

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

IN ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA-XXV CICLO

SEZIONE DI CLINICA CHIRURGICA II

DIRETTORE: Prof.ssa Maria Rosa PELIZZO



Tesi di Dottorato

IL CARCINOMA DELLE PARATIROIDI: IMPATTO DELLO STATUS GENETICO HRPT2 NELLA PRATICA CLINICA

Direttore della Scuola: Prof.ssa Paola ZANOVELLO

Supervisore: Prof.ssa Maria Rosa PELIZZO

Dottorando: Dr.ssa Nadia SORGATO

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

INDICE	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
L'iperparatiroidismo	8
Il carcinoma delle paratiroidi	17
<i>Epidemiologia</i>	18
<i>Eziologia</i>	18
<i>Patogenesi</i>	20
<u>Ruolo del gene HRPT2</u>	21
<u>Ruolo del gene CTNNB1</u>	26
<i>Anatomia patologica</i>	28
<i>Caratteristiche cliniche</i>	31
<i>Diagnosi differenziale</i>	32
<i>Storia naturale e prognosi</i>	33
<i>Terapia</i>	34
SCOPO DELLO STUDIO	37

MATERIALI E METODI	39
L'analisi genetica	41
RISULTATI	45
Analisi genetica	51
DISCUSSIONE	55
CONCLUSIONI	61
BIBLIOGRAFIA	63
TAVOLE FOTOGRAFICHE	

RIASSUNTO

Presupposti e scopo dello studio

La nostra ricerca è finalizzata all'analisi di mutazione del gene HRPT2, che codifica per la proteina Parafibromina, e alla valutazione del suo impatto clinico nelle forme sporadiche di carcinoma delle paratiroidi e negli adenomi paratiroidi atipici, in quanto mutazioni inattivanti il gene HRPT2 sono emerse in una forma familiare di iperparatiroidismo- la sindrome iperparatiroidismo associato a tumore della mandibola (HPT-JT)- che comporta un aumentato rischio di carcinoma delle paratiroidi clinicamente aggressivo.

Materiali e Metodi

Lo studio ha arruolato tutti i pazienti affetti da carcinoma o adenoma atipico delle paratiroidi che sono stati sottoposti ad intervento chirurgico presso il nostro reparto dal 1975 a maggio 2012. Lo studio genetico è stato eseguito su DNA isolato dal tessuto patologico e dai leucociti ottenuti da sangue periferico. Sono stati raccolti in un database e analizzati statisticamente i dati clinici preoperatori (sintomi, dati di laboratorio, dati radiologici), operatori (tipo di intervento chirurgico, esame istologico, paratormone rapido intraoperatorio-IOPTH) e postoperatori (dati di laboratorio, follow-up). I risultati dello studio genetico sono stati correlati con i dati clinici.

Risultati

Lo studio ha compreso 75 pazienti (gruppo 1: 41 carcinomi; gruppo 2: 34 adenomi atipici) di età media 59 anni. I pazienti con adenoma atipico e carcinoma non differivano statisticamente per sintomi, calcemia media preoperatoria (3,2

mMol/L), dimensione della lesione , ma i carcinomi presentavano valori medi di PTH più elevati (477,8 vs 931,8 ng/L). La sopravvivenza è risultata dell'88,13% a cinque anni e del 79,74% a dieci anni. Costituiscono fattori di rischio per lo sviluppo di recidiva: valori elevati di calcemia preoperatoria (3,4 mMol/L), l'esecuzione di paratiroidectomia semplice, la mancata riduzione dello IO-PTH, il reperto istologico di infiltrazione dei tessuti limitrofi. Fattore prognostico negativo è risultata la presenza di mutazione HRPT2, riscontrata in tre pazienti affetti da carcinoma, i quali hanno avuto decorso rapidamente infausto. Nessun adenoma atipico ha presentato mutazione HRPT2.

Conclusioni

Nei carcinomi delle paratiroidi, la genetica HRPT2 dovrebbe essere considerata parte delle analisi da valutare assieme ai parametri convenzionali in quanto correla con una forma di malattia più aggressiva. L'utilità dello screening genetico HRPT2 dovrebbe presupporre un follow-up più intenso e uno screening familiare. Lo studio genetico è sicuramente utile nell'indirizzare ad un approccio chirurgico più aggressivo che a tutt'oggi rimane il solo trattamento più efficace.

ABSTRACT

Background and aim of the study

We looked for mutations of the HRPT2 gene, which encodes the parafibromin protein, and for its clinical impact in sporadic parathyroid carcinoma and atypical parathyroid adenoma because germ-line inactivating HRPT2 mutations have been found in a type of familial hyperparathyroidism - hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome – that carries an increased risk of aggressive parathyroid cancer.

Methods

We investigated every patient with a diagnosis of parathyroid carcinoma or atypical parathyroid adenoma, who had undergone surgery by one surgeon from 1975 to May 2012 at our Department. Genetic studies were performed from genomic DNA isolated from peripheral blood leukocytes and parathyroid tissue. Preoperative (symptoms, biochemical analysis, imaging), operative (surgery, histological analysis) and post-operative (follow-up) data have been collected in a database and statistically processed. The genetic analysis results have been correlated with the clinical course.

Results

The study involved 70 patients (group 1: 39 carcinomas, group 2: 31 atypical adenoma). Until now, we investigated 18 patients with parathyroid carcinoma and 8 patients with atypical adenoma. We detected HRPT2 mutation in two patients with carcinoma that died for rapid tumor progression.

Conclusions

HRPT2 status would be a piece of information to add to the conventional clinical parameters: it correlates with a more aggressive disease. The diagnostic utility of the HRPT2 screening might provide grounds for more aggressive follow-up and family screening. This test will be especially helpful if it directs us to an aggressive surgical approach because that is ultimately the only cure for this devastating disease.

INTRODUZIONE

Il carcinoma delle paratiroidi è un tumore endocrino raro che può rivelarsi a malignità fatale. La diagnosi di carcinoma risulta difficile, ancor più difficile è la diagnosi differenziale con l'adenoma atipico. La terapia rimane a tutt'oggi solo chirurgica.

Il comportamento biologico di questa patologia rileva due tendenze:

- Una di lenta crescita, tipico delle forme macroscopicamente silenti, definite come carcinomi soprattutto per il loro sviluppo espansivo. In questi casi la patologia può essere spesso misconosciuta e la diagnosi di carcinoma può scaturire da una recidività non controllabile.
- L'altra tendenza è invece quella di estrema aggressività: si tratta di forme invasive di immediato riconoscimento all'atto operatorio per il coinvolgimento delle strutture circostanti e/o la presenza di metastasi linfonodali. Proprio i caratteri macroscopici di queste forme obbligano ad ampie resezioni in blocco. Molto spesso tuttavia l'intervento esita in ripresa e progressione della malattia.

Del resto, tutti i processi oncogeni sono orchestrati da geni "impazziti", che determinano un danno irreversibile nel DNA delle cellule, danno che occorre assai raramente nelle cellule germinali, mentre ha come bersaglio frequentissimo le cellule somatiche. Anche nello studio dei processi che determinano lo sviluppo dei tumori delle ghiandole paratiroidi e del carcinoma in particolare, la ricerca si è concentrata nell'individuare anomalie in geni proto-oncogeni e oncosoppressori, in un percorso tortuoso che ha portato alla fine a definire con chiarezza, almeno alcuni dei geni implicati¹.

Molto è stato fatto negli ultimi dieci anni per chiarire le basi molecolari delle neoplasie delle ghiandole paratiroidi e le loro ripercussioni sull'evoluzione tumorale che ha inconfondibili peculiarità. In particolare, resta ancora da definire il ruolo del gene HRPT2 che codifica la proteina denominata Parafibromina, probabilmente coinvolta nella carcinogenesi di questo tumore².

Molti rimangono ancora i limiti alla ricerca sul carcinoma delle paratiroidi, dovuti in primis all'esiguo numero di casi correlato alla bassa incidenza: ci si avvale il più delle volte di studi multicentrici. La nostra personale casistica apporta un importante contributo numerico alla ricerca. Inoltre l'analisi di mutazione del gene HRPT2 e la valutazione del suo impatto clinico nelle forme sporadiche di carcinoma delle paratiroidi e negli adenomi atipici, ai fini di una diagnosi precoce e di una terapia adeguata, è supportata da una significativa esperienza trentennale con la chirurgia delle paratiroidi e il trattamento degli iperparatiroidismi³.

L'IPERPARATIROIDISMO

L'iperparatiroidismo (IPT) è una malattia caratterizzata da un'eccessiva secrezione di paratormone⁴, con ipercalcemia, non sempre presente in tutti i pazienti e ipofosfatemia presente solo in un terzo dei casi⁵. La diagnosi di IPT è divenuta più frequente con l'introduzione del dosaggio routinario del calcio serico; ciò ha consentito di identificare in percentuale sempre maggiore pazienti con IPT di grado lieve od anche asintomatici; questo dato ha provocato una radicale variazione del quadro clinico, sino alla scomparsa pressoché totale di quadri quali l'osteite fibrosocistica, la nefrocalcinosi e la calcolosi renale, reperti clinici di frequente osservazione in passato.

Da un punto di vista fisiopatologico si possono distinguere 3 forme di IPT⁶:

1) Iperparatiroidismo Primario (IPTP): è provocato nell'80% dei casi da un adenoma paratiroideo singolo mentre l'iperplasia diffusa è presente nel 15% dei

casi, di cui circa la metà correlati con una MEN 1 o MEN2. Gli adenomi multipli sono causa di IPTP nel 4-5% dei casi, mentre il carcinoma paratiroideo è responsabile solamente dell'1%.

2) Iperparatiroidismo Secondario (IPTS): è una malattia caratterizzata da elevati livelli di PTH nel sangue circolante secondari all'ipocalcemia persistente e l'iperfosforemia, con la comparsa di una iperplasia delle paratiroidi, a cui si associano lesioni ossee tipiche dell'osteodistrofia uremica, calcificazioni vascolari ed ectopiche. La causa più frequente di IPTS è l'insufficienza renale cronica (osteodistrofia renale); altre cause, meno frequenti, sono il malassorbimento intestinale di calcio (rachitismo, osteomalacia), il deficit o la resistenza alla vitamina D, l'iper calciuria idiopatica, l'ipermagnesemia, o la somministrazione prolungata e in eccesso di farmaci come i diuretici tiazidici o gli antiepilettici.

L'IPTS è presente, anche se in maniera lieve e clinicamente poco significativa, nel 100% dei pazienti con insufficienza renale sottoposti a dialisi; infatti l'European Dialysis and Transplant Association riporta una incidenza dello 0,8% nei pazienti in dialisi da meno di 2 anni, e del 15,9% nei pazienti in dialisi da più di 10 anni.

Recentemente, è stato ben evidenziato che l'IPTS è causa di una tossicità sistemica, in particolar modo a livello dell'apparato cardiovascolare, aumentando il rischio di morbilità e di mortalità per causa cardiovascolare nei pazienti in dialisi.

3) Iperparatiroidismo Terziario: insorge nel corso di un IPTS grave, nel quale si ritiene che la cronica stimolazione delle paratiroidi porti ad un funzionamento autonomo delle stesse per cui anche la rimozione definitiva delle cause scatenanti (ad esempio, con un trapianto renale coronato da successo), non determina la risoluzione dell'iperparatiroidismo.

Nella presente tesi sarà descritto l'IPT soprattutto in riferimento a quello primario quale necessaria introduzione al carcinoma delle paratiroidi la cui incidenza viene notoriamente riferita in rapporto all'IPTP.

La prevalenza della patologia è di 3 su 1000 nella popolazione generale, mentre, se si considerano le donne tra i 55 e i 75 anni, la prevalenza sale a 21 su 1000. La patologia è più comune nelle donne, con un rapporto di 3:1. L'incidenza è di circa 30 nuovi casi all'anno su 100.000. Questa incidenza è nettamente superiore a quella riportata fino alla fine degli anni 70, e si ritiene che questo aumento sia dovuto all'introduzione del dosaggio della calcemia nella strumentazione automatica per gli esami ematochimici di routine. Recenti studi, tuttavia, mostrano una certa riduzione di incidenza rispetto a quanto sopra riportato, che potrebbe essere spiegata dal fatto che oggi si pone più attenzione alla spesa sanitaria e quindi il dosaggio della calcemia viene richiesto solo in presenza di un sospetto clinico.

Il rilascio di PTH (84 aa, PM 9000) è finemente regolato dai livelli ematici di calcio libero (ionizzato) (Vedi TAVOLE FOTOGRAFICHE-Figura 1). Tutte le azioni del PTH si attuano attraverso il legame al suo recettore (PTH-R) situato sulla membrana delle cellule bersaglio. Il PTH ha molteplici bersagli nell'organismo, tuttavia i principali siti d'azione sono costituiti dal tessuto osseo e dal rene. A livello osseo il PTH attiva gli osteoclasti determinando una idrolisi enzimatica della matrice organica con liberazione sia di calcio che di fosfato. Nel rene il PTH aumenta il riassorbimento del calcio nel braccio ascendente dell'ansa di Henle e nei tubuli distali e inibisce il riassorbimento di fosfato a livello del tubulo prossimale, in modo che tale effetto fosfaturico permetta l'eliminazione del fosfato proveniente dal processo di riassorbimento osseo, indotti dal PTH. Infine, ancora a livello renale, il PTH stimola la sintesi di $1,25-(OH)_2$ colecalciferolo, forma attiva della vitamina D, che aumenta l'assorbimento intestinale di calcio. Complessivamente queste azioni del PTH determinano a livello plasmatico un incremento del calcio plasmatico e un decremento del fosfato.

L'IPT si realizza quando il normale feedback da parte del calcio sierico è alterato e vi è iperproduzione autonoma di PTH. La causa dell'iperfunzionamento

spontaneo delle paratiroidi è ancora in parte sconosciuta e, come molte neoplasie endocrine, l'iperattività è riconosciuta non sulla base dell'ingrandimento anatomico della ghiandola, ma per gli effetti periferici dell'ormone in eccesso.

La diagnosi si basa sul riscontro di valori elevati di calcemia che si accompagnano ad un aumento del PTH (ipercalcemia PTH-dipendente), oppure a valori di PTH inappropriatamente normali rispetto all'ipercalcemia.

Dal punto di vista clinico oggi circa l'80% dei pazienti con IPT risulta asintomatico. I sintomi, quando presenti, sono legati principalmente all'interessamento renale e scheletrico. Nel rene si può avere una deposizione di sali di calcio nel parenchima o nefrolitiasi recidivante (calcoli di calcio ossalato o calcio fosfato), mentre nell'osso si può avere dall'osteoporosi all'osteite fibroso cistica. I casi di nefrolitiasi-nefrocalcinosi e di osteite fibroso-cistica, manifestazioni tipiche e più gravi della malattia, sono attualmente diminuiti in seguito all'introduzione della misurazione della calcemia nello screening biochimico di routine. L'osteite fibroso cistica, è oggi una condizione piuttosto rara, e consiste in una sostituzione dei normali elementi cellulari dell'osso e del midollo con tessuto fibroso, aumento degli osteoclasti giganti multinucleati nelle lacune di Howship e riassorbimento periostale soprattutto a livello delle falangi e delle ossa lunghe. Ancora non definitivi sono invece i dati circa l'entità del riassorbimento osseo: un aumentato turnover scheletrico è documentato in tutti i pazienti con IPT in base ai marker di neoformazione (fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina e peptidi del procollagene di tipo I) e di riassorbimento (cross-link piridinolinici, telopeptidi del collagene di tipo I) e sembra che la densità dell'osso corticale si riduca progressivamente, in assenza di terapia, mentre la densità dell'osso trabecolare, in particolare a livello delle vertebre, sia relativamente conservata. Comunque l'incidenza di fratture patologiche vertebrali, del polso e costali è aumentata nei pazienti con IPT non trattato, mentre si può ottenere un considerevole recupero della densità minerale ossea dopo intervento risolutivo di paratiroidectomia. Dati recenti, confermano l'aumentata presenza di fratture vertebrali in donne post-menopausali con IPT. Infine, nei pazienti sintomatici si

possono avere sintomi neuromuscolari (debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia), psichiatrici e gastrointestinali. Le altre manifestazioni cliniche del IPT (Tabella 1), compresi i sintomi cosiddetti “aspecifici”, sono in vario grado riconducibili all’ipercalcemia.

In questi pazienti è stato inoltre riscontrato un incremento dei livelli medi di pressione arteriosa e un aumento di altri fattori di rischio cardiovascolare, come il diabete e la dislipidemia: tutto questo aumenta il rischio di aterosclerosi. I soggetti affetti da IPT presentano anche un aumento dell’incidenza di ischemia cardiaca. Indagini sulla riserva coronarica (CFR) di tali pazienti hanno dimostrato una diminuzione di questa: ciò indica una disfunzione a livello del microcircolo cardiaco che diventa più grave quanto più è lungo il tempo dalla diagnosi di malattia.⁷

RENALI	INTESTINALI	OSSEE	PSICHICHE	ALTRE
Poliuria	Polidipsia	Osteopenia	Depressione	Adinamia
Ipercalciuria	Stipsi	Osteoporosi	Perdita di	Astenia
Calcolosi	Nausea, vomito	Fratture	memoria	Ipertensione
Nefrocalcinosi	Ulcera peptica	patologiche	Disturbi della	arteriosa
	Pancreatite	Osteite fibroso-cistica	coscienza	

Tabella 1. Principali manifestazioni cliniche del IPT.

L’IPT può essere classificato in sporadico e familiare, e, sulla base della presenza o assenza di manifestazioni cliniche classiche, in sintomatico e asintomatico.

- Iperparatiroidismo sporadico

L’IPT sporadico rappresenta circa il 90-95% dei casi. E’ di solito sostenuto da un adenoma singolo delle paratiroidi.

- Iperparatiroidismo familiare

L'IPT familiare è una condizione più rara (circa il 5-10%), che può presentarsi in forma isolata o nell'ambito di patologie sindromiche. Le basi molecolari di queste condizioni sono state recentemente identificate.

-Sindrome delle neoplasie endocrine di tipo 1 (Multiple endocrine neoplasia type 1, MEN 1)

L'IPT rappresenta la prima manifestazione clinica della sindrome. Esso insorge verso i 20-25 anni, circa 3 decenni prima rispetto alla forma sporadica; ha una penetranza del 100% a 50 anni. La MEN 1 rappresenta dal 2 al 4 % delle forme di IPT. La forma tipica della sindrome è caratterizzata dal coinvolgimento, oltre delle paratiroidi, dell'ipofisi e del pancreas. Nel 70-80 % dei casi si riscontra una mutazione di un gene oncosoppressore, detto *MEN1*, localizzato sul cromosoma 11, che codifica per una proteina denominata menina.

-Sindrome delle neoplasie endocrine di tipo 2 A (Multiple endocrine neoplasia type 2, MEN 2A)

La MEN 2A è caratterizzata dal carcinoma midollare della tiroide (che ha una penetranza del 100%), dal feocromocitoma monolaterale o bilaterale (50% dei casi) ed infine da un interessamento delle paratiroidi (20-30% dei casi). La MEN 2 A è associata ad una mutazione del proto-oncogene *RET*, localizzato sul cromosoma 10.

-Iperparatiroidismo associato a tumore della mandibola (Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome, HPT-JT)

E' una sindrome rara in cui l'IPT si associa a tumori ossificanti della mandibola e della mascella (circa 30%) e a tumori benigni o più raramente maligni del rene (circa 20%). Presenta un'insorgenza in età giovanile ed ha una elevata penetranza fino all'80%. Nel 15% dei casi l'IPT è dovuto ad un carcinoma della paratiroidi.

Recentemente è stata identificata la mutazione responsabile a carico del gene onco-soppressore, *HRPT2*, localizzato sul cromosoma 1, che codifica per una proteina detta parafibromina.

-Iperparatiroidismo familiare isolato (Familial isolated hyperparathyroidism, FIHP)

E' una sindrome caratterizzata dal solo IPT. In alcune famiglie sono state identificate mutazioni dei geni *MEN1*, *CASR*, *HRPT2*, non accompagnate dalle altre classiche manifestazioni sindromiche. Potrebbe trattarsi di varianti di queste affezioni con espressione fenotipica incompleta.

-Ipercalcemia ipocalciurica familiare (Familial hypocalciuric hypercalcemia, FHH)

E' una condizione rara ereditaria caratterizzata da modica ipercalcemia, ipocalciuria e livelli normali o modicamente elevati di PTH. E' legata ad una mutazione inattivante eterozigote del *CASR*, situato sul cromosoma 3.

-Iperparatiroidismo neonatale severo (Neonatal severe hyperparathyroidism, NSHP)

E' una condizione estremamente rara, potenzialmente mortale se non riconosciuta e trattata (paratiroidectomia totale), che si presenta nel neonato, caratterizzata da ipercalcemia, elevati livelli di PTH, ipotonia e distress respiratorio. Essa è dovuta ad una mutazione inattivante omozigote del *CASR*.

-Iperparatiroidismo sintomatico.

Vengono inclusi in questo gruppo i casi di IPT con manifestazioni classiche della malattia. I sintomi e i segni possono essere distinti in vari sottogruppi (vedi anche Tabella 1):

-Iperparatiroidismo asintomatico

In questo gruppo sono inclusi i casi privi delle manifestazioni ossee e renali. Il termine asintomatico non è del tutto corretto. Infatti, non raramente possono essere presenti manifestazioni aspecifiche della malattia o quadri asintomatici di compromissione renale e/o ossea, che possono emergere da una valutazione clinico/strumentale, allora i pazienti dovranno essere inquadrati come sintomatici.

L'IPT è causato nell'85% dei casi da un adenoma singolo, nel 10-15% dei casi da iperplasia e nel 0.5-1% dei casi da carcinoma delle paratiroidi.

L'adenoma ha un'origine clonale ed è dovuto ad una mutazione oncogenica di una singola cellula progenitrice. Recentemente sono stati identificati alcuni geni che sarebbero capaci di modulare la crescita delle paratiroidi; l'acquisizione da parte della cellula tumorale di questi geni la renderebbe capace di una crescita incontrollata. Uno di questi geni è l'oncogene PRAD1 (*Parathyroid adenoma 1*) la cui espressione è aumentata in un sottogruppo di adenomi (circa il 30%). La sede tipica dell'adenoma è a livello della regione retro-tiroidea, sede eutopica delle ghiandole; in rari casi l'adenoma può essere in sede ectopica (intra-tiroidea, mediastino superiore, timo e, occasionalmente, spazio retroesofageo, sottomucosa dell'esofago e faringe).

Da un punto di vista macroscopico l'adenoma si presenta come una lesione brunastra capsulata e ben circoscritta con all'interno aree di degenerazione cistica ed emorragiche. Il peso varia da 300 mg a diversi grammi. Microscopicamente si presenta composto da cellule paratiroidi principali (adenoma a cellule principali o a cellule chiare), arrangiate con una rete capillare, tipica dei tumori endocrini. Più raramente l'adenoma può essere costituito più o meno da cellule ossifile (adenoma a cellule ossifile).

L'adenoma atipico è una condizione rara che, dal punto di vista morfologico, si situa a metà tra l'adenoma benigno ed il carcinoma. Esso è costituito da cellule piccole, compatte, uniformi e con nuclei neri, irregolari o multinucleate (cellule atipiche); inoltre si possono riscontrare bande fibrose ed un aumento del numero delle mitosi. I casi diagnosticati all'istologia come adenomi atipici, possono essere differenziati dai carcinomi solo sulla base del follow-up. Segnalati da Bondeson et al. come "equivocal", il termine *atipico* è stato introdotto per descrivere un sottogruppo di tumori delle paratiroidi che dimostrano alcune delle caratteristiche di carcinoma (fibrosi, atipie cellulari, attività proliferativa, mitosi) ma senza evidenza di crescita invasiva (invasione parenchimale, capsulare o vascolare). Molto spesso il reperto intraoperatorio non consente di differenziare un adenoma atipico da un carcinoma, come non lo permettono le caratteristiche cliniche di presentazione. L'unica caratteristica che permette una diagnosi incontrovertibile di carcinoma è un'evidenza macroscopica di invasione dei tessuti limitrofi. Il ruolo dell'esame istologico estemporaneo in questi casi è molto discutibile dato che la distinzione tra un carcinoma e un adenoma degenerato è pressoché impossibile. Il comportamento clinico degli adenomi atipici sembrerebbe non differire da quello degli adenomi. Comunque, viene raccomandato uno stretto follow-up clinico in considerazione della lunga storia naturale di molti carcinomi delle paratiroidi. Tale è il nostro atteggiamento a riguardo dei casi che abbiamo registrato.

Un'iperplasia, con interessamento diffuso delle paratiroidi, si ha in circa 12-15 % dei casi. Essa rappresenta la lesione istologica tipica della MEN1, MEN 2A e dell'iperparatiroidismo familiare isolato. Macroscopicamente tutte le paratiroidi risultano di dimensioni aumentate, anche se non in egual misura; in alcuni casi una ghiandola può essere più ingrandita rispetto alle altre da simulare un adenoma. Il peso delle 4 paratiroidi iperplastiche può variare da 150 mg a 20 grammi, anche se di solito è di 1-3 grammi. Microscopicamente si rileva una

iperplasia delle cellule paratiroidi principali con rare cellule ossifile; vi può essere anche una forma nodulare e pseudoadenomatosa nella quale le cellule principali con rare cellule ossifile sono circoscritte da tessuto prevalentemente stromale.

Il carcinoma è spesso una lesione piuttosto grande (circa 12 grammi), caratterizzata da cellule tumorali separate da bande fibrose, presenza di figure mitotiche, con una caratteristica invasione capsulare a tutto spessore con superamento della capsula stessa e dei vasi sanguigni. Queste caratteristiche istologiche non sono sempre facili da definire, e pertanto la diagnosi differenziale con l'adenoma atipico può essere difficoltosa⁸. L'aumento dell'attività mitotica può essere valutato mediante espressione di una proteina nucleare detta Ki67. Possono essere di aiuto altre indagini molecolari ed immunoistochimiche. La perdita di espressione della parafibromina rappresenta una caratteristica comune (70-80%), ma non esclusiva, del carcinoma paratiroideo. Nel capitolo successivo verranno trattate in dettaglio le conoscenze sulla patogenesi, eziologia, anatomia-patologica e aspetti clinico-terapeutici della forma carcinomatosa.

IL CARCINOMA DELLE PARATIROIDI

Il carcinoma paratiroideo costituisce un tumore maligno raro in ambito endocrinologico^{9,10}. Esso rappresenta <1% dei casi sporadici di IPT ed è solitamente associato a manifestazioni cliniche più gravi rispetto all'adenoma paratiroideo. Esso è generalmente indolente, ma progressivo. La diagnosi di neoplasia spesso è possibile solo quando si verificano recidive locali o metastasi a distanza, poiché l'esame istologico dei tumori delle paratiroidi può essere ambiguo o comunque fuorviante. La maggior parte dei pazienti muore per gli effetti dell'ipercalcemia piuttosto che per l'invasione tumorale diretta o delle metastasi a

distanza. Tuttavia una resezione completa del tessuto al momento dell'intervento chirurgico iniziale consente la massima probabilità di una guarigione. Pertanto il chirurgo di fronte ad un paziente con caratteristiche cliniche suggestive di un carcinoma paratiroideo dovrebbe avere un approccio operativo più aggressivo sin dall' inizio. Negli ultimi dieci anni, una maggiore conoscenza della patogenesi molecolare del carcinoma delle paratiroidi ha portato allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche che sembrerebbero essere di aiuto soprattutto nei casi in cui l'istologia è ambigua. Inoltre, in ambito scientifico si spera che una maggiore comprensione della patogenesi del cancro paratiroideo possa portare allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

EPIDEMIOLOGIA

Fino ad oggi, sono stati segnalati circa 400 casi di carcinoma paratiroideo. La serie più grande deriva dal database del National Cancer. Nella maggior parte delle serie di pazienti con IPT, il carcinoma paratiroideo rappresenta <1% di tutti i casi, tuttavia in letteratura è stata riportata anche un'incidenza fino al 5%¹¹. L'utilizzo di diversi criteri per la diagnosi anatomico-patologica è probabilmente il motivo per cui in alcuni studi è stato riportato un tasso di incidenza più elevato. La maggior parte dei casi di carcinoma paratiroideo sono diagnosticati in pazienti tra i 44 e 54 anni, ad un'età in media 10 anni più precoce rispetto alla diagnosi di adenoma. Fortunatamente è un tumore raro nei bambini. La distribuzione per sesso è uguale tra maschi e femmine, a differenza degli adenomi, che sono più frequenti nelle femmine (3-4:1).

EZIOLOGIA

L'eziopatogenesi del carcinoma delle paratiroidi resta ancora in larga parte sconosciuta e sono stati identificati solo pochi fattori che potrebbero essere associati alla malattia¹². L'irradiazione del collo costituisce un fattore di rischio

per lo sviluppo di cancro, che si svilupperebbe in alcuni pazienti che hanno ricevuto tra 30 e 60 Gy nei 5-30 anni precedenti.

Casi di carcinoma delle paratiroidi sono descritti anche in pazienti con insufficienza renale cronica in terapia dialitica, nei quali non ci sono di solito segni preoperatori che possano distinguere tra un iperparatiroidismo secondario e un carcinoma insorto nelle paratiroidi. In tutti i casi riportati in letteratura i livelli di PTH erano elevati, ma non in maniera significativamente maggiore rispetto a quelli frequentemente riscontrati in pazienti emodializzati gravi. I livelli di calcio non erano abbastanza elevati da far sospettare un carcinoma. Pertanto, in pazienti in emodialisi, la diagnosi si può fare solo al tavolo operatorio e l'andamento clinico del carcinoma è in genere più benigno, forse perché, a causa dell'insufficienza renale, i livelli di calcio sono più bassi.

Un certo numero di carcinomi delle paratiroidi viene poi diagnosticato nell'ambito delle sindromi familiari geneticamente trasmesse ed in alcune in particolare. In letteratura sono riportati solo 3 casi di carcinoma paratiroideo in pazienti con MEN1.

Per quanto concerne la MEN2, ci sono studi che rivelano mutazioni eterozigoti del codone 634 di RET in tessuti neoplastici di paratiroidi e il gruppo inglese di Jenjkins ha riportato nel 1997 un caso di carcinoma paratiroideo in un paziente affetto da MEN2. Inoltre, Kawai in un modello di topo transgenico mutato per RET, osservava l'insorgenza, oltre che di carcinoma midollare della tiroide, anche di adenocarcinomi delle paratiroidi (dei 29 topi studiati, la metà sviluppavano la neoplasia maligna paratiroidea tra 5 e 8 mesi di vita). Il carcinoma delle paratiroidi si sviluppa nel 10-15% dei pazienti affetti da HPT-JT, un dato consistente che si è rivelato utile nella comprensione delle basi molecolari della neoplasia, anche nella sua forma sporadica. Le forme infine di FIHP che, sulla base dell'analisi genetica, possono essere considerate varianti della HPT-JT, devono essere analizzate con cura e i pazienti valutati attentamente, in considerazione del rischio di carcinoma.

PATOGENESI

Oncogeni e geni soppressori del tumore sono stati collegati al carcinoma delle paratiroidi, in particolare quelli coinvolti nel controllo del ciclo cellulare¹³. Esempi includono il gene *MEN1*, retinoblastoma (*Rb*), *p53*, *BRCA2*, *ciclina D1/gene PRAD1*. Ad oggi non vi è ancora nessuna prova definitiva che uno di questi geni abbia un ruolo primario nella patogenesi del carcinoma paratiroideo, anche se una alterata espressione di questi prodotti genici può partecipare nel processo di trasformazione neoplastica.

Il rilievo di alterazioni del gene *MEN1* in circa il 30% degli adenomi sporadici aveva indotto i ricercatori a cercare queste alterazioni anche nei carcinomi. I risultati, tuttavia, non sono stati in definitiva positivi: sembra infatti che gli adenomi con mutazione del gene *MEN1* abbiano un bassissimo potenziale di progressione in carcinomi.

Successivamente diversi autori hanno dimostrato alterazioni sul cromosoma 13, in una regione che contiene i geni *Rb* e *BRCA2*.

Ricordiamo brevemente il ruolo fisiologico di *Rb*: è quello di regolare la trascrizione in tutte le cellule dell'adulto. La forma attiva della proteina reprime l'espressione di geni, necessari alla cellula per iniziare a dividersi, mentre la forma inattiva, cioè fosforilata da una serie di proteine regolatrici (ciclina e ciclina kinasi), consente alla cellula di dividersi: è chiaro quindi che l'inattivazione di *Rb* conferisce alla cellula mutata un vantaggio proliferativo nell'ambito del processo della tumorigenesi. Dal momento che anche il gene *BRCA2*, oncosoppressore responsabile del cancro familiare della mammella, mappa nella regione mutata nella maggior parte dei carcinomi paratiroidi, è stato ipotizzato anche un suo coinvolgimento nello sviluppo del carcinoma paratiroideo.

Cryns et al. hanno dimostrato la perdita di espressione della proteina *Rb* nel carcinoma paratiroideo, pertanto l'assenza di questa proteina nei tumori delle paratiroidi è stato proposto come uno strumento per la diagnosi di tumore maligno. Da allora, tuttavia, risultati contrastanti sono stati riportati da altri autori

Lloyd nel 1995, studiando 24 carcinomi e 35 adenomi, conclude che l'immunoreattività per la proteina Rb non è utile nel distinguere i casi maligni da quelli benigni. Sempre secondo Lloyd, risultati migliori nell'individuare lesioni paratiroidi maligne, si possono ottenere utilizzando anticorpi monoclonali contro l'antigene Ki-67 associato al ciclo cellulare, dal momento che una neoplasia paratiroidi con un Ki-67 index (inteso come percentuale di cellule positive per l'antigene che correla con l'attività proliferativa) superiore al 6.0%, ha buone probabilità di essere un carcinoma (nessuna lesione benigna supera il 5.3% $p > 0.2685$). Nel 1999 Farnebo giunge sostanzialmente alle stesse conclusioni. Nel 2003 il gruppo di Shattuck non ha riscontrato delezioni, inserzioni o mutazioni puntiformi né in *Rb*, né in *BRCA2*, proponendo che, se davvero l'attività di *Rb* è ridotta nei carcinomi, ciò dipende da un effetto inattivante epigenetico (ipermetilazione per esempio). In un recente studio del 2004 di Cetani et al, è stato valutato più approfonditamente il ruolo dei geni *RB* e *BRCA2*, nella diagnosi differenziale tra carcinoma e adenoma delle paratiroidi, analizzando sia la perdita di eterozigosi per questi geni (LOH), sia l'espressione della proteina all'immunostochimica. In sintesi, i risultati di questo studio propongono una costante associazione tra la perdita di eterozigosi del gene e negatività nell'immunostochimica in tutti i carcinomi, concludendo che la LOH per *Rb* è presente in tutti i carcinomi, ma non è specifica per questi; l'assenza di LOH esclude una diagnosi di malignità, la presenza combinata di LOH e negatività immunostochimica è suggestiva di carcinoma. In definitiva, non si è raggiunto un accordo circa il ruolo effettivo del gene *Rb* nella patogenesi del carcinoma delle paratiroidi.

Ruolo del gene HRPT2

L'interesse per il gene *HRPT2* e l'idea che questo potesse essere rilevante nell'induzione della neoplasia maligna è derivata dallo studio genetico dei pazienti con HPT-JT, che abbiamo precedentemente descritto¹⁴. L'aumentata prevalenza di

carcinomi nell'ambito di questa sindrome e la certezza, ormai consolidata da numerosi studi, che mutazioni del gene *HRPT2* fossero alla base della malattia, ha portato all'intuizione che lo stesso gene potesse essere implicato anche nell'induzione del carcinoma sporadico. L'ipotesi si è rivelata esatta¹⁵.

Fino al 1995 il locus genico associato alla HPT-JT era stato approssimativamente mappato nella regione 1q25-32. Nel 2002 il gruppo di Carpten ha ridefinito in maniera più accurata questa regione, identificando il gene *Clorf28*, poi chiamato *HRPT2*, le cui mutazioni sono responsabili della sindrome. Questo gene è costituito da 17 esoni, tutti codificanti.

HRPT2 codifica per una proteina di 531 aminoacidi, denominata parafibromina. L'importanza della parafibromina dipende non solo dal ruolo centrale che la sua forma mutata svolge nella HPT-JT, ma anche dall'evidenza che alterazioni della parafibromina si riscontrano nelle forme sporadiche di carcinoma paratiroideo e lo studio di queste può chiarire molti aspetti della tumorigenesi.

Ci sono ormai numerose evidenze che il gene *HRPT2* sia un oncosoppressore, la cui perdita inizia la tumorigenesi (Vedi TAVOLE FOTOGRAFICHE-Figura 2). Studi in vitro di frazionamento subcellulare e analisi al microscopio laser confocale su tessuto di paratiroideo umano normale, hanno localizzato la parafibromina prevalentemente nel nucleo, ma anche nel citoplasma¹⁶. La forma *wilde type* di parafibromina è espressa negli adenomi, ma non nei carcinomi paratiroidi; la presenza della forma *wilde type*, ma non della forma mutata, inibisce la proliferazione cellulare, bloccando l'espressione della ciclina D¹⁷. Questi risultati sono consistenti con il ruolo di oncosoppressore di *HRTP2*.¹⁸

La parafibromina esplica la sua funzione interagendo con Paf1¹⁹, un complesso proteico che interagisce con la RNA polimerasi II ed è costituito da almeno cinque subunità note: Paf1, Cdc73, Leo1, Ctr9, Rtf1.

L'assemblaggio e l'attivazione del complesso Paf1 è richiesto per l'espressione di molti geni cellulari²⁰, in particolare per i geni coinvolti nella regolazione del ciclo

cellulare, della sintesi proteica, del metabolismo lipidico e degli acidi nucleici²¹. La perdita della subunità Cdc73, analogo della parafibromina, comporta l'incapacità di tutto il complesso Paf1 ad interagire con la cromatina e con la RNA polimerasi II. Il complesso Paf1 esplica la sua azione regolatrice intervenendo nella metilazione istonica, che marca geni target indirizzando la trascrizione all'attivazione o alla repressione. In questo modo Paf1 controlla direttamente la trascrizione di numerosi geni.

Ancora Paf1 controlla i meccanismi di fosforilazione di residui della parte carbossi-terminale (CTD) della RNA-Polimerasi II; la fosforilazione di tale dominio è un importante meccanismo che contribuisce alla coordinazione temporale nel recruitment delle subunità proteiche necessarie per la corretta sintesi dell'mRNA (ad esempio la fosforilazione della serina 5 del CTD segna la fine della fase iniziale della trascrizione e l'inizio dell'allungamento)²². E' chiaro dunque che mutazioni nel gene della parafibromina alterano l'assemblaggio dei componenti di Paf1 e l'azione di questo sui suoi numerosi targets genici, dando il via al processo oncogenico^{23,24}.

Il primo lavoro che ha dimostrato il ruolo di *HRPT2* nella patogenesi del carcinoma paratiroideo sporadico è quello di Howell et al.

In questo lavoro venivano identificate mutazioni di *HRPT2* in 4 su 4 carcinomi paratiroidi sporadici e in nessuno dei 25 adenomi paratiroidi sporadici. Inoltre, il riscontro di due mutazioni somatiche contemporanee, così come di una mutazione somatica e di LOH sull'altro allele, in 2/4 casi di carcinoma, confermavano il ruolo di *HRPT2* come soppressore tumorale e sono in accordo con la teoria di Knudson dei "two hits" o dei "2 eventi", secondo la quale affinché il tumore si manifesti sono necessarie 2 mutazioni successive che inattivano la funzione del gene. Nei tumori ereditari una mutazione è germinale mentre l'altra mutazione è somatica ed avviene nelle cellule in un secondo momento. Viceversa nei tumori sporadici entrambi gli eventi si verificano a carico della cellula che originariamente non è portatrice di nessuna mutazione.

Successivamente Shattuck et al²⁵, hanno valutato 15 carcinomi paratiroidei provenienti da pazienti con diagnosi certa, post-operatoria, di carcinoma e con anamnesi familiare rigorosamente negativa sia per IPT che per sindrome HPT-JT. In 10 dei 15 carcinomi, venivano evidenziate mutazioni nell'esone 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 14; in un caso era possibile riscontrare il doppio evento, ovvero una mutazione tipo delezione nell'esone 1 associata a LOH, indicando una inattivazione bi-allelica. Una volta identificata la mutazione nel tessuto neoplastico, venivano analizzati campioni anche di DNA germinale, per essere sicuri che si trattasse di una mutazione somatica. Inaspettatamente, 3/10 mutazioni, apparentemente somatiche, risultavano essere germinali. I risultati di questo studio, oltre a confermare il ruolo di *HRPT2* nei carcinomi sporadici, hanno anche importanti conseguenze: dal momento che un piccolo gruppo di pazienti con carcinoma apparentemente sporadico hanno invece una mutazione germinale, spia di una sindrome HPT-JT, o di una variante di questa sindrome, si rende necessario analizzare anche il DNA germinale di tutti i pazienti con carcinoma, studiarne almeno la mandibola ed il rene con esami di imaging e, laddove ci fosse l'evidenza di mutazioni germinali, fornire ai familiari la possibilità dello screening genetico.

Nel lavoro di Cetani²⁶ sono state individuate mutazioni di *HRPT2* in 9 su 11 paratiroideo carcinomi, ma in nessuno dei 4/4 adenomi atipici sporadici. In 3/9 casi la mutazione era inaspettatamente germinale. Infine era identificata 1 mutazione su 22 adenomi sporadici. La maggior parte delle mutazioni erano *non-senso* e determinavano una mancata o ridotta espressione della proteina codificata, la parafibromina.

Un recente studio di Haven et al, hanno trovato mutazioni inattivanti del gene *HRPT2* in solo 4 dei 28 (15%) casi di carcinoma delle paratiroidi; 2 erano mutazioni germinali. Da evidenziare che questi tumori sono stati classificati come maligni solo sulla base di criteri anatomo-patologici. In questo studio, solo gli

esoni dove si localizzano l'85% di tutte le mutazioni note (1, 2, e 7) sono stati completamente esaminati. La bassa frequenza di mutazioni potrebbe essere spiegata in parte dal fatto che non tutti gli esoni sono stati studiati e non si può escludere che mutazioni siano presenti in altri esoni. Inoltre altri meccanismi di inattivazione del gene *HRPT2*, quale la metilazione del promotore possono essere presenti

L'attenzione per le alterazioni genetiche che causano l'insorgenza del cancro, non è ovviamente finalizzato al puro interesse speculativo, ma è importante per poter studiare il paziente con carcinoma e soprattutto i suoi familiari^{27,28,29}.

Inoltre un test genetico per *HRPT2* potrebbe essere più sensibile e specifico per la diagnosi di tumore maligno, rispetto all'uso dei criteri istopatologici convenzionali.

Lo studio genetico non è tuttavia così agevole da eseguire: un dato importante da tenere presente, è che, se mettiamo insieme tutti i dati riguardanti le mutazioni finora conosciute del gene *HRPT2*, vediamo come non esiste lungo la sequenza genica, una zona critica "*hot spot*" nella quale si concentrano tutte le anomalie genetiche. Le mutazioni sono dunque disperse lungo tutti i 17 esoni del gene, che deve essere sequenziato tutto, prima di poter avere la certezza dell'assenza di alterazioni.

Negli ultimi anni, partendo dall'evidenza che la maggior parte delle mutazioni di *HRPT2* determinano codoni di stop e cioè provocano un'interruzione prematura della parafibromina, si è ipotizzato che l'assenza della proteina potesse essere usata come marker immunoistochimico. Il primo studio è quello di Tan del 2004: venivano analizzati 52 carcinomi, 6 adenomi atipici, 88 adenomi benigni, 9 tumori associati ad HPT-JT. Mediante studi di immunoistochimica³⁰, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-parafibromina, diretto contro la porzione 87-100 della proteina, si dimostrava che la perdita di espressione della proteina era altamente sensibile e specifica per la diagnosi di carcinoma.

Successivi studi di Gill et al. hanno valutato l'espressione della parafibromina con l'immunoistochimica, in 115 tessuti di paratiroide di pazienti con varie condizioni patologiche, tra cui 11 carcinomi sporadici. In 8/11 carcinomi sporadici veniva evidenziata una perdita di espressione della parafibromina e questo si verificava anche in 3/4 pazienti con HPT-JT, in contrasto con il diffuso segnale nucleare, ottenuto negli adenomi.

E' necessario dunque chiarire l'utilità dell'immunoistochimica per la parafibromina come test diagnostico di carcinoma paratiroideo e valutarne sensibilità e specificità rispetto all'indagine genetica ed ai classici criteri istopatologici.

Ruolo del gene CTNNB1

Dati recenti in vitro hanno documentato un ruolo della parafibromina nella via del Wnt-signaling. La via del Wnt-signaling/beta-catenina è coinvolta nella patogenesi di diverse neoplasie umane. La beta-catenina è un protooncogene che normalmente nella cellula viene fosforilato e degradato impedendo così l'attivazione di numerosi geni target. Questa degradazione della beta-catenina avviene ad opera di un complesso multi-proteico di cui fanno parte: axina, APC, GSK-3beta, caseina etc; la 3-beta chinasi glicogeno-sintetasi è un fattore importante che contribuisce in modo diretto alla fosforilazione della beta-catenina che avvia quindi la proteina verso la ubiquitinazione e quindi alla degradazione proteosomica. In condizioni di assenza del segnale della via di Wnt si verifica quanto appena descritto. Quando si verifica invece l'attivazione della via del Wnt-signaling ad opera di fattori che oggi sono perlopiù sconosciuti, si ha l'inibizione della GSK-3Beta, per cui la beta-catenina non viene più degradata e si accumula a livello nucleare.

Il gene *CTNNB1* codifica per la beta-catenina e la maggior parte delle mutazioni riscontrate nei tumori umani sono prevalentemente a carico dell'esone 3 che costituisce quindi un "hot spot" per questo gene.

Questo gene e la sua proteina sono stati studiati anche in tumori delle paratiroidi con risultati discordanti negli adenomi paratiroidi.

- Semba e colleghi hanno valutato 12 tessuti paratiroidi (9 adenomi, 1 carcinoma e 2 iperplasie). L'analisi mutazionale dell'esone 3 del gene *CTNNB1* non ha evidenziato alcuna mutazione. L'espressione della beta-catenina con tecnica di immunohistochimica risultava negativa per la localizzazione nucleare in tutti i tessuti tranne in 1 adenoma.
- Ikeda et al nel 2002 hanno studiato 24 casi di adenomi paratiroidi: in 24/24 casi l'espressione della beta-catenina risultava negativa a livello nucleare e positiva solo a livello della membrana. L'analisi genetica dell'esone 3 del gene *CTNNB1* era negativa.
- Bjorklund e collaboratori nel 2007 e successivamente nel 2008 hanno studiato complessivamente 6 paratiroidi normali e 141 adenomi paratiroidi ottenuti da sezioni fresche. All'indagine immunohistochimica la paratiroide normale presentava uno staining di membrana, mentre gli adenomi mostravano un segnale medio/intenso a carico del citoplasma/nucleo. L'analisi genetica dell'esone 3 del gene *CTNNB1* identificava 9 mutazioni (S37A, 7,3%). L'autore ipotizza che la discrepanza dei suoi risultati rispetto a quelli precedentemente riportati potrebbe essere dovuta al fatto che Semba e Ikeda hanno utilizzato tessuti paraffinati mentre nel suo lavoro sono stati utilizzati tessuti freschi.
- Costa-Guda e Arnold nel 2007 hanno analizzato 97 adenomi sporadici; l'analisi genetica dell'esone 3 del gene *CTNNB1* non ha identificato nessuna mutazione ed in particolare neanche la S37A precedentemente descritta da Bjorklund.
- Juhlin e colleghi nel 2009 hanno studiato con indagine immunohistochimica 12 casi di paratiroide normale, 13 carcinomi, e 18 adenomi: la paratiroide normale mostrava uno staining negativo a livello nucleare, tutti i tumori e gli adenomi paratiroidi mostravano uno staining negativo a livello nucleare.

ANATOMIA PATOLOGIA

Il carcinoma paratiroideo è generalmente di grandi dimensioni (> 3 cm), a margini irregolari, grigio-biancastro, e spesso aderisce tenacemente ai tessuti adiacenti. La presenza di un'infiltrazione a carico delle strutture contigue è suggestiva per la diagnosi di carcinoma.

Un aspetto di notevole importanza ai fini della diagnosi e quindi anche della possibilità di intervenire sul paziente in maniera precoce e risolutiva, è rappresentato dal fatto che si può con certezza definire maligno un tumore delle paratiroidi, solo se questo mostra l'evidenza dell'invasività locale o a distanza. E' chiaro che questa situazione anatomopatologica correla in modo significativo con la gravità del quadro clinico ed è indice di prognosi sfavorevole. Inoltre lascia adito a tutta una serie di dubbi riguardo quelle neoplasie con caratteristiche intermedie, chiamate adenomi atipici, che rappresentano la zona d'ombra nella quale indagare. In effetti è proprio questo il target specifico nella ricerca sul carcinoma delle paratiroidi e anche lo scopo del nostro studio: riuscire ad identificare precocemente e con sicurezza un carcinoma vero, differenziandolo dal comune adenoma.

I criteri istologici di carcinoma paratiroideo³¹ sono difficili da definire e identificare. Schantz e Castleman (53) nel 1973 hanno istituito una serie di criteri, tra cui la presenza di bande fibrose spesse, attività mitotica e l'invasione vascolare e capsulare. Generalmente, le cellule neoplastiche (di solito cellule principali) sono disposte in uno schema lobulare, separate da trabecole e con la presenza di figure mitotiche. L'invasione della capsula è piuttosto comune (60%), mentre quella vascolare si verifica meno frequentemente (10-15%).

L'invasione capsulare è caratterizzata da una lingua di tessuto tumorale che attraversa a tutto spessore le fibre collagene della capsula; deve essere distinta

dalla pseudo-invasione capsulare che può essere dovuta alla "cattura" di cellule tumorali all'interno della capsula stessa, che si può trovare anche nell'adenoma.

I criteri di invasione vascolare sono stati definiti in modo diverso a seconda che il coinvolgimento fosse di un vaso della capsula oppure di un vaso dei tessuti circostanti. La vera invasione vascolare è definita dall'invasione di un vaso fuori dalla capsula e dalla presenza di cellule tumorali nella parete del vaso o di una trombosi intravasale. Poiché il comportamento metastatico è raro al momento della presentazione, la diagnosi di carcinoma paratiroideo sulla base dei criteri morfologici può essere difficile, al momento dell'intervento chirurgico. Molte delle caratteristiche sopra descritte, come ad esempio l'aderenza ai tessuti circostanti, le bande fibrose, la crescita trabecolare, e la mitosi, non sono patognomoniche di malignità, infatti queste caratteristiche si possono riscontrare anche negli adenomi atipici. Il valore diagnostico dell'invasione capsulare e vascolare è ancora dibattuta. Alcuni autori considerano l'invasione vascolare come virtualmente diagnostica di malignità. Pertanto al momento esistono ancora polemiche in ambito scientifico e incertezze diagnostiche.

In sintesi: *Caratteristiche istologiche del carcinoma delle paratiroidi*

1) presenza di sottili bande fibrose, documentate nel 90% dei casi di carcinoma e costituite da aree acellulate ricche di collagene, che suddividono il tumore in aree più piccole. Tuttavia non sono completamente specifiche per carcinoma, poiché si ritrovano anche in adenomi.

2) presenza di attività mitotica importante, riscontrata nell'80% dei cancri delle paratiroidi, ma anche questa non è una caratteristica esclusiva del carcinoma. In genere le cellule si aggregano in masserelle diffuse e trabecolate. Spesso è presente marcato pleomorfismo nucleare e macronucleoli. La presenza di aree di necrosi è molto suggestiva di carcinoma.

3) capsula sottile, quando presente, e spesso infiltrata da sottili lingue di tessuto tumorale che scompaginano il tessuto fibroso della capsula.

4) invasione vascolare

Alcuni studi volti a valutare la presenza di aneuploidia (variazione del numero di cromosomi in eccesso o in difetto) nelle cellule del carcinoma e l'eventuale valore prognostico di questa in termini di sopravvivenza dei pazienti con carcinoma. Alcuni studi hanno riportato aneuploidia nel 100% dei carcinomi metastatici, nel 60% dei carcinomi senza metastasi, ma solo nel 9% degli adenomi. In un lavoro del gruppo di Lumachi del 2004 sono stati valutati 15 casi di carcinoma e 15 di adenoma con la citometria a flusso, per determinare il DNA index (D.I.) delle cellule tumorali. Si è concluso che il D.I. è maggiore nei carcinomi rispetto agli adenomi ($p < 0.001$) e che quindi le cellule aneuploidi ($D.I. > 1$) si trovano più frequentemente nei carcinomi (in 11/15 carcinomi e 3/15 adenomi). Il D.I. può essere in conclusione, un marker utile per confermare la diagnosi di carcinoma delle paratiroidi, anche se non sembra avere valore prognostico in termini di sopravvivenza.

Abbiamo accennato prima al concetto di adenoma atipico, con il quale si intende un tumore delle paratiroidi che mostra caratteristiche di malignità, come invasione della capsula (87%), fibrosi intratumorale (75%) deposizione di emosiderina (58%), formazioni cistiche (50%), mitosi (29%) e fibrosi peritumorale (25%), ma senza alcuna evidenza di invasione dei tessuti circostanti. Non è chiaro se la progressione di questa lesione sia nel senso del carcinoma o se abbia carattere di benignità come un adenoma tipico, ma la speranza è che in questo gruppo si possano evidenziare i casi maligni, in fase ancora precoce.

Nel tentativo di migliorare l'accuratezza diagnostica sono stati studiati altri approcci di tipo istologico³², ma nessuno ha ancora dimostrato un chiaro valore diagnostico, tuttavia, l'alto tasso di anomalie *HRPT2* nei carcinomi delle paratiroidi ha aperto la strada per lo sviluppo di nuovi approcci diagnostici. Lo studio di mutazioni di *HRPT2* e l'indagine immunoistochimica per la

parafibromina sembrano essere strumenti potenziali per una diagnosi differenziale di quei casi che presentano una diagnosi istologica equivoca .

CARATTERISTICHE CLINICHE

Spesso è molto difficile per il clinico individuare i casi di carcinoma paratiroideo, ma invece è di fondamentale importanza pensare sempre ad una possibilità simile, in presenza di una ipercalcemia importante PTH dipendente³³. Troppo spesso infatti la diagnosi viene posta retrospettivamente, quando ci sono già metastasi diffuse, mentre una diagnosi tempestiva riduce la morbilità e la mortalità, grazie alla possibilità di un intervento chirurgico risolutivo. Il quadro clinico è in genere dominato dagli effetti del PTH e dell'ipercalcemia, piuttosto che dall'infiltrazione di organi vitali da parte della massa tumorale. Alcune caratteristiche di presentazione possono suggerire la possibile malignità:

- a) l'età più giovane di insorgenza dell'IPT;
- b) l'assenza di differenza tra sesso maschile e femminile;
- c) una marcata ipercalcemia: valori superiori a 14 mg/dl o comunque superiori di 3-4 mg/dl rispetto al limite superiore della norma;
- d) i livelli di PTH sono da 3 a 10 volte superiori alla norma;
- e) il coinvolgimento renale e osseo: la combinazione di entrambi al momento della presentazione suggerisce la possibilità di carcinoma paratiroideo;
- f) le dimensioni e l'aspetto della lesione paratiroidea: il carcinoma è di solito > 3 cm e può essere palpabile nel collo. Il tessuto è duro e grigio-bianco e aderente alle strutture adiacenti. La paralisi del nervo laringeo ricorrente, in un paziente che non abbia già subito interventi chirurgici sul collo, è suggestiva.

Infine nel carcinoma ci sono spesso delle "crisi ipercalcemiche" con improvvisi e drammatici aumenti di PTH e calcemia.

Le sedi più comuni di metastasi a distanza sono polmone, fegato e osso. Nonostante la diagnosi definitiva non sia possibile generalmente all'intervento

(motivo per cui spessissimo la diagnosi è tardiva), il sospetto clinico di carcinoma è molto importante, per valutare bene i tempi e la prognosi.

DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La comparsa di metastasi è l'unico inequivocabile criterio di malignità, ma di solito esse sono rare come sintomo di presentazione e si verificano durante il decorso della malattia³⁴. Alla presentazione iniziale, nonostante alcune caratteristiche cliniche possano suggerire la presenza di una neoplasia, può essere difficile distinguere tra un IPT causato dal carcinoma paratiroideo e quello derivante dalla sua controparte benigna, molto più comune. Poiché i risultati migliori in termini prognostici si verificano quando si ha una resezione completa del tumore al momento dell'intervento chirurgico iniziale, è importante stabilire la diagnosi corretta sin dall'inizio.

L'immunoistochimica è usata per migliorare l'accuratezza della diagnosi di carcinoma paratiroideo. Un primo approccio ha comportato l'uso di marcatori di proliferazione. L'aumento di alcune proteine associate al ciclo cellulare (Ki-67, ciclina D1) è stato dimostrato nel carcinoma paratiroideo rispetto all'adenoma, tuttavia la scarsa specificità di questi marcatori ha limitato l'utilità di questo approccio. Inoltre alcuni autori hanno descritto una riduzione dell'espressione di p27, un inibitore della chinasi ciclina-dipendente, e anomalie dell'espressione della galectina-3. L'associazione tra queste anomalie e di alta espressione di Ki-67 è stato suggerito aumentare il rischio di malignità.

Ad oggi tuttavia la valutazione delle alterazioni del gene *HRPT2* sembra essere lo strumento diagnostico più promettente. La perdita di eterozigosi (LOH), o la mutazione del gene *HRPT2* con conseguente alterazione del suo prodotto proteico, la parafibromina, può essere visualizzata tramite un'indagine immunoistochimica. Tale indagine risulta infatti negativa nella maggior parte dei

carcinomi riportati in letteratura, tuttavia essa può essere negativa, anche se molto raramente negli adenomi.

Fino ad oggi, sono disponibili dati limitati per quanto riguarda lo studio dei casi dubbi (adenoma atipico), in cui questa tecnica sarebbe di maggiore utilità di diagnostica.

Il valore predittivo positivo del test può essere aumentato, se si effettua l'analisi del gene *HRPT2*/parafibromina nei casi ambigui. Il risultato concomitante di una immunohistochimica negativa per parafibromina insieme all'analisi genetica positiva per mutazioni di *HRPT2* aumenta la probabilità di un tumore maligno. Pertanto, appare opportuno valutare tutte le lesioni paratiroidee, in cui la diagnosi è incerta, sia per la presenza di mutazioni del gene *HRPT2* che del suo prodotto genico.

STORIA NATURALE E PROGNOSI

Il carcinoma paratiroideo ha in genere un decorso indolente, anche se progressivo, perché il tumore ha un potenziale di malignità piuttosto basso. Alla presentazione iniziale, solo pochissimi pazienti mostra un coinvolgimento dei linfonodi regionali (<5%) o metastasi a distanza (<2%). Esso recidiva a livello locale e si propaga alle strutture contigue al collo. Le metastasi si verificano durante il decorso della malattia, con la diffusione ai linfonodi del collo (30%) al polmone (40%), e al fegato (10%). Raramente, le metastasi a distanza si verificano in osso, pleura, pericardio, e pancreas.

La prognosi del carcinoma paratiroideo è molto variabile e nessuna caratteristica singolarmente correla con l'esito. Tuttavia la prognosi dipende in gran parte dal riconoscimento precoce e dalla resezione completa del tumore *ab initio*. Una volta che il tumore si ripresenta, la completa guarigione è improbabile, anche se la sopravvivenza può essere prolungata con la chirurgia palliativa. I tassi di sopravvivenza a cinque anni variano dal 40% al 86%.

TERAPIA

La chirurgia è l'unico trattamento curativo per il carcinoma paratiroideo e consiste in una resezione completa della lesione primitiva al momento della diagnosi³⁵.

Per questo motivo, sia il sospetto preoperatorio che il riconoscimento intraoperatorio (Vedi TAVOLE FOTOGRAFICHE-Figura 3) sono di grande importanza^{36,37}. Pazienti che presentano caratteristiche cliniche suggestive di carcinoma devono essere sottoposti ad una esplorazione approfondita di tutte e quattro le ghiandole paratiroidee, poiché è stato segnalato che il carcinoma può coesistere con adenomi o iperplasia benigna. La tecnica chirurgica più efficace è la resezione *en bloc*. I linfonodi tracheo-esofagei, quelli paratracheali e del mediastino superiore devono essere asportati, tuttavia una vasta dissezione della regione latero-cervicale è indicata solo quando vi è la diffusione della malattia ai linfonodi cervicali anteriori.

Quando la diagnosi di carcinoma paratiroideo è posta dopo l'intervento chirurgico sulla base dei criteri anatomico-patologici, come spesso accade, il piano di gestione diventa più complesso. Se le caratteristiche macroscopiche del tumore sono tipiche del cancro, e la patologia mostra un'ampia invasione vascolare e/o capsulare o comunque un'ipercalcemia persistente, può essere considerata un'ulteriore esplorazione del collo dopo un adeguato studio di localizzazione (vedi sotto). Se viceversa il paziente è normocalcemico è indicato uno studio di follow-up. Nonostante una resezione potenzialmente curativa, il carcinoma paratiroideo ha un tasso di recidiva del 50%. La maggior parte delle recidive si verificano 2-3 anni dopo l'operazione iniziale, ma questo periodo è variabile (è stato segnalato anche un intervallo libero da malattia circa 20 anni). Studi di imaging dovrebbero essere condotti in tutti i pazienti prima di un reintervento, mentre l'agoaspirato con misurazione del PTH su liquido di lavaggio dovrebbe essere usato con massima cautela su una lesione sospetta³⁸, se non del tutto evitato, al fine di scongiurare la disseminazione di cellule maligne lungo il tramite creato dall'ago.

La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una metodica medico-nucleare basata sull'utilizzo di traccianti legati ad isotopi radioattivi che decadono emettendo particelle b+ (positroni). La PET ha trovato sempre maggior impiego in quest'ultimo decennio soprattutto grazie allo sviluppo di nuovi radiofarmaci con caratteristiche tali da poter essere impiegati non solo nel campo della ricerca ma anche nella routine clinica³⁹. Il primo fra tutti è il 18F-fluorodeossiglucosio (18F-FDG), tracciante analogo al glucosio e come tale marcatore del metabolismo glucidico, che entra nelle cellule metabolicamente attive e avidi di glucosio attraverso i trasportatori di membrana del glucosio (GLUT) e, analogamente a quest'ultimo, viene fosforilato dall'esochinasi. Nell'ambito della diagnostica della patologia paratiroidea, la PET non ha un ruolo di primo piano, svolto, invece, dalla medicina nucleare tradizionale. La PET è nata comunque come tecnica tomografica e quindi a differenza della medicina nucleare convenzionale ha migliori capacità di localizzazione. Quest'ultima è ulteriormente incrementata dall'utilizzo di tomografi ibridi PET/TC che hanno diffusione sempre maggiore. Nella nostra esperienza⁴⁰, la PET/TC può essere considerata, nei pazienti affetti da carcinoma delle paratiroidi, uno strumento ad elevata sensibilità diagnostica sia in fase pre- che postoperatoria. Come per gli altri tumori, il ruolo principale delle immagini funzionali ottenute sono l'identificazione di sospette recidive tumorali e la valutazione della malattia residua dopo trattamento primario. La PET/TC in questi casi può essere sicuramente considerata una tecnica complementare alle immagini convenzionali, ma la bassa sensibilità e specificità in certe condizioni, come ad esempio lesioni di piccole dimensioni (<5 mm), rende difficile il suo impiego negli stadi iniziali di malattia.

La gestione dei pazienti con recidive locali o metastasi a distanza è principalmente chirurgica. Anche nel caso di metastasi a distanza accessibili e localizzate, dovrebbe essere sempre presa in considerazione l'opzione chirurgica.

Anche se la resezione delle metastasi singole è raramente curativa, la loro rimozione può provocare dei periodi di normocalcemia che vanno da mesi a anni.

La riduzione della massa tumorale può anche rendere l'ipercalcemia del paziente più responsiva a terapie di tipo medico.

La chemioterapia è generalmente deludente in questi pazienti. Diversi schemi sono stati tentati ma nessuno di loro si è dimostrato efficace.

Anche la radioterapia trova poco spazio nella cura di questo tipo di tumore. Dati recenti hanno suggerito l'uso dell'irradiazione come terapia adiuvante. La Mayo Clinic ha segnalato una sopravvivenza libera da malattia a un follow-up mediano di 60 mesi in quattro pazienti che hanno ricevuto radioterapia adiuvante post-operatoria.

Gestione di ipercalcemia

Quando il carcinoma paratiroideo è in uno stadio avanzato e le opzioni chirurgiche sono esaurite, la gestione clinica diventa quella del controllo dell'ipercalcemia. Potenti bifosfonati per via endovenosa (pamidronato e zoledronato) possono transitoriamente controllare l'ipercalcemia,

L'immunizzazione anti-PTH sembra promettente secondo due recenti case report.

Un altro approccio è quello costituito dai calciomimetici di 2° generazione che sono modulatori allosterici del CASR; essi provocano come effetto finale una riduzione della secrezione del PTH. Di conseguenza, la sensibilità al calcio extracellulare è aumentata. Recentemente, sono stati pubblicati i risultati di uno studio multicentrico sull'utilizzo del cinacalcet in 29 pazienti con carcinoma paratiroideo inoperabile. Il cinacalcet effettivamente riduceva l'ipercalcemia in circa 2/3 dei pazienti. Nel gruppo dei responders (18/29 pazienti), i livelli sierici di calcio si riducevano da $15,0 \pm 0,5$ a $11,2 \pm 0,3$ mg / dl ($p < 0,001$).

E' stato interessante notare che le riduzioni segnate nel siero di calcio non sono state accompagnate da una riduzione simile dei livelli di PTH. I livelli di PTH raggiungevano il nadir dopo 4 ore dalla somministrazione del farmaco, ma la riduzione non era sostanziale. Al momento questa discrepanza rimane da chiarire.

SCOPO DELLO STUDIO

Ancor oggi la diagnosi preoperatoria di tumore maligno paratiroideo è aleatoria: sospetta è considerata una massa che si manifesta con marcata ipercalcemia e con presenza di tumefazione palpabile. Purtroppo però non tutti i carcinomi presentano queste caratteristiche. Non esistono dei sintomi o dei segni specifici di malattia che consentano la diagnosi differenziale con le altre forme tumorali.

Anche l'esame istologico non è sempre dirimente sulla natura della neoplasia: esistono dei tumori, gli adenomi atipici, che condividono alcune caratteristiche con i tumori benigni e altre con quelli maligni.

Un aspetto di notevole importanza ai fini della diagnosi e quindi anche della possibilità di intervenire sul paziente in maniera precoce e risolutiva, è rappresentato dal fatto che si può con certezza definire maligno un tumore delle paratiroidi, solo se questo mostra l'evidenza di invasività locale o a distanza. E' chiaro che questa situazione anatomopatologica correla in modo significativo con una certa gravità del quadro clinico ed è indice di prognosi sfavorevole. Inoltre lascia adito a tutta una serie di dubbi riguardo quelle neoplasie con caratteristiche intermedie, chiamate adenomi atipici, che rappresentano la zona d'ombra nella quale indagare. In effetti è proprio questo il target specifico nella ricerca sul carcinoma delle paratiroidi e anche lo scopo del nostro studio: riuscire ad identificare precocemente e con sicurezza un carcinoma vero, differenziandolo dal comune adenoma. A tal fine lo sviluppo di tecniche e di conoscenze sulla caratterizzazione molecolare della neoplasia sembrano essere strumenti potenziali per una diagnosi differenziale di quei casi che si presentano equivoci.

Molto è stato fatto negli ultimi dieci anni per chiarire le basi molecolari delle neoplasie delle ghiandole paratiroidi, che presentano molte caratteristiche tipiche di ogni altra evoluzione tumorale e pur tuttavia hanno delle inconfondibili peculiarità. Anche nello studio dei processi che determinano lo sviluppo dei tumori delle ghiandole paratiroidi e del carcinoma in particolare, la ricerca si è concentrata nell'individuare anomalie in geni proto-oncogeni e oncosoppressori, in un percorso tortuoso che ha portato alla fine a definire con chiarezza, almeno alcuni dei geni implicati.

L'interesse per il gene *HRPT2* e l'idea che questo potesse essere rilevante nell'induzione della neoplasia maligna è derivata dallo studio genetico dei pazienti con HPT-JT, che abbiamo precedentemente descritto. L'aumentata prevalenza di carcinomi nell'ambito di questa sindrome e la certezza, ormai consolidata da numerosi studi, che mutazioni del gene *HRPT2* fossero alla base della malattia, ha portato all'intuizione che lo stesso gene potesse essere implicato anche nell'induzione del carcinoma sporadico.

Lo scopo della nostra ricerca è valutare l'impatto del test genetico per *HRPT2* nella diagnosi differenziale di tumore maligno versus adenoma, rispetto all'uso dei criteri bioumorali ed istopatologici convenzionali, aspetto a tutt'oggi non completamente chiarito specialmente nella zona d'ombra costituita dagli adenomi atipici.

L'attenzione per le alterazioni genetiche che causano l'insorgenza del cancro, non è ovviamente finalizzato al puro interesse speculativo, ma è importante per poter studiare il paziente con carcinoma e soprattutto i suoi familiari ed impostare un corretto piano diagnostico e terapeutico.

MATERIALI E METODI

Abbiamo considerato tutti i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico presso il nostro reparto dal 1975 a maggio 2012 con diagnosi istologica finale di carcinoma delle paratiroidi o adenoma atipico.

Il nostro studio ha previsto una fase di ricerca di tipo retrospettivo (abbiamo rivisto le cartelle cliniche dei pazienti per ricavare i dati clinici preoperatori ed operatori) e una fase di ricerca di tipo prospettico, riguardante invece la raccolta dei dati di follow-up e l'analisi genetica per mutazione HRPT2.

I dati ricavati sono stati inseriti in un database Excel e sono i seguenti:

- Dati demografici (Cognome e nome, Data di nascita, Sesso),
- Tipo di IPT alla diagnosi (primario, secondario, terziario),
- Presenza di sintomatologia e/o complicanze (renali, ossee, cardiovascolari, ecc.) ed epoca di comparsa delle stesse,
- Eventuale patologia tiroidea associata,
- Indagini preoperatorie di localizzazione (ecografia, scintigrafia, TC, RM, ecc.): per quanto riguarda l'ecografia, tutti i pazienti il giorno dell'intervento sono stati sottoposti ad ecografia del collo in presala operatoria da un operatore del nostro team con specifica formazione in ecografia tiroidea e paratiroidea al fine di confermare la localizzazione ma soprattutto di guidare la ricerca intraoperatoria della lesione.
- Valori preoperatori di Calcemia, PTH, Vitamina D (valori di normalità considerati: Ca: 2,10-2,55 mMol/L; PTH: 12,00-72,00 ng/L; Vitamina D3:

carente <25 nMol/L, insufficiente 25-75 nMol/L, sufficiente 75-250 nMol/L

- Data e tipo di intervento chirurgico, numero di interventi eseguiti per paziente,
- Valori di PTH rapido intraoperatorio: il valore base di PTH è stato determinato prima dell'escissione della ghiandola all'induzione dell'anestesia e dopo dieci minuti dall'asportazione della stessa. Noi consideriamo efficaci gli interventi in cui si ottiene una riduzione del PTH di almeno l'80% del valore base. Nei casi in cui il PTH non si riduce entro i primi dieci minuti, viene eseguito un altro dosaggio a 20 minuti dall'exeresi della ghiandola,
- Referto istologico definitivo,
- Calcemia in prima giornata postoperatoria e alla dimissione,
- Complicanze postoperatorie (disfonia, ipocalcemia, ecc.),
- Valori di Calcemia, PTH, Vitamina D al follow-up,
- Eventuale terapia complementare,
- Risultato dell'analisi genetica di HRPT2.

Per quanto riguarda l'esame istologico, le caratteristiche di malignità prese in considerazione presso il Dipartimento di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Padova cui facciamo riferimento sono:

- la presenza di un indice di proliferazione elevato valutato attraverso l'analisi immunostochimica di ki-67, proteina espressa a livello nucleare in tutte le cellule che stanno proliferando;
- abbondante tessuto fibroso sia peritumorale (capsula fibrosa) che presenza di tralci di tessuto fibroso anche all'interno del tumore;
- scarsa presenza di adipociti, cellule che sono caratteristiche del tessuto paratiroideo sano;
- presenza di aree di necrosi.

Queste proprietà sono comuni tra adenoma atipico e carcinoma: ciò che distingue le due forme neoplastiche è la presenza di invasione vascolare, capsulare, parenchimale, perineurale da parte delle cellule tumorali, e la rottura della capsula fibrosa con disseminazione ai tessuti limitrofi. Inoltre il riscontro di metastasi linfonodali o a distanza è un segno definitivo di malignità del tumore.

Per uniformare i criteri di diagnosi della casistica in esame, abbiamo chiesto ad un esperto Anatomico Patologo con alta formazione in patologia tiroidea e paratiroidea di rivedere i campioni istologici dei pazienti individuati, di cui ha confermato o meno la diagnosi iniziale.

Il follow-up dei pazienti operati di carcinoma e adenoma atipico paratiroideo ha previsto una prima visita ambulatoriale di controllo a 3-4 mesi dall'intervento in possesso di un recente dosaggio di Calcemia, PTH e Vitamina D. Ulteriori dosaggi biochimici di controllo sono stati effettuati quindi ogni 4-6 mesi. I pazienti che manifestavano un nuovo incremento di calcio e PTH sono stati indagati prima con ecografia ed eventualmente con scintigrafia. Nel caso si confermasse la recidiva, poteva essere utile anche l'esecuzione di una TC o una RM al fine di una migliore localizzazione di malattia e valutazione di resecabilità. Nella nostra esperienza molto utile si è rilevata l'esecuzione della PET/TC tuttavia ad almeno 3 mesi di distanza dall'intervento onde evitare interferenze con il tessuto infiammatorio postoperatorio.

Abbiamo ricontattato telefonicamente tutti i pazienti verificando il loro stato di salute, richiedendo un dosaggio di controllo di Ca, PTH, e Vitamina D. Sono stati considerati aggiornati esami effettuati non più di sei mesi prima. I pazienti che avevano esami antecedenti ai sei mesi sono stati sollecitati a ripetere le analisi biochimiche e a trasmettere i risultati.

L'ANALISI GENETICA

Per l'analisi genetica ci siamo avvalsi della collaborazione dell'Endocrinologia dell'Università degli Studi di Pisa a cui afferiamo nell'ambito di uno studio

nazionale multicentrico sui carcinomi delle paratiroidi: abbiamo fornito ai colleghi piccoli frammenti di tessuto patologico prelevati a scopo di ricerca previo consenso informato del paziente.

Alcuni pazienti invece sono stati anche inviati del Centro Tumori Ereditari dell'Istituto Oncologico Veneto: l'analisi presso il Centro viene eseguita da campione di sangue periferico e tampone buccale.

L'analisi genetica viene eseguita previa estrazione del DNA, amplificazione e sequenziamento del gene HRPT2.

Dal sangue (blood and body fluid spin protocol) e dal tampone buccale (buccal swab spin protocol) viene estratto il DNA genomico ad alto peso molecolare mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) secondo le indicazioni del produttore. A fine estrazione viene misurata la concentrazione del DNA tramite lettura spettrofotometrica con spettrofotometro Nanodrop 1000 UV-Visibile.

Dal tessuto paratiroideo, il DNA viene estratto mediante QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) seguendo il protocollo DNA Purification from Tissues.

La regione codificante (17 esoni) del gene HRPT2 e le giunzioni esone-introne del gene vengono amplificate con metodica della reazione polimerasica a catena (PCR).

La PCR è un processo ciclico che raddoppia il numero delle copie di DNA ad ogni ciclo di reazione. La regione di interesse da amplificare viene dunque polimerizzata a partire da due oligonucleotidi specifici (primer) che funzionano da innesco per la polimerizzazione di cui uno è complementare al filamento codificante (forward) e l'altro al filamento non codificante (reverse). La DNA-polimerasi utilizzata è quella del batterio THERMOPHYLUS AQUATICUS, data la stabilità dell'enzima alle temperature elevate alle quali è necessario eseguire la reazione.

La PCR prevede una serie di cicli sequenziali, ognuno dei quali ha tre fasi:

a) denaturazione a 94 °C del DNA a doppio filamento per ottenere il DNA a singolo filamento;

- b) esposizione del campione alla temperatura di “annealing” o appaiamento, specifica per ogni coppia di oligonucleotidi;
- c) raggiungimento della temperatura di allungamento (72 °C), ottimale per l’enzima.

Ad ogni ciclo la miscela si arricchisce dei frammenti di sequenza compresi tra i due oligonucleotidi. La PCR viene effettuata su termociclatore che svolge automaticamente la reazione di amplificazione dei frammenti contenuti nella miscela di reazione.

L’esito della PCR viene saggiato poi tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio nel quale i frammenti migrano a diversa velocità in base alla loro lunghezza. Le bande di DNA così ottenute nel gel vengono messe in evidenza tramite la colorazione con bromuro di etidio che, intercalandosi tra le basi del DNA, forma un legame che emette una fluorescenza maggiore rispetto al colorante libero.

I prodotti della PCR vengono poi purificati per eliminare i residui di tampone, nucleotidi non incorporati ed eccesso di Taq polimerasi, usando un kit commerciale (Concert Rapid Purification System) che sfrutta la proprietà degli acidi nucleici di legarsi a materiali in silice o ad altri tipi di matrici in presenza di sali.

I prodotti di PCR purificati vengono sottoposti a sequenziamento diretto.

Il campione di DNA viene denaturato a 96 °C per 5 minuti, in modo da separare le due eliche del DNA. All’estremità 3’ del singolo filamento di DNA, si va ad appaiare un primer complementare alla sequenza del DNA stampo, mentre l’estremità 3’ del primer rimane libera per consentire il legame dei nucleotidi durante la reazione di polimerizzazione. Il sequenziamento automatico impiega didesossinucleotidi terminatori con fluorocromi diversi per ogni base. Viene utilizzato un apposito kit commerciale contenente l’enzima di polimerizzazione, AmpliTaq DNA polimerasi FS, una variante della polimerasi di THERMOPHILUS AQUATICUS, ed i quattro didesossinucleotidi terminatori legati a fluorocromi diversi per ogni base.

La reazione di polimerizzazione a catena viene eseguita su termociclatore e consta dei seguenti cicli:

- 1) ciclo di denaturazione a 96 °C per 30 secondi;
- 2) ciclo di amplificazione a 96 °C per 10 secondi, ripetuto per 25 volte;
- 3) ciclo di annealing a 50 °C per 15 secondi;
- 4) ciclo di allungamento a 60 °C per 4 minuti;
- 5) ciclo di mantenimento a 4 °C per tempo indefinito.

Una volta ottenuto il campione al termine della reazione di polimerizzazione a catena, questo viene purificato per eliminare i terminatori fluoresceinati in eccesso e i desossinucleotidi non incorporati. Il prodotto di sequenza viene centrifugato per ottenere il sedimento, contenente il DNA, che a sua volta è risospeso in etanolo e ricentrifugato. Una volta asciugato, caricato nel sequenziatore automatico ABI PRISM 310, il precipitato viene sottoposto a corsa elettroforetica lungo un capillare al termine del quale un sensore ottico rivela il passaggio di ogni frammento riuscendo ad identificare la base terminatrice (ddA, ddC, ddG, ddT) grazie alla diversa fluorescenza emessa dai fluorocromi legati a ciascun nucleotide, in seguito all'eccitazione di un raggio laser. I segnali vengono poi convertiti in picchi formanti l'elettroferogramma grazie a un software.

I dati sono stati elaborati statisticamente con l'aiuto di una docente di statistica del Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Padova.

Sui dati numerici sono state calcolate le medie confrontate con impiego del test di Wilcoxon. Sulle variabili qualitative sono invece state calcolate e confrontate le frequenze. Per valutare eventuali correlazione tra i dati è stato applicato il test del chi quadrato e, nei casi in cui questo non era applicabile, il test esatto di Fisher.

Per tali analisi statistiche ci si è avvalsi del programma informatico Graf Pad Prism-5.

RISULTATI

Dal 1975 a maggio 2012, presso il nostro reparto sono stati sottoposti ad intervento chirurgico per iperparatiroidismo 2034 pazienti. Di questi, i pazienti affetti da carcinoma sono risultati 41 con incidenza del 2% degli IPT mentre quelli affetti da adenoma atipico sono risultati 34 con incidenza 1,6% per un totale di 75 pazienti considerati quale casistica della ricerca eseguita.

L'età media alla diagnosi era di 59,03 anni con intervallo di confidenza al 95% tra 56,83-62,80. L'età media per le donne è risultata essere di 60,62 anni, mentre per gli uomini di 57,5 anni: ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa. Il rapporto femmine:maschi è risultato pari a 1,2:1. Solo uno dei pazienti presentava familiarità per patologia paratiroidea. La diagnosi di carcinoma è più frequente nei pazienti di sesso maschile (54%) rispetto a quelli di sesso femminile (46%), dato tuttavia non statisticamente significativo ($p=0,13$).

Erano asintomatici alla diagnosi 15 pazienti (21,4%). Nei pazienti sintomatici (Tabella 2), i principali sintomi riscontrati sono stati nefrolitiasi (37% dei casi) e osteoporosi (18,6 % dei casi). I calcoli renali sembrano essere più frequenti nei carcinomi (incidenza del 43%) ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa.

Inoltre il 17% dei pazienti della nostra serie presentava problemi cardiovascolari al momento della diagnosi: 3 pazienti erano affetti da cardiopatia e 10 da ipertensione arteriosa.

	Adenomi Atipici (n/%)	Carcinomi (n/%)
Nefrolitiasi	9/26,5	17/41,5
Osteoporosi	9/26,5	6/14,6
Patologia cardiovascolare	7/20,6	5/12,2
Crisi ipercalcemica	0	2/4,9
Tumore osseo	0	2/4,9
Asintomatici	6/17,6	14/34,1
TOTALE	34	41

Tabella 2. Incidenza dei sintomi rispettivamente negli adenomi atipici e nei carcinomi.

Un altro sintomo riscontrato nella nostra casistica è la colelitiasi che colpisce circa nel 10% dei pazienti.

In due casi la patologia ha esordito con crisi ipercalcemica, la diagnosi istologica per entrambi questi pazienti è stata di carcinoma. Inoltre al momento della diagnosi 2 pazienti avevano avuto in passato un tumore osseo: in entrambi i casi l'esame istologico della paratiroide ha dato esito di carcinoma. In un paziente la patologia paratiroidea è stata diagnosticata in seguito di pancreatite. Nessuno dei nostri pazienti presentava massa cervicale palpabile.

Sette pazienti su 75 (9,3%) erano affetti da iperparatiroidismo secondario o terziario. Quattro di questi pazienti hanno sviluppato carcinoma e tre adenoma atipico.

Dei pazienti che hanno sviluppato recidiva 9/13 (69%) presentavano alla diagnosi sintomi gravi, mentre in quelli liberi da malattia l'incidenza di sintomi gravi è risultata pari a 28/57 (49%), senza tuttavia significatività statistica ($p=0,19$).

Il 37% della nostra serie di pazienti presentava patologia tiroidea associata, nel 15% si trattava di patologia tumorale. Non è risultata correlazione statistica tra patologia maligna tiroidea e carcinoma delle paratiroidi ($p=0,33$).

Tutti i pazienti presentavano ipercalcemia alla diagnosi, tranne uno, con un valore medio di 3,2 mMol/L con intervallo di confidenza al 95% di 3,1-3,3 mMol/L (media G1: 3,1 mMol/L, G2: 3,2 mMol/L), senza differenza statisticamente significativa. Nelle recidive i valori medi sono risultati pari a 3,4 mMol/L, mentre nei pazienti liberi da malattia era di 3,1 mMol/L risultati statisticamente significativi al test di Wilcoxon ($p=0,043$).

Per quanto riguarda i valori di PTH preoperatorio, il valore medio è risultato pari a 670,0 ng/L con intervallo di confidenza al 95% compreso tra 522,2 e 818,2 ng/L. (G1: 931, 8 ng/L; G2: 477,8 ng/L) con significatività statistica ($p=0,036$).

Anche in questo caso è stato applicato il test di Wilcoxon per confrontare le medie dei due sottogruppi e la p è risultata di 0,036. I pazienti che nel corso degli anni hanno presentato recidive o metastasi avevano mediamente dei valori di PTH preoperatori maggiori rispetto al gruppo di pazienti che non le hanno avute (valore medio di 1030 ng/L) statisticamente significativo.

L'ecografia e la scintigrafia sono state le due metodiche più usate nella localizzazione preoperatoria dei tumori paratiroidei. La scintigrafia nella nostra serie ha dimostrato una sensibilità del 71%, mentre per l'ecografia la sensibilità è risultata pari al 73%. L'unione della due indagini ha consentito di indentificare la lesione con una sensibilità del 90%. In 3 pazienti si è resa necessaria l'esecuzione di una RM e in 7 di una TC: queste due metodiche hanno consentito di localizzare la lesione in tutti i casi in cui sono state impiegate.

La PET è stata eseguita in 5 casi. Nel primo caso la PET è stata utilizzata per confermare la presenza di una massa paratiroidea mediastinica vista alla TC. In questo caso l'indagine ha consentito di individuare anche delle metastasi a livello polmonare. Nel secondo caso l'esame è stato effettuato in un paziente dopo paratiroidectomia per identificare l'eventuale presenza di metastasi: ha dato esito negativo. Nel terzo caso la PET è stata eseguita durante il follow up per indagare l'incremento dei valori di PTH, anche in questo caso è risultata negativa. Nel

quarto caso è stata utilizzata in un paziente in cui era stata documentata la presenza di metastasi polmonari per controllare il decorso della patologia. Nel quinto caso questa indagine è stata usata perché anche dopo paratiroidectomia la scintigrafia risultava positiva in loggia paratiroidea: la PET è risultata negativa e ha smentito persistenza di malattia.

Per quanto riguarda l'intervento chirurgico, a volte nel sospetto di malignità è stato richiesto un esame istologico estemporaneo anche per guidare gli interventi con sacrificio di strutture anatomiche interessate da malattia, anche se non sempre tale esame è risultato dirimente e veramente supportivo, rimanendo il sospetto clinico del chirurgo più orientativo. Sostanzialmente la valutazione intraoperatoria dell'aspetto del tumore e il grado di infiltrazione delle strutture circostanti, supportate da alti valori preoperatori di Calcio e PTH, fanno decidere al chirurgo quanto ampia deve essere la resezione. Quasi tutti i casi di carcinoma hanno subito un intervento di paratiroidectomia allargata con eventuale sacrificio delle strutture infiltrate e linfadenectomia. In nessun caso di adenoma atipico è stata eseguita un'exeresi dei linfonodi o la sezione del nervo ricorrente: mai un adenoma atipico ha presentato caratteristiche macroscopiche di invasività.

In 5 casi (2 carcinomi e 3 adenomi) l'intervento è stato associato a tiroidectomia totale e non alla sola lobectomia: in tre di questi casi la patologia paratiroidea era associata a gozzo, in un caso a carcinoma tiroideo e in un caso non era associata a patologia tiroidea ma si è resa necessaria per motivi tecnici.

La paratiroidectomia semplice nei carcinomi si è rivelata associata ad insorgenza di recidiva nel 50% dei casi. Questo dato ha però scarso significatività a causa dell'esiguo numero di casi.

A partire dal 1996, epoca di introduzione della metodica, per valutare il successo dell'intervento e l'eventuale presenza di tumori multipli è stato dosato il PTH rapido. Nella nostra serie il dosaggio del IO-PTH è stato eseguito in 56 casi.

I pazienti che con IO-PTH < 80% e che hanno presentato recidiva sono risultati 3, quelli che non hanno presentato recidiva sono risultati 6. I pazienti con valori di

IO-PTH > 80% che hanno presentato recidiva sono risultati 2, mentre i restanti 41 casi non hanno presentato recidiva. Al test esatto di Fischer abbiamo constatato una correlazione statistica tra la presenza di recidiva e i valori di IO-PTH ($p=0,031$). I pazienti con diminuzione di PTH intraoperatorio inferiore all'80% hanno un rischio relativo per lo sviluppo di recidiva di 4,7 con intervallo di confidenza tra 1,67 e 13,23.

Il tumore era dovuto a patologia di una ghiandola ectopica in 6 casi (8,5%), in uno solo di questi casi si trattava di adenoma atipico. In due casi il tumore era a localizzazione mediastinica, in due casi la localizzazione era retrogiugulare e negli altri due casi intratimica.

Abbiamo notato che l'adenoma atipico della paratiroide e il carcinoma colpiscono più frequentemente le paratiroidi inferiori: nella nostra serie abbiamo infatti una frequenza del 71% di localizzazione inferiore e solo del 20,5% di localizzazione superiore.

La dimensione media della lesione è risultata pari a 2,8 cm con intervallo di confidenza al 95% compreso tra 2,5 e 3,2cm. La dimensione media per gli adenomi atipici era di 2,6 cm e per i carcinomi 3 cm, differenza non statisticamente significativa anche se si nota la tendenza dei carcinomi ad avere dimensioni maggiori.

La complicità disfonia è risultata più frequente nei pazienti che hanno sviluppato recidiva (pazienti con recidiva 40%, pazienti liberi da malattia 11%), probabilmente correlata ad interventi più aggressivi con scheletrizzazione spinta del nervo laringeo, se non addirittura sacrificio dello stesso, per esigenze di radicalità oncologica.

Per quanto riguarda il referto istologico, la revisione dei vetrini da parte di un anatomico patologo esperto in patologia tiroidea e paratiroidea ha confermato le diagnosi in tutti i casi tranne uno in cui la diagnosi di carcinoma è stata rettificata in adenoma atipico per assenza di infiltrazione vascolare, capsulare, perineurale o

dei tessuti limitrofi. Del resto il paziente operato aveva avuto un decorso clinico del tutto benigno che già poneva in dubbio la diagnosi iniziale di carcinoma.

Nei carcinomi, l'invasione capsulare è stata riscontrata nel 41, 2%, l'invasione vascolare nel 64,7 %, l'invasione dei tessuti limitrofi nel 38% dei casi.

L'infiltrazione dei tessuti limitrofi era presente in 7 su 13 pazienti con ripresa di malattia e solo in 5 su 28 che non hanno avuto fino ad oggi recidiva, con differenza di incidenza statisticamente significativa ($p < 0,03$).

Cinque pazienti affetti da carcinoma sono stati sottoposti a radioterapia palliativa, nessuno di essi risulta vivente. Solo un paziente è stato chemioterato per presenza di metastasi polmonari ed è deceduto 4 anni più tardi.

Il follow-up medio è risultato da un minimo di durata di 2 mesi ad un massimo di 17 anni. Dal follow-up, sono usciti 4 pazienti affetti da carcinoma che non siamo riusciti a rintracciare in alcun modo.

Dodici pazienti risultano deceduti per malattia carcinomatosa pari ad una mortalità complessiva del 31%: 10 per progressione della patologia tumorale, 1 per arresto cardiaco, 1 per crisi ipercalcemica intercorsa durante l'intervento chirurgico.

A 5 anni la percentuale di sopravvivenza è risultata pari al 88,13%, a 10 anni del 79,74%, a 15 anni del 29,24%. Sicuramente il miglioramento delle tecniche diagnostiche e chirurgiche nel corso degli anni ha influito sulla sopravvivenza. Infatti scintigrafia e IO-PTH non erano impiegati nei primi anni di questo studio.

I pazienti che sono andati incontro a recidiva o metastasi sono risultati 13, tutti con diagnosi postoperatoria di carcinoma: di questi 10 sono deceduti (mortalità nei pazienti con recidiva 77%). La percentuale di recidiva per i carcinomi è del 31%. Dieci pazienti hanno sviluppato recidiva locoregionale durante il periodo di follow-up, 2 pazienti presentavano metastasi già al momento dell'intervento (uno

a distanza e uno a livello locoregionale) e 1 paziente ha sviluppato metastasi polmonari nei due anni successivi all'intervento. Nei pazienti con recidiva, il tempo medio di sviluppo è stato di 6,8 anni (minimo 2 anni- massimo 14

Il valore medio postoperatorio di PTH nei pazienti sottoposti a follow-up è risultato pari a 63,66 ng/L con intervallo di confidenza al 95% tra 47,83 e 79,50 ng/L. (G1: 71,64 ng/L, G2: 56,77 ng/L, dati statisticamente non significativi- $p=0,27$).

Il valore medio postoperatorio di calcemia riscontrato al follow-up è risultato di 2,39 mMol/L con intervallo di confidenza al 95% tra 2,33-2,44 mMol/L senza differenza tra G1 e G2.

In 6 (11,5%) pazienti sottoposti a follow-up sono stati riscontrati valori di Ca leggermente al di sopra del range di normalità, in 1 caso era elevato anche il valore di PTH (129 ng/L). Si trattava di un paziente con adenoma atipico operato nel 2003 e rioperato nel 2009 per l'insorgenza di un altro adenoma. In un paziente è stato rilevato un livello di calcemia al di sotto dei limiti con un livello di PTH aumentato (232 ng/L).

In alcuni pazienti è stata dosata anche la vitamina D: il valore medio di questa è risultata pari a 46,36 nMol/L con intervallo di confidenza al 95% tra 36,17 e 56,56 nMol/L. Nell'12% dei pazienti la vitamina D è risultata carente, nel 76% dei casi è risultata insufficiente e in un altro 12% dei casi è risultata sufficiente.

ANALISI GENETICA

I risultati dell'analisi genetica su tessuto patologico ci sono stati forniti dal laboratorio di genetica dell'Endocrinologia dell'Università degli Studi di Pisa. È stata identificata 1 doppia mutazione somatica in un tessuto di metastasi polmonare (Figura 1). La prima mutazione è a carico dell'esone 1 ed è costituita da una delezione nucleotidica di una guanina che comporta uno slittamento di tutta la cornice di lettura (**c.60delG**). Questa mutazione determina un codone di stop prematuro al codone 25 dell'esone 1. Inoltre sempre nello stesso tessuto

verosimilmente sull'altro allele abbiamo identificato una delezione di una timina a carico dell'esone 3 (**c.248delT**). Anche questa costituisce una delezione nucleotidica al nucleotide 248 che determina un'interruzione prematura (codone di stop al codone 108 dell'esone 4). Il paziente in cui è stata riscontrata questa mutazione era affetto da una forma tumorale aggressiva: ha infatti sviluppato metastasi polmonari a due anni dal primo intervento di paratiroidectomia ed è deceduto a causa della patologia tumorale. Inoltre a due anni dall'intervento questo paziente ha sviluppato anche un tumore bruno dell'osso.

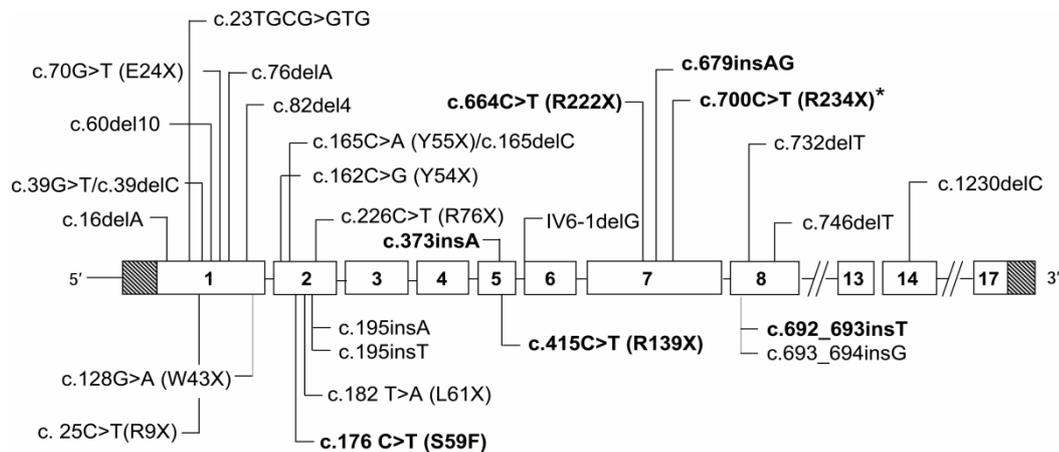


Figura 1. Principali siti di mutazione riscontrati nel gene *HRPT2*, le mutazioni segnate in grassetto sono quelle associate a mutazioni germinali.

In 10 campioni l'analisi genetica è risultata negativa per la presenza di mutazioni e in 15 campioni l'analisi genetica non è stata ulteriormente valutabile. Di questi campioni abbiamo studiato circa il 50 % della regione codificante del gene, e non è stato possibile condurre uno studio completo per la qualità non idonea del materiale paraffinato. I risultati parziali non hanno dimostrato alcuna mutazione a carico degli esoni studiati.

Lo studio condotto sugli adenomi atipici è risultato negativo per la presenza di mutazioni in tutti i campioni.

Dei pazienti affetti da carcinoma delle paratiroidi a cui è stato proposto di sottoporsi all'analisi di mutazione germinale presso il Centro Tumori Ereditari dell'Istituto Oncologico Veneto, hanno aderito allo studio undici pazienti. Solo in due dei pazienti indagati è stata riscontrata una mutazione: in uno di questi non è stata rilevata una variante di sequenza patogenetica negli esoni 1-17, ma nell'introne 8 è stata riconosciuta in eterozigosi una variante di sequenza c828+29 in cui un adenina è stata sostituita con una timina. Questa mutazione non è mai stata descritta prima in letteratura. È importante notare che questo paziente aveva una forma tumorale aggressiva: presentava già metastasi linfonodali e polmonari al momento della diagnosi ed è andato incontro a morte dopo soli due anni dall'intervento chirurgico. Questo paziente era anche stato sottoposto a radioterapia. Nel secondo paziente negli esoni 1-14, 16 e 17 del gene HRPT2 non sono state evidenziate varianti di sequenza riconosciute come patogenetiche. Nell'esone 15 è stata riscontrata in eterozigosi la variante di sequenza c.1338dupT p.Val507Cys fs*17. La presenza di tale mutazione è stata confermata in un secondo campione di DNA estratto da tampone buccale. La variante di sequenza rilevata determina la formazione di una proteina tronca ed è da considerarsi patogenetica.

DISCUSSIONE

Il carcinoma delle paratiroidi è tumore estremamente raro. La sua incidenza è comunemente considerata nell'ambito dell'iperparatiroidismo primitivo, ed è riportata pari all'1-4% dei casi. La ricerca che abbiamo condotto si avvale di una rilevante personale esperienza (più di 2000 casi di IPT trattati in 35 anni) in chirurgia tiroidea e paratiroidea: è chiaro che solo lunghe e consistenti esperienze permettono di avere un numero di casi su cui sia possibile trarre delle conclusioni statistiche⁴¹. Infatti dall'analisi della letteratura le casistiche più numerose, dell'ordine di un centinaio di pazienti, sono frutto di studi multicentrici^{42,43}. Tuttavia, l'evoluzione tecnica/tecnologica oltre che scientifica in medicina e chirurgia è talmente rapida che trarre conclusioni dall'analisi di pazienti di diverse epoche è a volte scorretto: pazienti degli anni 80 che avessero potuto godere delle tecniche e conoscenze oggi a disposizione forse avrebbero potuto ricevere un trattamento più adeguato della loro malattia. Questa problematica rende ancor oggi impossibile la stesura di protocolli gestionali come ad es. è stato fatto per il cancro del colon-retto o della mammella.

In generale i risultati della nostra ricerca confermano che le lesioni carcinomatose correlano con valori più elevati di Calcemia e PTH preoperatori.

Il sospetto di malignità nasce quando i valori di PTH sono più di 5 volte sopra la norma: nella nostra serie gli adenomi atipici presentavano valori di PTH di circa 6,62 volte sopra il limite e i carcinomi di circa 13 volte. Valori di calcio preoperatori molto alti sono risultati essere un fattore di rischio per lo sviluppo di recidiva.

Inoltre l'incidenza di IPT "complicato" è più frequente nelle forme maligne che in quelle benigne: numerosi sono i pazienti con carcinoma o adenoma atipico che presentano osteoporosi e/o nefrolitiasi a volte con manifestazione più grave.

Del tutto recentemente, abbiamo valutato l'utilità della PET con 18F-FDG nella patologia paratiroidea maligna, il cui ruolo in letteratura non è ancora ben definito. Nella nostra esperienza, è utile soprattutto nell'identificare la presenza di recidive, nel valutare la radicalità dell'intervento stesso e nella ricerca di eventuali metastasi: infatti il cancro della paratiroide è avido di 18F-FDG, le lesioni si vedono come ipercaptanti. Solitamente la PET è eseguita in combinazione con la TC: ciò permette una localizzazione anche spaziale di profondità della lesione con maggior precisione rispetto alla scintigrafia. Nel periodo postoperatorio, non va eseguita troppo precocemente per il rischio di falsi positivi; comunque rimane, secondo noi, uno strumento di imaging accurato sia in fase di stadiazione preoperatoria che postoperatoria.

Purtroppo ancor oggi non è dato di arrivare all'intervento chirurgico con una diagnosi di malignità della paratiroide. Si giunge con un *sospetto* di carcinoma basato sulla gravità di malattia: per questo motivo la pianificazione dell'entità della resezione non può essere pensata a priori ma viene valutata durante l'intervento stesso in base al reperto intraoperatorio⁴⁴. I tumori maligni molto spesso si presentano come masse che invadono e infiltrano i tessuti circostanti. Inoltre, l'aspetto macroscopico del carcinoma è solitamente quello di una massa grande e dura, circondata esternamente da abbondante tessuto fibroso, mentre l'adenoma benigno si manifesta come una massa morbida, rotonda o ovale. L'adenoma atipico dal punto di vista morfologico è simile al carcinoma, ad eccezione del fatto che non presenta infiltrazione dei tessuti circostanti. Del resto l'unico trattamento realmente curativo è la chirurgia che deve quindi essere la più radicale possibile.

La rimozione "en bloc", evitando la rottura della capsula tumorale e quindi la disseminazione cellulare, rappresenta la procedura di scelta su cui si punta per migliorare la prognosi.

Uno strumento utile per sapere se la resezione è stata fatta in modo completo è il dosaggio del IO-PTH. Viene ampiamente discusso in letteratura il cut-off da considerare per una corretta valutazione del successo dell'intervento: è da noi considerata ottimale una riduzione dei livelli di PTH di almeno l'80% dopo paratiroidectomia. Infatti, dalla nostra esperienza, una riduzione del IO-PTH inferiore all'80% comporta una frequenza di recidiva e/o persistenza di malattia più alta. Questo è probabilmente dovuto alla non completa escissione del tessuto maligno, che può avere infiltrato se non già essere metastatizzato. La mancata discesa del IO-PTH in caso di diagnosi di carcinoma risulta indice altamente predittivo di aggressività tumorale.

Del resto nella nostra serie di pazienti, abbiamo confermato che la presenza di infiltrazione dei tessuti circostanti da parte del tumore originario costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di recidiva. Le recidive locali sono un'evenienza abbastanza frequente nei carcinomi delle paratiroidi (32% dei casi della nostra serie) e sono responsabili della maggior parte dei reinterventi. In alcuni studi ritroviamo che la ripresa di malattia può arrivare a colpire anche più del 50% dei pazienti. Le metastasi a distanza sono invece un evento raro che si associa solitamente ad una progressione più aggressiva della patologia e a rapida morte del paziente.

Dall'analisi dell'intervallo libero da malattia nella nostra casistica si individuano sostanzialmente due gruppi di pazienti: il primo con un intervallo medio libero da malattia pari a 2 anni- indice di malattia più aggressiva- il secondo pari ad un valore medio di 14 anni- indice di una forma di malattia con andamento più subdolo. Del resto pure dall'analisi della letteratura emerge questa dualità di identità clinica: vengono riportati casi di recidiva da un minimo di 2-4 anni fino anche a 20 anni dopo l'intervento chirurgico. Analogamente i dati di mortalità: della nostra casistica confermano la stessa teoria: sono stati registrati decessi per patologia paratiroidea dopo poco meno di 2 anni dall'intervento e dall'altra parte anche dopo più di 15 anni. Questo a sostegno della teoria secondo cui il carcinoma paratiroideo presenterebbe due identità cliniche, una a lenta crescita e

meno aggressiva e un'altra a crescita più rapida e invasiva. Del resto va considerato che la sopravvivenza media a 15 anni dall'intervento chirurgico risulta pari ad un terzo dei pazienti a dimostrazione del fatto che la guarigione non appartiene alla storia naturale di questa neoplasia.

La diagnosi istologica di carcinoma è difficile e non può prescindere da adeguate informazioni cliniche che derivano da una stretta collaborazione tra chirurgo e anatomo-patologo. I criteri istologici per definire un carcinoma paratiroideo sono difficili da stabilire e molto sottile è la differenza tra l'aspetto di un adenoma atipico e quello di un carcinoma (Vedi TAVOLE FOTOGRAFICHE-Figura 4). Del resto è stato riportato come solo una parte dei casi originariamente classificati come carcinomi si comportassero realmente come tali. Le diagnosi della nostra casistica sono state riviste da un unico anatomo-patologo esperto in patologia tiroidea e paratiroidea che ha seguito dei criteri diagnostici uniformi e quindi la casistica si può considerare omogenea.

Nel tentativo di migliorare la precisione della diagnosi sono stati studiati alcuni approcci di tipo immunoistochimico⁴⁵: la perdita di parafibromina, l'espressione del Rb, la superespressione della galectina-3 e un indice proliferativo alto (Ki-67) possono distinguere il carcinoma paratiroideo dalle altre forme tumorali. Purtroppo nessuna di queste tecniche presenta sia un'alta sensibilità che un'alta specificità: solo associate al decorso clinico della patologia e ai reperti intraoperatori possono aiutare ad identificare le forme maligne⁴⁶. L'assenza di parafibromina è stata fino ad oggi identificata solo nei tumori maligni e in nessun adenoma atipico: la parafibromina è codificata dal gene HRPT2. Purtroppo la mutazione di questo gene non è presente in tutti i carcinomi⁴⁷. L'alterazione di HRPT2 è valutabile sia attraverso tecniche di immunoistochimica, sia andando a ricercare la mutazione del gene nel DNA delle cellule del tessuto tumorale.

Negli ultimi anni, l'identificazione dei geni responsabili delle sindromi familiari dell'iperparatiroidismo primitivo ha allargato le conoscenze riguardo la tumorigenesi delle ghiandole paratiroidee, che tuttavia rimane largamente incompresa. In molti modelli di tumorigenesi, la distribuzione delle alterazioni

geniche in corrispondenza dei cromosomi più frequentemente coinvolti suggerisce l'idea di una progressione delle mutazioni nel processo di sviluppo del carcinoma. Non è confermato se il carcinoma sporadico delle paratiroidi si sviluppi dagli adenomi o meno⁴⁸. Il pattern delle alterazioni geniche evidenziate nei carcinomi è nettamente diverso dal pattern riscontrato negli adenomi⁴⁹. La maggior incidenza di adenomi e la rarità dei carcinomi sembrerebbe di per se stessa smentire un processo di progressione nella maggior parte dei casi.

I risultati della nostra ricerca sembrerebbero suggerire l'analisi genetica quale strumento diagnostico promettente: il risultato concomitante di una immunoistochimica negativa per parafibromina insieme all'analisi genetica positiva per mutazioni di HRPT2 aumenta la probabilità di tumore maligno^{50,51}. Tale valutazione appare opportuna in tutte le lesioni paratiroidi in cui la diagnosi è incerta⁵².

Sappiamo che la parafibromina agisce come oncosoppressore, impedisce infatti la proliferazione cellulare interagendo con la ciclina D e bloccando il ciclo cellulare: è chiaro dedurre come la perdita di questa proteina sia associata a tumorigenesi.

I pazienti in cui si conosce la presenza della mutazione devono essere controllati con più frequenza perché più a rischio di progressione di malattia⁵³. Oggigiorno l'analisi genetica viene eseguita postoperatoriamente in quanto la diagnosi di carcinoma o adenoma atipico è come abbiamo detto solo istologica. Tuttavia potremmo ipotizzare l'utilità dell'analisi genetica in ambito terapeutico nelle forme di iperparatiroidismo familiare: un paziente affetto da IPT grave con un caso indice (parente con carcinoma paratiroideo e HRPT2 mutato) nell'albero genealogico deve essere sottoposto ad intervento chirurgico con esplorazione bilaterale del collo. Nel caso in cui sia necessaria una paratiroidectomia completa a causa di un'iperplasia di tutte le ghiandole, deve essere evitato l'autotrapianto: infatti con questa procedura si rischierebbe di trapiantare delle cellule potenzialmente metastatiche. In questi pazienti non è comunque raccomandata la paratiroidectomia profilattica.

Tuttavia, a fronte dei notevoli progressi nell'ambito della biologia molecolare anche del carcinoma delle paratiroidi, la nostra esperienza dimostra che lo stretto follow-up clinico rimane a tutt'oggi l'unico strumento indispensabile per una cura adeguata della malattia: l'analisi genetica può orientare, confermare ma non ancora guidare il trattamento.

CONCLUSIONI

In sintesi:

1. La diagnosi preoperatoria di carcinoma è ancor oggi difficile: indici di sospetto possono essere elevati livelli di calcemia e di paratormone in un quadro di iperparatiroidismo “grave” associato a complicanze. La diagnosi definitiva è addirittura molto spesso suggerita dall’andamento clinico della malattia che impone una revisione istologica.
2. Il trattamento più efficace è ancor oggi quello chirurgico: tanto migliore è la prognosi quanto più radicale è stato il primo intervento eseguito. I chirurghi esperti in tale chirurgia sanno che il dubbio di lesione carcinomatosa va sempre posto all’anatomopatologo di fronte a lesioni con caratteristiche intraoperatorie “suggestive”.
3. La diagnosi istologica rimane molto complicata: sono fondamentali le informazioni cliniche fornite dal chirurgo e quindi una stretta collaborazione tra clinico e anatomopatologo. Al giorno d’oggi, un contributo sembra essere fornito nelle forme dubbie dall’immunoistochimica e dall’analisi genetica: una immunoistochimica negativa per parafibromina insieme all’analisi genetica positiva per mutazioni di HRPT2 aumenta la probabilità di tumore maligno.
4. Del resto l’identificazione della mutazione di HRPT2 sia attraverso l’immunoistochimica che l’analisi genetica può aiutare a confermare la diagnosi di carcinoma ma non può purtroppo escluderla. Solo la stretta osservazione clinica può permettere ancor oggi di valutare l’andamento della

forma tumorale del paziente e di conseguenza offrire gli opportuni trattamenti del caso.

Nei carcinomi sporadici delle paratiroidi, la genetica HRPT2 dovrebbe essere considerata parte delle analisi da valutare assieme ai parametri convenzionali in quanto correla con una forma di malattia più aggressiva. L'utilità dello screening genetico HRPT2 dovrebbe presupporre un follow-up più intenso e uno screening familiare. Lo studio genetico è sicuramente utile nell'indirizzare ad un approccio chirurgico più aggressivo che a tutt'oggi rimane il solo trattamento più efficace. La nostra ricerca apporta un consistente contributo numerico alla ancor esigua casistica esistente in letteratura sul carcinoma e sull'adenoma atipico delle paratiroidi, alla luce delle nuove indagini strumentali e di caratterizzazione molecolare.

TAVOLE FOTOGRAFICHE

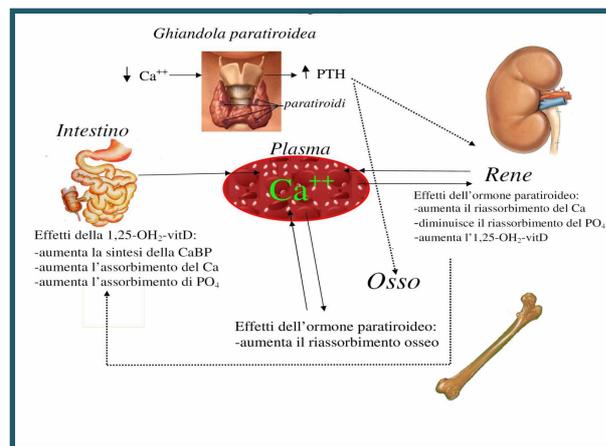


FIGURA 1: Le ghiandole paratiroidi regolano i livelli di calcemia agendo sul riassorbimento intestinale, osseo e renale.

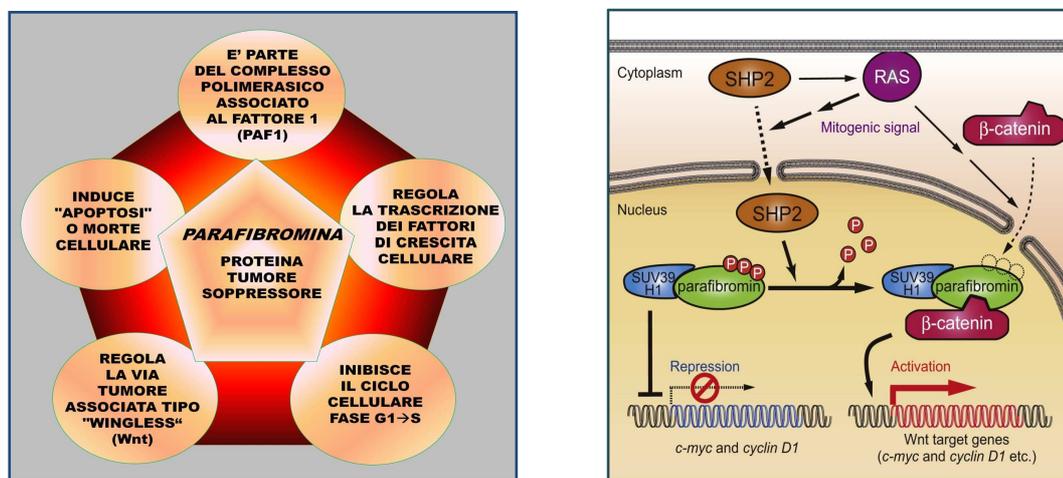


FIGURA 2: Schema riassuntivo delle funzioni della Parafibromina. La parafibromina è una proteina oncosoppressore che regola l'apoptosi, il ciclo cellulare, l'espressione genica dei fattori di crescita (Es. Insulin-like growth factors I e II), la Tumour-associated wingless type (Wnt) patway, il complesso polimerasico associato al fattore 1 (Paf1). La perdita di espressione della parafibromina attraverso mutazioni inattivanti il gene HRPT2 in teoria potrebbe avere effetti in una o diverse di queste vie molecolari, le quali a loro volta propagano il processo di tumorigenesi delle paratiroidi⁴⁷.

A.



B.

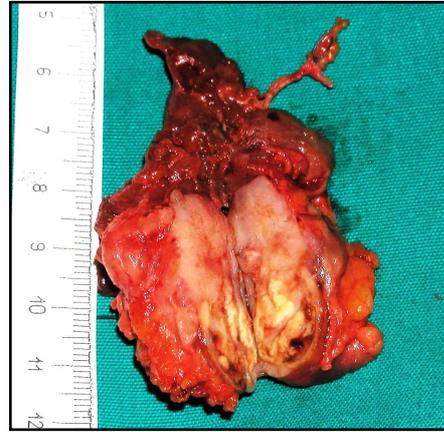


FIGURA 3: A. Aspetto macroscopico intraoperatorio di massa paratiroidea carcinomatosa di consistenza dura, infiltrante i tessuti limitrofi. B. Sezione ex vivo della massa: evidente il caratteristico aspetto lardaceo.

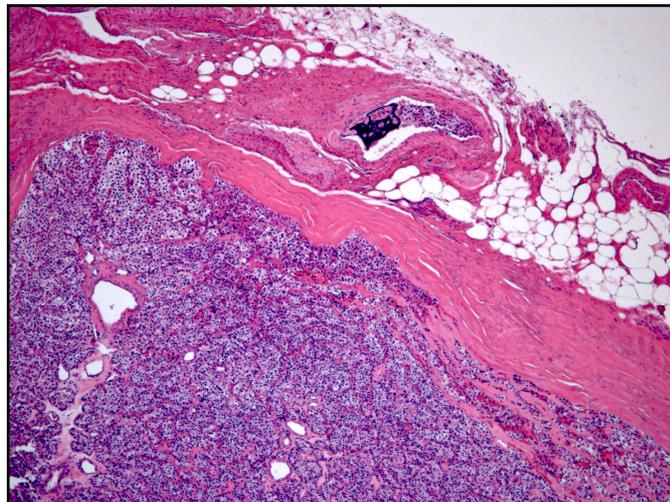


FIGURA 4: Particolare microscopico di lesione paratiroidea carcinomatosa: aspetto cellulare solido compatto della massa, nella sezione superiore è evidente gettone tissutale solido intravascolare. (Per Gentile concessione del Dottor GianMaria Pennelli, Istituto di Anatomia Patologica-Università degli Studi di Padova).

BIBLIOGRAFIA

¹ Sharretts JM, Simonds WF. **Clinical and molecular genetics of parathyroid neoplasms.** Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010; 24 (3): 491-502.

² Cetani F, Ambrogini E, Viacava P, Pardi E, Fanelli G, Naccarato AG, Borsari S, Lemmi M, Berti P, Miccoli P, Pinchera A, Marcocci C. **Should parafibromin staining replace HRPT2 gene analysis as an additional tool for histologic diagnosis of parathyroid carcinoma?** European Journal of Endocrinology 2007; 156: 547-554.

³ Pelizzo MR, Piotto A, Bergamasco A, Rubello D, Casara D. **Il carcinoma della paratiroidi. Strategie terapeutiche derivate da 20 anni di esperienza.** Minerva Endocrinol 2001; 26: 23-9.

⁴ Lodovico Rosato et al. **Paratiroidi** in *Trattato Italiano di Endocrinochirurgia*. Volume secondo. Club delle UEC. Novembre 2008.

⁵ Piotto A, Sorgato N. **Collo-Paratiroidi** in *Chirurgia Generale ad uso degli studenti del corso di laurea in odontoiatria e protesi dentaria*. Eds Petrin P, Pelizzo MR. Publ PICCIN 2007, pp 161-165.

⁶ Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. **Endocrinology and metabolism.** In *Principles of Internal Medicine*. 15th Edition, Publ McGraw Hill, Medical Publishing Division, 2001, pp 2019-2245.

⁷ Osto E, Fallo F, Pelizzo MR, Maddalozzo A, Sorgato N, Corbetti F, Montisci R, Famoso G, Bellu R, Luscher TF, Iliceto S, Tona F. **Coronary microvascular dysfunction induced by primary hyperparathyroidism is restored after parathyroidectomy.** *Circulation* 2012; 126 (9): 1031-9.

⁸ Schulte KM, Gill AJ, Barczynski M, Karakas E, Miyauchi A, Knoefel WT, Lomabrdi CP, Talat N, Diaz-Cano S, Grant CS. **Classification of Parathyroid Cancer.** *Ann Surg Oncol* 2012; 19 (8): 2620-8.

⁹ Rodgers SE, Terrier ND. **Parathyroid carcinoma.** *Curr Opin Oncol* 2006; 18: 16-22.

¹⁰ Marcocci C, Cetani F, Rubin MR, Silverberg SJ, Pinchera A, Bilezikian JP. **Parathyroid carcinoma.** Review. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (12): 1869-80.

¹¹ Brown S, O'Neill C, Suliburk J, Sidhu S, Sywak M, Gill A, Robison B, Delbridge L. **Parathyroid carcinoma: increasing incidence and changing presentation.** *ANZ J Surg* 2011; 81: 528-532.

¹² Okamoto T, Iihara M, Obara T, Tsukada T. **Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis and treatment.** *World J Surg* 2009; 33: 2343-54.

¹³ Kytölä S, Farnebo F, Obara T, Isola J, Grimelius L, Farnebo LO, Sandelin K, Larsson C. **Patterns of chromosomal imbalances in parathyroid carcinomas.** *Am J Pathol* 2000; 157 (2): 579-86.

¹⁴ Rubin MR, Silverberg SJ. Editorial: **HRPT2 in Parathyroid Cancer: a piece of the puzzle.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (9): 5505-7.

¹⁵ Weinstein LS, Simonds WF. **HRPT2, a Marker of Parathyroid Cancer.** N Engl J Med 2003; 349 (18): 1691-2.

¹⁶ Lin L, Czapiga M, Nini L. **Nuclear Localization of the Parafibromin Tumor Suppressor Protein Implicated in the Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome Enhances its Proapoptotic Function.** Mol Cancer Res 2007; 5: 183-93.

¹⁷ Yang YJ, Han JW, Youn HD, Cho EJ. **The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3K9 methylation for cyclin D1 repression.** Nucleic acids research 2010; 38 (2): 382-90.

¹⁸ Woodard GE, Lin L, Zhang JH, Agarwall SK, Marx SJ, Simonds WF. **Parafibromin, product of the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene HRPT2, regulates cyclin D1/PRAD1 expression.** Oncogene 2005; 24: 1272-6.

¹⁹ Rozenblatt-Rosen O, Hughes CM, Nannepaga SJ, Shanmugam KS, Copeland TD, Guszczynski T, Resau JH, Meyerson M. **The Parafibromin Tumor Suppressor Protein is part of a Human Paf1 Complex.** Molecular and Cellular Biology, 2005; 25 (2): 612-20.

²⁰ Takahashi A, Tsutsumi R, Kikuchi, Obuse C, Saito Y, Seidi A, Karisch R, Fernandez M, Cho T, Ohnishi N, Rozenblatt-Rosen, Meyerson M, Neel BG, Hatakeyama M. **SHP2 Tyrosine Phosphatase converts Parafibromin/Cdc73 from a Tumor Suppressor to an Oncogenic Driver.** Molecular Cell 2011; 43: 45-56.

-
- ²¹ Park S, Oh S, Ek-Ramos J, Van Nocker S. **Plant Homologous to Parafibromin is a component of the PAF1 Complex and assists in regulating expression of genes within H3K27ME3-Enriched Chromatin.** *Plant Physiology* 2010; 153: 821-31.
- ²² Mosimann C, Hausmann G, Basler K. **Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg Target Gene Transcription by direct association with β -catenin/Armadillo.** *Cell* 2006; 125: 327-41.
- ²³ Lin L, Zhang JH, Panicker LM, Simonds WF. **The Parafibromin tumor suppressor protein inhibits cell proliferation by repression of the c-myc proto-oncogene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (45): 17420-25.
- ²⁴ Agarwal SK, Simonds WF, Marx SJ. **The parafibromin tumor suppressor protein interacts with actin-binding proteins actinin-2 and actinin-3.** *Mol Cancer* 2008; 7: 65.
- ²⁵ Shattuck T, Välimäki S, Obara T, Gaz RD, Clark OH, Shoback D, Wierman ME, Tojo K, Robbins CM, Carpten JD, Arnold A. **Somatic and Germ-Line Mutations of the HRPT2 Gene in Sporadic Parathyroid Carcinoma.** *N Engl J Med* 2003; 349: 1722-9.
- ²⁶ Cetani F, Pardi E, Borsari S, Viacava P, Dipollina G, Cianferotti L, Ambrogini E, Gazzero E, Colussi G, Berti P, Miccoli P, Pinchera A, Marcocci C. **Genetic Analyses of the HRPT2 Gene in Primary Hyperparathyroidism: Germline and Somatic Mutations in Familial and Sporadic Parathyroid Tumors.** *J Clin Endocrin Metab* 2004; 89 (11): 5583-91.

-
- ²⁷ Xia P, Wang W, Xu XY, Wang JP, Takano Y, Zheng HC. **Parafibromin expression in lung normal tissue and carcinoma: its comparison with clinicopathological parameters of carcinoma.** *Histol Histopathol* 2011; 26: 1039-47.
- ²⁸ Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guab YF, Takano Y. **Downregulated parafibromin expression is a promising marker for pathogenesis, invasion, metastasis and prognosis of gastric carcinomas.** *Virchows Arch* 2008; 452: 147-55.
- ²⁹ Zheng HC, Wei ZL, Xu XY, Nie XC, Yang X, Takahashi H, Takano Y. **Parafibromin expression is an independent prognostic factor for colorectal carcinomas.** *Human Pathology* 2011; 42: 1089-1102.
- ³⁰ Juhlin CC, Haglund F, Obara T, Arnold A, Larsson C, Höög A. **Absence of nucleolar parafibromin immunoreactivity in subsets of parathyroid malignant tumours.** *Virchows Arch* 2011; 459: 47-53.
- ³¹ DeLellis RA. **Challenging lesions in the differential diagnosis of endocrine tumors: parathyroid carcinoma.** *Endocr Pathol* 2008; 19: 221-25.
- ³² Bondeson L, Sandelin K, Grimeluis L. **Histopathological variables and DNA cytometry in parathyroid carcinomas.** *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 820-29.
- ³³ Talat N, Schulte KM. **Clinical Presentation, Staging and Long-Term Evolution of Parathyroid Cancer.** *Ann Surg Oncol* 2012; 17: 2156-74.

-
- ³⁴ Fernandez-Ranvier GG, Khanafshar E, Jensen K, Zamegar R, Lee J, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. **Parathyroid Carcinoma, Atypical Parathyroid Adenoma, or Parathyromatosis?** Cancer 2007; 110 (2): 255-64.
- ³⁵ Wei CH, Harari A. **Parathyroid Carcinoma: Update and Guidelines for Management.** Current Treatment Options in Oncology 2012; 13: 11-23.
- ³⁶ Pelizzo MR, Pagetta C, Piotto A, Sorgato N, Merante Boschini I, Toniato A, Grassetto G, Rubello D. **Surgical treatment of primary hyperparathyroidism: from bilateral neck exploration to minimally invasive surgery.** Minerva Endocrinol 2008; 32 (2): 85-93.
- ³⁷ Sorgato N, Pennelli G, Boschini IM, Ide EC, Pagetta C, Piotto A, Toniato A, De Salvo GL, Hindié E, Al-Nahhas A, Rubello D, Pelizzo MR. **Can we avoid inadvertent parathyroidectomy during thyroid surgery?** In vivo 2009; 23 (3): 433-9.
- ³⁸ Pelizzo MR, Losi A, Boschini IM, Toniato A, Pennelli G, Sorgato N, Faggiani D, Plebani M. **Rapid intraoperative parathyroid hormone assay in fine needle aspiration for differential diagnosis in thyroid and parathyroid surgery.** Clin Chem Lab Med 2010; 48 (9): 1313-7.
- ³⁹ Neumann DR, Esselstyn CB, Kim EY. **Recurrent postoperative parathyroid carcinoma: FDG_PET and Sestamibi-SPECT findings.** J Nucl Med 1996; 37: 2000-1.
- ⁴⁰ Evangelista L, Sorgato N, Torresan F, Boschini IM, Pennelli G, Saladini G, Piotto A, Rubello D, Pelizzo MR. **FDG-PET/CT and parathyroid carcinoma:**

Review of literature and illustrative case series. World J Clin Oncol 2011; 2 (10): 348-54.

⁴¹ Busaidy NF, Jimenez C, Habra MA, Schultz PN, El-Naggar AK, Clayman GL, Asper JA, Diaz EM, Evans DB, Gagel RF, Garden A, Hoff AO, Lee JE, Morrison WH, Rosenthal DI, Sherman SI, Sturgis EM, Waguespack SG, Weber RS, Wirfel K, Vassilopoulou-Sellin R. **Parathyroid carcinoma: a 22-year experience.** Head and Neck 2004: 716-26.

⁴² Rosato L, Avenia N, Bernante P, De Palma M, Gulino G, Nasi PG, Pelizzo MR, Pezzullo L. **Complications of Thyroid Surgery: analysis of a multicentric study on 14,934 patients operated on in Italy over 5 years.** World J Surg 2004; 28: 271-6.

⁴³ Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, Mårtensson H, Reihner E, Wallin G, Lausen I. **Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients.** Langenbecks Arch Surg 2008; 393: 667-73.

⁴⁴ Ippolito G, Palazzo FF, Sebag F, De Micco C, Henry JF. **Intraoperative diagnosis and treatment of parathyroid cancer and atypical parathyroid adenoma.** Br J Surg 2007; 94: 566-70.

⁴⁵ Fernandez-Ranvier G, Khanafshar E, Tacha D, Wong M, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. **Defining a molecular phenotype for benign and malignant parathyroid tumors.** Cancer 2009; : 334-44.

⁴⁶ Kelly TG, Shattuck TM, Reyes-Mugica M, Stewart A, Simonds W, Udelsman R, Arnold A, Carpenter TO. **Surveillance for Early Detection of Aggressive**

Parathyroid Disease: Carcinoma and Atypical Adenoma in Familial Isolated Hyperparathyroidism Associated With a Germline HRPT2 Mutation. J. Bone Miner Res. 2006; 21 (10): 1666-71.

⁴⁷ Juhlin CC, Höög A. **Parafibromin as a Diagnostic Instrument for Parathyroid Carcinoma-Lone Ranger or Part of the Posse?** Int J Endocrinol 2010; 2010: 324964.

⁴⁸ Juhlin CC, Nilsson IL, Johansson K, Haglund F, Villablanca A, Höög A, Larsson C. **Parafibromin and APC as Screening Markers for Malignant Potential in Atypical Parathyroid Adenomas.** Endocr Pathol 2010; 21: 166-177.

⁴⁹ Juhlin C, Larsson C, Yakoleva T, Leibiger I, Leibiger B, Alimov A, Weber G, Höög A, Villablanca A. **Loss of parafibromin expression in a subset of parathyroid adenomas.** Endocrine-Related Cancer 2006; 13: 509-523.

⁵⁰ Cavaco BM, Santos R, Felix A, Carvalho D, Lopes JM, Domingues R, Sirgado M, Rei N, Fonseca F, Santos JR, Sobrinho L, Leite V. **Identification of De Novo Germline Mutations in the HRPT2 Gene in two apparently sporadic cases with challenging Parathyroid Tumor Diagnoses.** Endocr Pathol 2011; 22: 44-52.

⁵¹ Howell VM, Gill A, Clarkson A, Nelson AE, Dunne R, Delbridge LW, Robinson BG, The BT, Gimm O, Marsh DJ. **Accuracy of Combined Protein Gene Product 9.5 and Parafibromin Markers for Immunohistochemical Diagnosis of Parathyroid Carcinoma.** J Clin Endocrinol Metab 2009; 94 (2): 434-41.

⁵² Donadio E, Giusti L, Cetani F, Da Valle Y, Ciregia F, Giannaccini G, Pardi E, Saponaro F, Torregrossa L, Basolo F, Marcocci C, Lucacchini A. **Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues in the proteomic analysis of parathyroid glands.** Proteome Sci. 2011; 9 (1): 29.

⁵³ Lim S, Elston MS, Gill AJ, Marsh DJ, Conaglen JV. **Metastatic parathyroid carcinoma initially misdiagnosed as parathyroid adenoma: the role of parafibromin in increasing diagnostic accuracy.** Intern Med J 2011; 41 (9): 695-9.