaro E, Agate L, Romei C et al . Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France.*J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3563-9.

19. Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, La Vecchia C, Burt AD, Kerr DJ, Mac Farlane GJ. The

epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog.* 1993;4(1):25-52.

20. Sampson RJ, Key CR, Buncher CR, Iijima S. Thyroid carcinoma in Hiroshima and Nagasaki. I. Prevalence of thyroid carcinoma at autopsy. *JAMA.* 1969 Jul 7;209(1):65-70.

21. Saad AG, Kumar S, Ron E, Lubin JH, Stanek J, Bove KE et al. Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jul;91(7):2672-7.

22. Sont WN, Zielinski JM, Ashmore JP, Jiang H, Krewski D, Fair ME, Band PR, Letourneau EG. First analysis of cancer incidence and occupational radiation exposure based on the National Dose Registry of Canada. *Am J Epidemiol.* 2001 Feb 15;153(4):309-18.

23. Shore RE. Issues and epidemiological evidence regarding radiation-induced thyroid cancer. *Radiat Res.* 1992 Jul;131(1):98-111.

24. Thompson DE, Mabuchi K, Ron E, Soda M, Tokunaga M, Ochikubo S et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Radiat Res.* 1994 Feb;137(2 Suppl):S17-67. Review. Erratum in: *Radiat Res* 1994 Jul;139(1):129.

25. Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM. Thyroid cancer after exposure to external

radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res.* 1995 Mar;141(3):259-77.

26. Sigurdson AJ, Ronckers CM, Mertens AC, Stovall M, Smith SA, Liu Y et al. Primary thyroid cancer after a first tumour in childhood (the Childhood Cancer Survivor Study): a nested case-control study. *Lancet.* 2005 Jun 11-17;365(9476):2014-23.

27. Williams D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):543-9. Review.

28. Galanti MR, Hansson L, Bergstrom R, Wolk A, Hjartaker A, Lund E et al. Diet and the risk of papillary and follicular thyroid carcinoma: a population-based case-control study in Sweden and Norway. *Cancer Causes Control.* 1997 Mar;8(2):205-14.

29. Malchoff CD, Malchoff DM. The genetics of hereditary nonmedullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2455-9. Review.

30. Loh KC. Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid.* 1997 Feb;7(1):107-13.

31. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Jan;8(1):83-95. Review

32. Delys L, Detours V, Franc B, Thomas G, Bogdanova T, Tronko M et al. Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2007 Dec 13;26(57):7894-903.
33. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007 Dec;28(7):742-62. Epub 2007 Oct 16. Review.
34. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. : Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417:949-954.
35. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY et al; 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.
36. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M et al: Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma . *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92:4085-4090.
37. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ et al: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:6373-6379.

38. . 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 Endocrinol (Oxf)*. 2008, 68 :108-16.
39. American Joint Committee Thyroid Cancer. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 6th ed, chapter 8. New York, Springer;2002:89-98.
40. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg*. 2002 Aug;26(8):879-85.
41. Van Nguyen K, Dilawari RA. Predictive value of AMES scoring system in selection of extent of surgery in well differentiated carcinoma of thyroid. *Am Surg* 1995 Feb;61(2):151-55.
42. Pasiaka JL, Zedenius J, Auer G, Grimelius L, Hoog A, Lundell G et al. Addition of nuclear DNA content to the AMES risk-group classification for papillary thyroid cancer. *Surgery*. 1992 Dec;112(6):1154-9; discussion 1159-60.
43. Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control*. 2000 May-Jun;7(3):229-39. Review.

44. Tennvall J, Biorklund A, Moller T, Ranstam J, Akerman M. Is the EORTC prognostic index of thyroid cancer valid in differentiated thyroid carcinoma? Retrospective multivariate analysis of differentiated thyroid carcinoma with long follow-up. *Cancer*. 1986 Apr 1;57(7):1405-14.
45. Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG et al. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology*. 2005 Dec;237(3):794-800.
46. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*. 1993 Feb 5;328(8):553-9. Review.
47. Pacini F, Burrioni L, Ciuli C, Di Cairano G, Guarino E. Management of thyroid nodules: a clinicopathological, evidence-based approach. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Oct;31(10):1443-9. Review.
48. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jun;154(6):787-803. Erratum in: *Eur J Endocrinol*. 2006 Aug;155(2):385.

49. Marqusee E, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Larsen PR, Cibas ES et al. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med.* 2000 Nov 7;133(9):696-700.
50. Cap J, Riska A, Rehorkova P, Hovorkova E, Kerekes Z, Pohnetalova D. Sensitivity and specificity of the fine needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999 Oct;51(4):509-15.
51. Braga M, Cavalcanti TC, Collaco LM, Graf H. Efficacy of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of complex thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4089-91.
52. Mulchahy MM, Cohen JI, Anderson PE, Ditamasso J, Schmidt W. Relative accuracy of fine-needle aspiration and frozen section in the diagnosis of well-differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope.* 1998 Apr;108(4 Pt 1):494-6.
53. Goldstein RE, Nettekville JL, Burkey B, Johnson JE. Implications of follicular neoplasms, atypia, and lesions suspicious for malignancy diagnosed by fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Ann Surg.* 2002 May;235(5):656-62; discussion 662-4.
54. Poller DN, Ibrahim AK, Cummings MH, Mikel JJ, Boote D, Perry M: Fine needle aspiration of the thyroid. *Cancer* 2000, 25:239-44.

55. Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, Piotto A, Pagetta C, Gross MD, et al. Papillary thyroid carcinoma: 35-year outcome and prognostic factors in 1858 patients. *Clin Nucl Med*. 2007 Jun;32(6):440-4.
56. Toniato A, Boschin IM, Casara D, Mazzarotto R, Rubello D, Pelizzo MR: Papillary thyroid carcinoma: factors influencing recurrence and survival. *Annals of Surgical Oncology* 2008, 15:1518-1522.
57. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1987 Dec;102(6):1088-95
58. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994 Nov;97(5):418-28
59. Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, Pagetta C, Piotto A, Bernante P et al. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of papillary thyroid microcarcinoma (PTMC): a monoinstitutional 12-year experience. *Nucl Med Commun* 2004 Jun;25(6):547-52
60. Hay ID, Grant CS, Van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold JR, Bergstralh EJ. Papillary thyroid microcarcinoma : a study of 535 cases observed in a

50-years period. *Surgery*. 1992 Dec;112(6):1139-46; discussion 1146-7

61. Baudin E, Travagli JP, Ropers J, Mancusi F, Bruno-Bossio G, Caillon B et al. Microcarcinoma of the thyroid gland. The Gustave-Roussy Institute experience. *Cancer* 1998 Aug;83(3):553-59

62. Pelizzo MR, Merante Boschini I, Toniato A, Piotta A, Bernante P, Pagetta C et al. Sentinel node mapping and biopsy in thyroid cancer: a surgical perspective. *Biomed Pharmacother*. 2006 Sep;60(8):405-8.

63. Noguchi M, Kinami S, Kinoshita K, Kitagawa H, Thomas M, Miyazaki I, Michigishi T, Mizukami Y. Risk of bilateral cervical lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *J Surg Oncol*. 1993 Mar;52(3):155-9.

64. Noguchi M, Kinami S, Taniya T, Miyazaki I: Bilateral cervical lymph node metastases in well differentiated thyroid cancer. *Arch Surg* 1990, 125:804-806.

65. Miralieu E, Visset J, Sagan C, Hamy A, Le Bodic MF, Paineau J: Localization of cervical node metastases of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1999, 23: 970-3.

66. Blankenship DR, Chin E, Terris DJ: Contemporary management of thyroid cancer. *American J of Otorhinolaryngology* 2005, 26:249-260.

67. Pelizzo MR: Chirurgia del carcinoma tiroideo differenziato. *L'endocrinologo* 2008, 9:10-15.
68. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N: Papillary carcinoma of the thyroid. Value of prophylactic lymph node excision. *Cancer* 1970, 26:1061-4.
69. Hamming JF, Van de Velde CJ, Goslings BM, Fleuren GJ, Hermans J, Delemarre JF et al.: Preoperative diagnosis and treatment of metastases to the regional lymph nodes in papillary carcinoma of the thyroid gland. *Surg Gynecol Obstet* 1989, 169:107-114.
70. Miccoli P, Berti P, Frustaci GL, Ambrosini CE, Materazzi G. Video-assisted thyroidectomy: indications and results. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 Apr;391(2):68-71.
- 71 . Toniato A, Mazzarotto R, Piotto A, Bernante P, Pagetta C, Pelizzo MR. Identification of the non recurrent laryngeal nerve during thyroid surgery: 20-year experience. *World J Surg* 2004;28:659-61.
72. Pelizzo MR, Toniato A, Gemo G. Zuckerkandl's tuberculum: an arrow pointing to the recurrent laryngeal nerve (constant anatomical landmark). *J Am Coll Surg.* 1998 ;187: 333-6.
73. Toniato A, Boschini IM, Piotto A, Pelizzo MR, Guolo AM, Foletto M, Casal Ide E. Complications in thyroid surgery for carcinoma: one institution's surgical experience. *World J Surg.* 2008 Apr;32(4):572-5.

74. Bergamaschi R, Becouarn G, Ronceray J, Amaund JP. Morbidity of thyroid surgery. *Am J Surg* 1998, 176:71-75.
75. Kong YX, Wright G, Pesudovs K, O'Day J, Wainer Z, Weisinger HS: Horner Syndrome. *Clin Exp Optom* 2007, 90:336-44.
76. Merante Boschini I, Meduri F, Toniato A, Pagetta C, Rubello D, Pelizzo MR. Cervical lymphorrhea after nodal dissection: role of fasting based on clinical evidence. *Minerva Chir.* 2006 Feb;61(1):57-62.
77. Sapia 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.
78. 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, Tufano 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, 90:6373-9.
79. Xing M, Tufano RP, Tufano AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, Byrne PJ, Wang J, Sidransky D, Ladenson PW. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic

tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2867-72.

80. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of BRAF (V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against BRAF (V600E). *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1795(2):152-61.

81. Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, Rossi R, Cavazzini L, Roti E, degli Uberti EC. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol.* 2009, 161:467-73.