



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Tesi di Laurea

**"L'analisi metabolomica nello screening delle neoplasie  
indeterminate della tiroide"**

Relatore

Chiar.mo Prof. Paolo Miccoli

Candidato

Paolo Checcacci

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

## Indice

1. Introduzione.....	3
2. Il Carcinoma Tiroideo.....	8
2.1 Epidemiologia .....	8
2.2 Fattori di rischio.....	10
2.3 Classificazione istologica.....	14
2.4 Staging e prognosi .....	21
2.5 Diagnostica preoperatoria.....	26
2.6 Trattamento.....	34
2.7 Complicanze.....	38
3. Biomarkers del carcinoma tiroideo.....	41
3.1 Immunoistochimica.....	41
3.2 Genomica.....	43
3.3 Proteomica.....	46
4. L'analisi metabolomica.....	47
5. Materiali e metodi.....	52
6. Risultati .....	56
7. Discussione .....	67
Bibliografia.....	70

## **1. Introduzione**

Una delle principali manifestazioni del carcinoma della tiroide è la presenza di un nodulo tiroideo clinicamente valutabile nel collo del paziente, un reperto clinico estremamente frequente nella popolazione.

I noduli palpabili della tiroide sono infatti presenti nel 4% - 7% degli individui, mentre noduli sub-clinici (non palpabili) sono presenti quasi nel 50%, di questi solo una piccola percentuale, circa il 5 %, sono maligni e necessitano di una terapia chirurgica.

L'esclusione di una patologia maligna in un paziente con un nodulo tiroideo rimane quindi una sfida dell'attività medica, poiché richiede l'identificazione del carcinoma tiroideo fra numerose condizioni benigne maggiormente rappresentate.

Fra i possibili esami diagnostici, insieme all'ecografia e alla scintigrafia, l'agoaspirato gioca un ruolo essenziale nella diagnosi di un nodulo tiroideo. Riduce la percentuale di operazioni chirurgiche inutili ed indirizza i pazienti con carcinoma verso la chirurgia (2). Un'importante limitazione dell'agoaspirato è però la mancanza di sensibilità nella valutazione delle neoplasie a pattern follicolare, a causa dell'incapacità di differenziare lesioni benigne (adenomi follicolari) da quelle maligne (carcinoma follicolare o variante follicolare del carcinoma papillare), portando alla diagnosi di "indeterminato" dal 10 al 30% dei casi (3).

Le linee guida per il trattamento di questi pazienti indicano come necessaria l'asportazione chirurgica, poiché solo l'esame istologico definitivo è capace di una discriminazione sicura fra le forme benigne e maligne di lesioni a pattern follicolare. La percentuale di lesioni maligne nel gruppo "indeterminato" varia però dal 14% al 20%, indicando che la maggior parte di questi pazienti è sottoposta ad una operazione chirurgica, e a tutti i rischi ad essa correlati, non necessaria (3).

Per superare le limitazioni dell'esame citologico sono state sviluppate tecniche di immunoistochimica, genomica e proteomica che, tuttavia, non hanno determinato una completa risoluzione del problema (4-5).

Più recentemente l'analisi metabolomica è stata proposta come una nuova metodologia in grado di completare ed aumentare le informazioni date dalla genomica e dalla proteomica, andando ad analizzare tutti i cambiamenti metabolici di un organismo vivente in risposta a fattori patologici o ambientali.

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (RMN) è uno dei principali strumenti per studi riguardanti metaboliti di basso peso molecolare, in particolare per l'analisi di biopsie (6-7).

Scopo di questo studio è l'utilizzo della spettroscopia di RMN, con un metodo specifico per i tessuti solidi (high resolution magic angle spinning, HR-MAS), per individuare profili metabolici connessi a lesioni maligne della tiroide (8). Il primo passo di questo studio è stato quello di identificare le differenze metaboliche fra tessuto tiroideo sano e tessuto neoplastico (benigno e maligno). In un secondo tempo abbiamo testato l'efficienza dell'analisi metabolomica nel discriminare le lesioni benigne da quelle maligne e in particolare per la diagnosi delle neoplasie spttern follicolare, categorizzate come indeterminate.

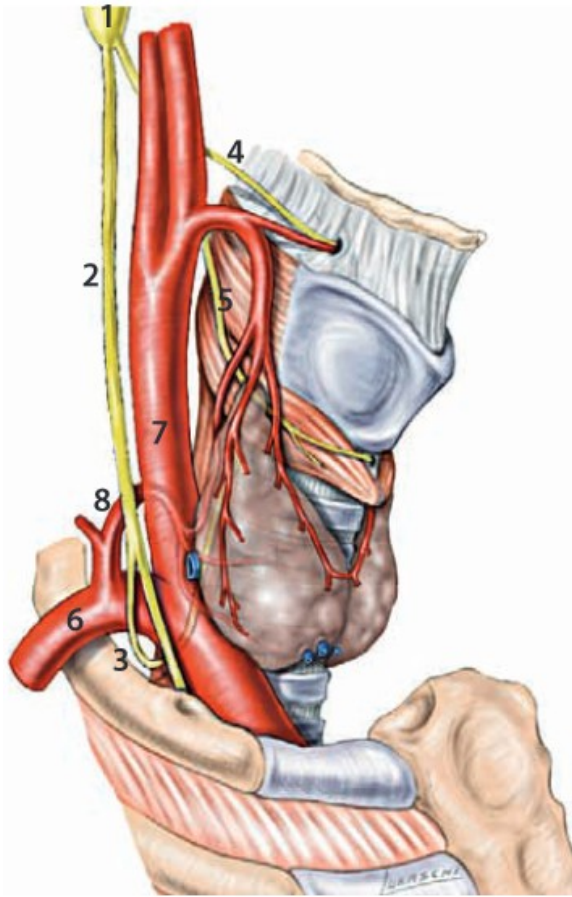
Siccome lo scopo di questo progetto è di rendere questo metodo adatto ad un uso clinico, abbiamo infine focalizzato la nostra attenzione sulla analisi metabolomica tramite HR-MAS NMR degli agoaspirati. Se questo tipo di analisi preoperatoria si rivelasse valida l'impatto clinico sarebbe notevole, permettendo una diagnosi più corretta e riducendo il numero di pazienti sottoposti ad una operazione chirurgica non necessaria.

## **Cenni di anatomia e fisiologia della ghiandola tiroide**

La tiroide è una ghiandola endocrina impari mediana, a forma di farfalla, situata nella regione anteriore del collo, fra la cartilagine tiroide e il manubrio dello sterno, a livello della quinta, sesta e settima vertebra. È un organo formato da due lobi uniti da un istmo e circondato da una sottile capsula fibrosa che avvolge la trachea e la parte inferiore del laringe. Il peso di una ghiandola tiroide è di circa 20 - 25 grammi. Frequentemente è presente un ulteriore lobo, detto lobo piramidale, che rappresenta una porzione accessoria della ghiandola tiroidea. È situato in continuazione dell'istmo o di uno dei due lobi laterali e si estende in alto al davanti della laringe giungendo fino all'osso ioide. I lobi tiroidei presentano una forma conica con le superfici anteriori e laterali convesse.

Ognuno dei due lobi è ricoperto anteriormente dai muscoli sottoioidei (sternoioideo, sternotiroideo e omoioideo) e dalla fascia cervicale media, tesa tra i due muscoli omoioidei. Più superficialmente si trova la fascia cervicale superficiale, compresa tra il margine anteriore dei due muscoli sternocleidomastoidei e, infine, il sottocutaneo con il muscolo platisma e la cute della regione antero-laterale del collo. Lateralmente i due lobi sono in gran parte ricoperti dai muscoli sternocleidomastoidei. Postero-lateralmente la tiroide contrae rapporto con il fascio vascolonervoso del collo. Lungo il lato posteriore dei lobi tiroidei si trovano le ghiandole paratiroidi. La faccia mediale del lobo tiroideo è in rapporto con la cartilagine tiroide e cricoide, la trachea, l'esofago, l'arteria tiroidea superiore e inferiore ed il nervo laringeo ricorrente (NLR).

Il polo superiore dei lobi laterali giunge fino a livello della parte media della cartilagine tiroide della laringe, in corrispondenza del margine posteriore. Il polo inferiore, più arrotondato, scende a livello del 5°-6° anello tracheale dove è raggiunto dall'arteria tiroidea inferiore.



**Figura 1**

1. Ganglio nodoso del vago
2. Nervo vago
3. Nervo laringeo inferiore o ricorrente
4. Ramo superiore nervo laringeo superiore
5. Ramo inferiore nervo laringeo superiore
6. Arteria succlavia
7. Arteria carotide comune
8. Arteria tiroidea inferiore

La tiroide è vascolarizzata dalle arterie tiroidee superiori e dalle arterie tiroidee inferiori. La tiroidea superiore si stacca dalla arteria carotide esterna, mentre l'arteria tiroidea superiore è un ramo del tronco tireocervicale, che origina a sua volta dall'arco aortico. Talvolta può essere presente una ulteriore arteria, detta arteria ima, che si stacca direttamente dalla arteria succlavia.

La tiroide è drenata da tre vene differenti, la vena tiroidea superiore e la vena tiroidea media drenano entrambe nella vena giugulare interna, la vena tiroidea inferiore drena nella vena brachiocefalica di sinistra.

Dal punto di vista microscopico il follicolo è l'unità funzionale della tiroide. È una struttura di forma sferica, delimitata da un singolo strato di cellule follicolari attorno ad una raccolta extracellulare di colloide. Una ghiandola tiroide normale contiene da 500000 a 1,5 milioni di follicoli. La colloide contiene la tireoglobulina, una glicoproteina iodinata che serve da precursore per i due ormoni prodotti dalla tiroide, la triiodotironina (T3) e la tiroxina (T4).

Questi ormoni sono essenziali per una crescita ed uno sviluppo normale, in particolare del sistema nervoso centrale e svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo.

Un'altra componente del follicolo sono le cellule C, o parafollicolari, che producono l'ormone calcitonina. Generalmente si trovano disperse fra le cellule follicolari. La calcitonina è un ormone coinvolto nel metabolismo del calcio, andando ad inibire il riassorbimento osseo.

La tiroide può andare incontro a numerose patologie, la maggior parte delle quali suscettibili di trattamento medico o chirurgico. Una delle manifestazioni più frequenti di patologia tiroidea è il nodulo tiroideo, singolo o multiplo. Nella maggior parte dei casi la patologia sottostante al nodulo è di natura benigna, tuttavia nel 5% dei casi di noduli palpabili si tratta di carcinoma tiroideo (9).

## **2. Il Carcinoma Tiroideo**

### ***2.1 Epidemiologia***

A livello mondiale l'incidenza del carcinoma tiroideo è di circa 4/100000 abitanti e varia a seconda delle diverse aree geografiche, risultando più alta nei paesi economicamente avanzati. Il più alto valore di incidenza si registra nella Corea del Sud con 35,44 casi per 100000 abitanti ogni anno (10). L'Italia presenta un'incidenza fra le più elevate con 9,15 casi per 100000 abitanti, i valori sono tuttavia molto differenti a seconda del sesso, infatti negli uomini vi è una incidenza di 3,97 casi per 100000, mentre per le donne l'incidenza è di 14.15 casi (11).

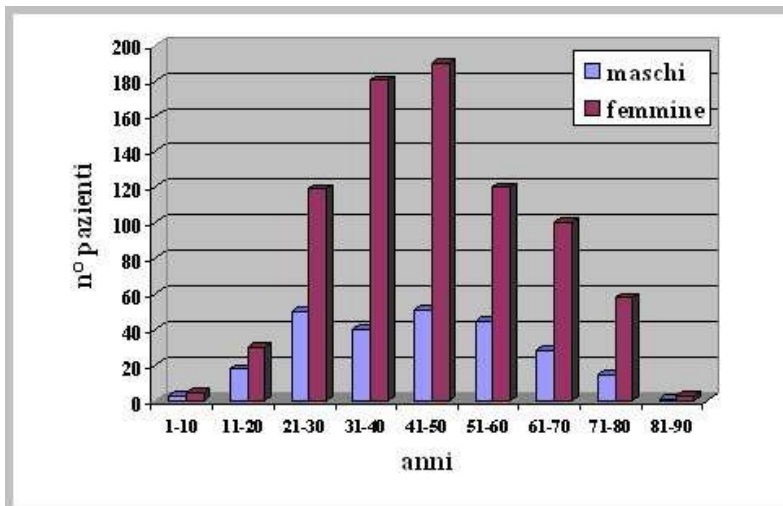
Il carcinoma della tiroide è raro nei bambini, l'incidenza comincia ad aumentare dalla seconda decade di età e raggiunge il picco nella tarda età evolutiva nelle donne, mentre negli uomini durante la sesta decade di vita (12). Il carcinoma papillare rende conto del 60 – 80% di tutti i casi di carcinoma tiroideo, il carcinoma follicolare del 15 – 20% e il carcinoma midollare del 5 – 10%. Il carcinoma anaplastico, che rappresenta meno del 2% di tutti i tumori tiroidei, si presenta più frequentemente nelle età più avanzate (13).

Nel periodo fra il 1975 e il 2008 l'incidenza del carcinoma della tiroide è costantemente aumentata in tutti i gruppi di età. Questo aumento di incidenza è attribuita quasi interamente al carcinoma papillare, infatti l'incidenza del carcinoma follicolare, midollare ed indifferenziato non è cambiata significativamente. Il crescente numero di casi di carcinoma tiroideo è attribuibile all'individuazione di carcinomi < 2cm e quindi probabilmente al costante miglioramento delle tecniche diagnostiche, come ad esempio l'esame ecografico (14).



Sebbene l'incidenza del carcinoma tiroideo sia costantemente aumentata nel corso degli ultimi tre decenni, la mortalità rimane pressoché identica, con una sopravvivenza a 5 anni del 97,2% (15).

**Figura 2.** Distribuzione per decadi e sesso del carcinoma tiroideo differenziato nella casistica del Dipartimento di Endocrinologia di Pisa (2047 pazienti)



## ***2.2 Fattori di rischio***

Come per la maggior parte delle neoplasie solide, anche per i tumori della tiroide l'eziologia sembra essere multifattoriale, risultato di una complessa interazione di fattori genetici ed ambientali nei soggetti a rischio.

Gli studi epidemiologici effettuati hanno evidenziato come principali fattori di rischio:

- precedente esposizione a radiazioni ionizzanti (incidenti nucleari, irradiazione esterna della regione del collo, soprattutto in età infantile);
- familiarità per carcinoma tiroideo;
- preesistente patologia tiroidea benigna;
- fattori ormonali e gravidanze;
- apporto alimentare di iodio;

### **Precedente esposizione a radiazioni ionizzanti**

Diversi studi condotti dopo il disastro di Chernobyl hanno dimostrato un aumento d'incidenza di neoplasie tiroidee nei soggetti che al momento dell'esplosione nucleare avevano un'età compresa tra 5 mesi e 10 anni (16-17). L'età media alla diagnosi del carcinoma tiroideo era di 14 anni con nessuna sostanziale differenza in termini di incidenza tra maschi e femmine. Riguardo alle caratteristiche del tumore, gli istotipi più frequenti erano le varianti solida e follicolare del carcinoma tiroideo papillare. Al momento della diagnosi, la malattia si trovava in uno stadio già avanzato presentandosi con metastasi linfonodali e polmonari con una frequenza maggiore rispetto alla media ed un comportamento biologico più aggressivo; inoltre, era più usuale il riscontro della neoplasia in associazione con tiroidite autoimmune. In soggetti sottoposti a radioterapia

in età pediatrica per neoplasie oncologiche ed ematologiche, come il linfoma o le leucemie, è nota l'aumentata incidenza di patologia tiroidea, in particolare del carcinoma della tiroide, rispetto a soggetti di pari età non sottoposti a tali interventi terapeutici (18-19).

### **Storia familiare e patologie associate**

In circa il 3-5% dei pazienti affetti da carcinoma tiroideo è possibile riscontrare un'anamnesi familiare positiva per neoplasie della tiroide nei congiunti di primo grado. Il carcinoma tiroideo familiare non midollare (CTFNM) riguarda casi di carcinoma tiroideo, quasi sempre di istotipo papillare, che si manifestano in componenti dello stesso nucleo familiare. La trasmissione sembra essere di tipo autosomico dominante a penetranza incompleta. In questi soggetti l'aggressività del tumore è maggiore rispetto a quella osservata nella popolazione generale (elevata frequenza di multifocalità ed un più elevato tasso di recidiva) (20).

I fattori genetici sono certamente responsabili della familiarità in alcune sindromi familiari associate ad un'elevata prevalenza di patologia nodulare tiroidea e carcinoma tiroideo (Tab. 1).

Nella poliposi familiare del colon, il rischio di sviluppare il carcinoma papillare della tiroide, in particolare la variante cribriforme (21), è circa 100 volte più elevato rispetto al rischio osservato nella popolazione generale (22). I soggetti di sesso femminile e di età inferiore a 35 anni sono più frequentemente colpiti ed il carcinoma presenta particolari caratteristiche istologiche: frequente multicentricità, associazione di aspetti papillari classici con aspetti solidi e a cellule fusate. Nella malattia di Cowden, malattia autosomica dominante con amartomi multipli, il rischio di carcinoma papillare o follicolare della tiroide risulta più elevato rispetto al rischio osservato nella popolazione generale.

**Tabella 1:** Patologia nodulare tiroidea benigna e maligna nelle sindromi familiari

SINDROMI GENETICHE	LOCUS	NODULI TIROIDEI	
		Maligni	Benigni
Poliposi adenomatosa del colon	5q21	n.d.	0,3 - 1%
Sindrome di Cowden	10q22-23	60,00%	7,00%
Neoplasia endocrina multipla tipo 1	11q13	25,00%	n.d.
Ataxia – Teleangeectasia	11q22-23	Riportati solo occasionalmente	
Sindrome di Peutz – Jeghers	19p	Riportati solo occasionalmente	

### **Storia precedente di patologia tiroidea benigna**

È stata dimostrata una maggior frequenza di carcinoma tiroideo nei soggetti affetti da nodulo tiroideo benigno e, anche se in misura minore, da gozzo.

Diversi studi hanno rilevato un'incidenza di noduli maligni più elevata (dallo 0,4% al 9,8%) in alcune serie di soggetti affetti da Morbo di Basedow (23,24), con un rischio maggiore per quei soggetti che presentavano noduli palpabili o rilevati attraverso esami strumentali ultrasonografici o scintigrafici, rispetto a quelli con gozzo diffuso non nodulare. Inoltre, i tumori insorti nei pazienti con Morbo di Basedow sembrano avere un'evoluzione clinica più aggressiva (25).

Non rappresentano fattori di rischio aggiuntivo l'ipertiroidismo (adenoma tossico e gozzo multinodulare tossico) o la tiroidite di Hashimoto (26-27) in cui il rischio è invece quello di sviluppare una malattia linfoproliferativa ed in particolare, un linfoma della tiroide.

### **Fattori ormonali e gravidanze**

Diverso è il rapporto di incidenza tra femmine e maschi a seconda del periodo di vita in cui insorge il tumore: nelle donne in età fertile, tale rapporto è circa 2-4:1 e si riduce a 1.5:1 in età pre-pubere e in menopausa.

In gravidanza, è frequente la diagnosi di gozzo o noduli tiroidei e può verificarsi un aumento di volume della tiroide e dei noduli. Per tale motivo, è stato ipotizzato il ruolo dei fattori ormonali o dei fattori legati alla gravidanza nella patogenesi del carcinoma tiroideo (28). Non è chiaro il motivo della predominanza di tale patologia nel sesso femminile, anche se sono state descritte molte associazioni: un rischio lievemente superiore sembra essere nelle donne affette da cisti ovariche, con menopausa tardiva, pluripare e con età avanzata al primo parto, con aborti spontanei o deficit di progesterone, mentre sembra quasi giocare un ruolo protettivo un menarca precoce seguito da cicli di ritorno regolari (29).

### **Apporto alimentare di iodio**

Nelle zone a carenza iodica si osserva una maggiore incidenza di noduli tiroidei e quindi di carcinomi tiroidei in termini assoluti. Tuttavia, se si corregge per il maggior numero di noduli, la percentuale di carcinomi nell'ambito dei noduli tiroidei è simile a quella che si riscontra nelle aree a normale apporto alimentare di iodio. Gli istotipi sono diversamente rappresentati proprio in base all'apporto di iodio alimentare: se l'apporto è sufficiente, più del 80% dei tumori è rappresentato dal carcinoma papillare, mentre nelle aree a carenza iodica sono più frequenti gli istotipi follicolare ed anaplastico (frequenza circa 2-3 volte superiore rispetto a quella osservata nelle aree con adeguato apporto iodico) (30).

### ***2.3 Classificazione istologica***

Il carcinoma della tiroide è la neoplasia maligna più frequente del sistema endocrino e gli aspetti istopatologici risultano determinanti per stabilire la prognosi della malattia.

Secondo la classificazione istologica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) le neoplasie della tiroide possono essere prima di tutto divise in primarie e secondarie (metastasi) (31).

Le neoplasie primarie possono essere quindi suddivise sulla base del tipo cellulare coinvolto, dividendole in

- neoplasie ad istogenesi follicolare: comprendono il 95% delle neoplasie
- neoplasie ad istogenesi dalle cellule C o parafollicolari
- tumori ad istogenesi mista

La stragrande maggioranza dei tumori primari della tiroide origina dalle cellule epiteliali, in particolare dalle cellule follicolari della tiroide. Questo gruppo include i più comuni tipi di neoplasia. Anche il carcinoma scarsamente differenziato e il carcinoma anaplastico originano dalle cellule follicolari, probabilmente da una sdifferenziazione del carcinoma papillare e follicolare ben differenziato (32).

La tradizionale separazione del carcinoma tiroideo in:

- papillare
- follicolare
- midollare
- anaplastico

basata sulla morfologia e sulle caratteristiche cliniche è fortemente supportata da studi di biologia molecolare che mostrano l'interessamento di diversi geni a seconda dei gruppi, con una scarsa sovrapposizione (33).

**Tabella 2:** classificazione istologica dei tumori della tiroide

I. PRIMARY	II. SECONDARY (METASTATIC)
<p><b>I. EPITHELIAL</b></p> <p><b>A. Follicular Cell Origin</b></p> <p>A.1 Benign</p> <p>(i) follicular adenoma</p> <p>    a. conventional type</p> <p>    b. oncocytic type</p> <p>A.2 Uncertain Malignant Potential</p> <p>(i) hyalinizing trabecular tumor</p> <p>A.3 Malignant</p> <p>(i) papillary carcinoma</p> <p>(ii) follicular carcinoma</p> <p>    a. conventional type</p> <p>    b. oncocytic type</p> <p>(iii) poorly differentiated carcinoma</p> <p>(iv) anaplastic (undifferentiated) carcinoma</p> <p><b>B. C-Cell Origin</b></p> <p>(i) medullary carcinoma</p> <p><b>C. Mixed Follicular Cell and C-Cell Origin</b></p> <p>(i) mixed medullary and follicular carcinoma</p> <p>(ii) mixed medullary and papillary</p> <p><b>D. Epithelial Tumors of Different or Uncertain Cell Origin</b></p> <p>(i) mucoepidermoid carcinoma</p> <p>(ii) sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia</p> <p>(iii) squamous cell carcinoma</p> <p>(iv) mucinous carcinoma</p> <p>(v) spindle cell tumor with thymus-like differentiation (settler)</p> <p>(vi) carcinoma showing thymus-like differentiation (castler)</p> <p>(vii) ectopic thymoma</p>	<p><b>2. NON-EPITHELIAL</b></p> <p>(i) primary lymphoma</p> <p>(ii) angiosarcoma</p> <p>(iii) teratoma</p> <p>(iv) smooth muscle tumors</p> <p>(v) peripheral nerve sheath tumors</p> <p>(vi) paraganglioma</p> <p>(vii) solitary fibrous tumor</p> <p>(viii) follicular dendritic cell tumors</p> <p>(ix) langerhans cell histiocytosis</p> <p>(x) rosai-dorfman disease</p>

Il **carcinoma follicolare** tiroideo è una neoplasia maligna della tiroide che non presenta le caratteristiche nucleari diagnostiche per il carcinoma papillare. È il secondo tipo di carcinoma più frequente dopo il carcinoma papillare, circa il 15% di tutti i carcinomi tiroidei sono carcinomi follicolari. Sono tumori rari nei bambini e la loro incidenza aumenta con l'età, raggiungendo il picco durante la quinta decade di vita.

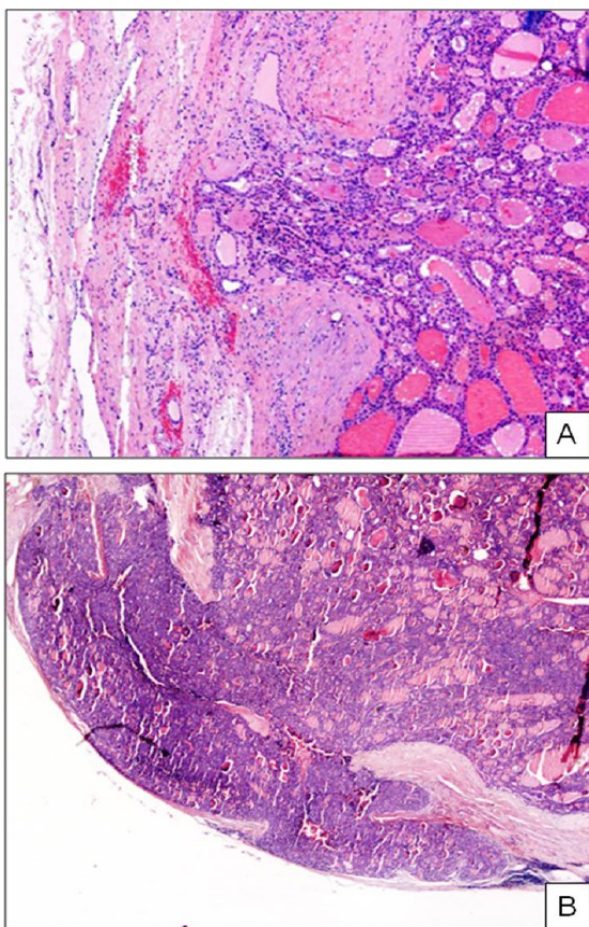
All'esame macroscopico si presenta come un nodulo incapsulato di forma ovale o rotonda. La dimensione media è di circa 2 – 4 cm, sebbene possano essere anche più grandi, presentano una colorazione giallo – grigiastrea e sono circondati da una capsula fibrosa di spessore variabile. I patterns architetturali dei carcinomi follicolari sono simili a quelli dell'adenoma follicolare, con una architettura microfollicolare presente in circa l'80% dei casi ed una normofollicolare e macrofollicolare in circa il 20% (34). Anche le caratteristiche citologiche sono simili a quelle degli adenomi follicolari, le cellule sono cuboidali, il citoplasma è abbondante con nuclei rotondi di medie dimensioni. La modalità di crescita, lo spessore della capsula o le caratteristiche citologiche non distinguono fra l'adenoma e il carcinoma follicolare.

L'unico criterio per la diagnosi di carcinoma follicolare è infatti l'invasione della capsula e/o l'invasione vascolare. L'invasione capsulare si ha quando il tumore penetra attraverso l'intero spessore della capsula (figura 3), nei casi più avanzati può anche estendersi nel parenchima tiroideo stesso.

L'invasione vascolare è definita invece come l'invasione tumorale diretta nel lume dei vasi o la presenza di un aggregato tumorale all'interno di un vaso. Per la diagnosi di invasione vascolare il vaso colpito deve essere localizzato oltre la capsula o all'interno di essa, ma non all'interno del nodulo tumorale stesso. L'unico esame che può quindi determinare con precisione la natura maligna o benigna di una neoplasia follicolare è



l'esame istologico definitivo, effettuato sul nodulo tiroideo dopo l'asportazione chirurgica. Il carcinoma follicolare presenta una diffusione metastatica generalmente per via ematogena. Le metastasi a distanza si verificano in circa il 10% dei pazienti. I siti di diffusione più frequenti sono le ossa e i polmoni, mentre il sistema nervoso centrale, il fegato i reni e gli altri organi sono coinvolti meno frequentemente (35). Le metastasi linfonodali da carcinoma follicolare sono estremamente rare.



**Figura 3.** Carcinoma Follicolare. Due esempi di invasione capsulare. Il tumore penetra la capsula a tutto spessore (A). Invasione capsulare con estensione oltre la capsula con aspetto fungoide (B).

Il **carcinoma papillare** è la neoplasia tiroidea maligna più frequente e presenta una serie di precise caratteristiche nucleari. Sebbene un pattern di crescita papillare sia frequentemente evidenziabile, non è necessario per la diagnosi. Il carcinoma papillare colpisce più frequentemente il sesso femminile e, sebbene sia comunque raro in età pediatrica, rappresenta il tipo di carcinoma più diffuso di questa fascia di età. Il picco di incidenza si raggiunge durante la quinta decade di vita per le donne e durante la sesta per gli uomini. All'esame macroscopico si presenta come una massa indefinita a margini irregolari. La dimensione tumorale varia considerevolmente, più spesso è compresa fra 1 e 3 cm (33). Al taglio la superficie si presenta marrone o grigia, irregolare e solida con la possibile presenza di zone cistiche.

All'esame microscopico, il carcinoma papillare presenta una crescita infiltrativa con margini irregolari. Con l'eccezione della variante follicolare il carcinoma papillare mostra raramente una capsula. Le caratteristiche microscopiche tipiche del carcinoma papillare includono il pattern di crescita, i corpi psammomatosi e specifiche caratteristiche nucleari, che determinano la diagnosi. I nuclei sono ingranditi e contengono una cromatica finemente dispersa, che assume un aspetto otticamente chiaro o vuoto. Sono inoltre presenti invaginazioni del citoplasma che, nelle sezioni istologiche, possono dare l'aspetto di inclusioni intranucleari ("pseudo – inclusioni"). Il carcinoma papillare si presenta come una patologia multifocale dal 22 al 35% dei casi. La diffusione per via linfatica è estremamente frequente, assai più rara quella per via ematica (7%) (33). I confini del tumore sono spesso infiltranti e possono oltrepassare i confini della ghiandola, causando una invasione extratiroidea, portandosi nei tessuti fibro-adiposi e muscolari intorno ad essa. Sono state descritte numerose varianti istologiche del carcinoma papillare (tabella 3).

**Tabella 3.** varianti del carcinoma papillare

<b>Varianti</b>	<b>Criteri diagnostici</b>	<b>Incidenza</b>
Microcarcinoma papillare	<1 cm	30 - 40%
Variante follicolare	Più del 50% del tumore mostra un pattern di crescita follicolare	15 - 20%
Variante a cellule alte	Più del 50% delle cellule hanno un'altezza 3 volte maggiore rispetto alla larghezza	5 - 10%
Variante solida		1 - 3%
Variante sclerosante diffusa	Crescita tumorale con abbondante fibrosi, numerosi corpi psammomatosi e una estesa infiltrazione linfocitaria	1 - 2%
Variante a cellule colonnari		<1%
Variante oncocitica	Più del 50% delle cellule con citoplasma oncocitico	<1%

Il **Carcinoma midollare** (CMT) origina dalle cellule parafollicolari o cellule C della tiroide e rappresenta circa il 5-10% di tutti i carcinomi tiroidei. Le cellule del carcinoma midollare, come le normali cellule c, secernono calcitonina, il cui dosaggio gioca un ruolo importante nella diagnosi e nel follow-up post-operatorio. Nell'80% dei casi si tratta di tumori sporadici, il rimanente 20% si verifica nel contesto di una sindrome MEN o come neoplasia familiare (36). Le neoplasie sporadiche originano generalmente da un lobo mentre bilateralità e multicentricità sono frequenti nei carcinomi familiari. Macroscopicamente il tumore si presenta di consistenza aumentata, color grigio pallido ed infiltrante.

Il **Carcinoma Anaplastico** insorge generalmente in pazienti anziani e deriva dalle cellule follicolari, probabilmente da una sdifferenziazione del carcinoma papillare e follicolare ben differenziato.

Presenta un comportamento clinico estremamente aggressivo, si accresce rapidamente con invasione delle strutture iuxtatiroidiche quali l'esofago e la trachea determinando una rapida disfagia e dispnea.

Può presentare pattern istologici diversi, da quadri di tipo sarcomatoide, nei quali non è più riconoscibile una componente epiteliomorfa, a quadri nei quali sono presenti aree di differenziazione epiteliale talvolta con componente squamoide.

La positività alla citocheratina, presente dal 50% al 100% dei casi, permette di caratterizzare istogeneticamente queste lesioni. Il carcinoma anaplastico ha un'evoluzione estremamente rapida con coinvolgimento massivo delle strutture adiacenti e, sebbene le metastasi siano frequenti, nella maggior parte dei casi la morte sopravviene a meno di un anno dalla diagnosi per compromissione delle strutture del collo (37).

## ***2.4 Staging e prognosi***

La sopravvivenza libera da malattia negli adulti con carcinoma derivante dall'epitelio follicolare tiroideo (esclusi i casi relativamente rari di carcinoma anaplastico) è circa il 90% a 10 anni (38). Tuttavia, un numero non trascurabile (5-20%) di tali casi presenta persistenza di malattia o sviluppa recidive locali o regionali e circa il 10% di essi manifesta nel tempo metastasi a distanza. Inoltre, circa il 5% dei pazienti decede a causa della malattia. Allo scopo di identificare la minoranza dei soggetti ad alto rischio di recidiva o di mortalità tumore specifica devono essere presi in esame i fattori identificati come variabili indipendenti prognosticamente significative: età, caratteri istologici ed estensione della neoplasia (39).

### **Età**

L'età al momento della diagnosi rappresenta uno dei fattori prognostici più importanti. I rischi di recidiva o decesso per cause tumore-specifiche aumentano con l'età, particolarmente dopo i 45 anni e presentano un forte incremento nelle decadi più avanzate di vita. Per quanto riguarda invece le sole recidive regionali, i bambini e gli adolescenti presentano un rischio più elevato rispetto agli adulti.

### **Tipo istologico**

L'istotipo costituisce un elemento fondamentale ai fini della pianificazione della terapia e del follow-up. La prognosi del carcinoma papillare, sia nella variante classica che follicolare, è migliore di quella del carcinoma follicolare, ma solo quando le forme a minima ed ad ampia invasività di quest'ultimo vengano considerate cumulativamente. Qualora si consideri il solo carcinoma follicolare a minima invasività e si eliminino gli effetti confondenti dell'età e dell'estensione della neoplasia (in genere più avanzati

al momento della diagnosi nell'istotipo follicolare), la sopravvivenza in pazienti con carcinoma papillare o follicolare è simile. Nell'ambito del carcinoma papillare una prognosi più sfavorevole si associa ad alcune varianti istologiche (40):

- a cellule alte
- colonnare
- sclerosante diffusa

Nell'ambito del carcinoma follicolare si associano ad una prognosi peggiore quelli:

- ad ampia invasività
- a cellule di Hürthle

Una prognosi intermedia fra i carcinomi papillari/follicolari e quelli anaplastici è osservata per i carcinomi scarsamente differenziati, caratterizzati da un quadro istologico dominante di tipo trabecolare, insulare o solido e da un alto grading istologico (presenza di atipie, elevata attività mitotica ed aree di necrosi spontanea) (40).

### **Estensione del Tumore**

Il rischio di recidiva e quello di mortalità tumore-specifica si correlano in modo significativo con le dimensioni del tumore, l'invasione extratiroidea, la presenza di metastasi linfonodali e le secondarietà a distanza. L'Unione Internazionale Contro il Cancro (UICC) e l' *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) hanno adottato ufficialmente la stadiazione del carcinoma tiroideo basata sul sistema TNM, in analogia con quanto consigliato per le neoplasie di altri organi ed apparati (41). La stadiazione TNM si basa sulle tre componenti prima considerate: dimensioni ed estensione del tumore primitivo (T), presenza o assenza di metastasi a carico dei linfonodi regionali (N) e presenza o assenza di metastasi a distanza (M).

Queste categorie sono ulteriormente suddivise con criterio numerico, individuando la progressiva estensione ed aggressività della neoplasia. Nell'obiettivo di raggiungere una stratificazione del rischio più accurata sono stati elaborati numerosi altri schemi di stadiazione (EORTC, AGES, AMES, MACIS), basati su fattori prognostici indipendenti identificati, mediante analisi multivariata, in studi retrospettivi. Benché ciascuno di questi schemi consenta l'accurata identificazione della maggioranza (70-85%) dei pazienti a basso rischio di mortalità, essi non si sono dimostrati superiori al sistema TNM nell'individuare la classe di rischio in cui inserire i singoli pazienti. Pertanto, tutti i pazienti con tumori della tiroide devono essere classificati sul piano clinico e anatomo-patologico con il sistema TNM (42).

### **Stadiazione TNM del carcinoma della tiroide ad origine follicolare**

#### **1. Lesione Primitiva (T)**

- **Tx** Tumore primitivo non valutabile
- **T0** Mancata evidenza di tumore primitivo
- **T1** Tumore con diametro massimo  $\leq 2$  cm
- **T2** Tumore con diametro massimo  $> 2$  cm, ma  $< 4$  cm
- **T3** Tumore con diametro massimo  $> 4$  cm

Tumore di qualsiasi diametro con minima estensione extratiroidea (tessuti molli peritiroidei o muscolo sternocleidomastoideo)

- **T4a** Tumore di qualsiasi diametro con estensione oltre la capsula tiroidea ed invasione di tessuti molli sottocutanei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente

- **T4b** Tumore che invade la fascia prevertebrale o ingloba l'arteria carotide o i vasi mediastinici. Le categorie T1, T2 e T3 devono essere suddivise in (a) tumore singolo o (b) tumore multifocale, indicato con (m). La lesione più grande determina la classificazione T. Tutti i carcinomi anaplastici sono considerati tumori in classe T4 e sono suddivisi in: T4a (susceptibile di resezione chirurgica) e T4b (extratiroideo, non susceptibile di resezione chirurgica) .

### **Linfonodi Regionali (N)**

I linfonodi regionali sono fondamentalmente rappresentati dai compartimenti centrale del collo (VI), latero-cervicale (II-IV) e mediastinico superiore (VII). Minore importanza assumono i linfonodi dei compartimenti I (sottomentonieri e sottomandibolari) e V (triangolo posteriore), meno frequentemente e più tardivamente coinvolti nella diffusione della malattia neoplastica.

- **Nx** Linfonodi regionali non valutabili
- **N0** Assenza di metastasi linfonodali
- **N1** Metastasi nei linfonodi regionali
- **N1a** metastasi al livello VI (linfonodi pretracheali, paratracheali e prelaringei)
- **N1b** metastasi omolaterali, controlaterali o bilaterali ai linfonodi cervicali o mediastinici superiori

### **Metastasi a Distanza (M)**

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



## Classi di rischio

La conoscenza dei principali fattori prognostici ha condotto alla formulazione del sistema di classificazione TNM, che consente di identificare i pazienti con tumori tiroidei ad alto, medio o basso rischio di mortalità tumore-specifica. Nei pazienti con età superiore a 45 anni questi schemi forniscono informazioni adeguate anche relativamente al rischio di recidiva, poiché la maggior parte dei decessi sono mediati dalla persistenza o recidiva di malattia. Nei soggetti di età inferiore a 45 anni, al contrario, la suddivisione in due sole classi (stadi I e II) non fornisce uno strumento adeguato ad identificare il rischio di recidiva neoplastica. La stadiazione, inoltre, non descrive adeguatamente la mortalità tumore-specifica del sottogruppo di soggetti di età inferiore a 45 anni con metastasi a distanza o con fattori di rischio non considerati nel TNM.

**Tabella 4. TNM – carcinoma papillare e follicolare della tiroide**

Stadio	Età < 45 anni			Età >45 anni		
	T	N	M	T	N	M
<b>I</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M0	T1	N0	M0
<b>II</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	T2	N0	M0
<b>III</b>				T3	N0	M0
				T1 - T3	N1a	M0
<b>IVa</b>				T4a	N0	M0
				T4a	N1a	M0
				T1 - T4a	N1b	M0
<b>IVb</b>				T4b	Qualsiasi N	M0
<b>IVc</b>				Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

## ***2.5 Diagnostica preoperatoria***

Il quadro clinico dipende dal tipo di carcinoma presente. Nel caso del carcinoma differenziato si ha generalmente il riscontro occasionale, da parte del medico o del paziente, di un nodulo tiroideo quasi sempre asintomatico. Raramente e solo nelle forme tumorali più avanzate vi possono essere segni di compressione o infiltrazione quali disfonia, disfagia e dispnea. All'esame obiettivo il nodulo tumorale è in genere singolo, di consistenza nettamente aumentata, mobile sui piani superficiali e profondi negli stadi iniziali, mentre negli stadi avanzati può infiltrare le strutture del collo e diventare fisso. Può essere evidenziabile ingrossamento dei linfonodi laterocervicali per presenza di metastasi. Solitamente non sono presenti sintomi di iper o ipotiroidismo.

### **Esame obiettivo**

La palpazione fornisce elementi sul numero, le dimensioni e la consistenza dei noduli, nonché sulle caratteristiche della ghiandola tiroidea; permette di esplorare la presenza di adenopatie cervicali, frequenti nel caso di neoplasie papillari, specialmente nel bambino.

Gli argomenti clinici di sospetto di un cancro sono rappresentati dalla presenza di adenopatie palpabili, dalla durezza e dall'irregolarità del nodulo, dalla sua fissità ai tessuti vicini e dalla paralisi di una corda vocale. Tuttavia, nessuno di questi elementi è patognomonico di malignità. In uno studio in cui sono stati correlati i segni clinici di sospetto con l'istologia del nodulo, un nodulo benigno è stato riscontrato nel 29% dei pazienti con adenopatia cervicale, nel 50% dei noduli duri alla palpazione, nel 29% dei pazienti con un nodulo fisso e nel 17% dei pazienti con paralisi di una corda vocale (43).

## **Esami di laboratorio**

Il dosaggio del TSH e degli ormoni tiroidei non permette di differenziare un nodulo benigno da uno maligno, ma riflette lo stato funzionale della tiroide. Un tasso di TSH basso o non dosabile suggerisce che il nodulo è iperfunzionante. Il dosaggio degli auto-anticorpi anti-tiroide (anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi) è consigliato al momento della prima valutazione del paziente allo scopo di identificare la presenza di una tiroidite autoimmune. Il dosaggio della tireoglobulina (Tg) circolante, le cui concentrazioni sono spesso elevate in presenza di uno o più noduli, non fornisce alcuna informazione diagnostica sulla natura benigna o maligna del nodulo. L'utilità del dosaggio della Tg nel carcinoma della tiroide è limitata al paziente già operato.

Al contrario, il dosaggio sistematico della calcitonina (CT) circolante nei pazienti affetti da nodulo tiroideo permette la diagnosi pre-operatoria di CMT con un'accuratezza superiore all'esame citologico e senza incorrere in risultati falsamente positivi. Quest'esame è quindi fortemente consigliato al momento della valutazione iniziale dei noduli tiroidei (44).

## **L'ecografia tiroidea**

L'ecografia della tiroide eseguita con una sonda da 7,5 - 12 MHz è sempre più utilizzata come primo esame diagnostico. Essa permette di distinguere, nel caso di una tiroidite, gli pseudo-noduli dai veri noduli tiroidei. Permette inoltre, una misura precisa delle dimensioni dei noduli, del loro numero esatto e le loro caratteristiche solide, cistiche o miste. La concomitanza di particolari caratteristiche ecografiche, in particolare l'ipoecogenicità del nodulo, la presenza di microcalcificazioni intranodulari, la perdita o l'interruzione della continuità dell'alone periferico, costituiscono elementi di sospetto. Inoltre, l'ecografia permette di esaminare il parenchima tiroideo

extra-nodulare e le stazioni linfonodali cervicali.

Per esaminare in modo completo la ghiandola, l'indagine deve essere condotta con scala dei grigi e con Color-Doppler.

Le caratteristiche nodulari che vengono valutate sono: il numero, le dimensioni, la forma, l'ecogenicità, la struttura, le calcificazioni puntiformi o a guscio, l'alone, i margini ed il flusso. Si possono esaminare inoltre i vari livelli linfoghiandolari regionali e si possono controllare le variazioni dimensionali nel tempo.

I rilievi più frequentemente associati al tumore tiroideo sono: la struttura solida, il diametro anteroposteriore > diametro trasversale, la spiccata ipoecogenicità, i margini irregolari, l'assenza di alone, la presenza di fini calcificazioni e la vascolarizzazione solo o prevalentemente intranodulare.

Nessuna caratteristica tuttavia, possiede alta sensibilità e alto valore predittivo positivo. La più alta sensibilità è data dalla composizione solida, circa il 70-75%; tuttavia il valore predittivo positivo è assai basso, poiché solo il 16-27% dei noduli solidi sono maligni. Il più alto valore predittivo positivo è dato dalle microcalcificazioni, 42-94%, ma la sensibilità è bassa, in quanto solo il 25-59% di tumori hanno calcificazioni (43).

L'esame con Color-Doppler si esegue con scansioni sagittali e trasversali in corrispondenza del diametro maggiore del nodulo.

La presenza di flusso solo o prevalentemente centrale è più frequentemente associata a neoplasia (45). Tuttavia, la validità del Color-Doppler è controversa, in quanto nessun tipo di flusso consente di porre diagnosi o di escludere la presenza di neoplasia. L'importanza di definire i criteri ecografici per individuare i noduli tiroidei di possibile natura neoplastica risiede nella necessità di selezionarli per un accertamento bioptico, evitando procedure invasive inutili.

## **L'agoaspirato**

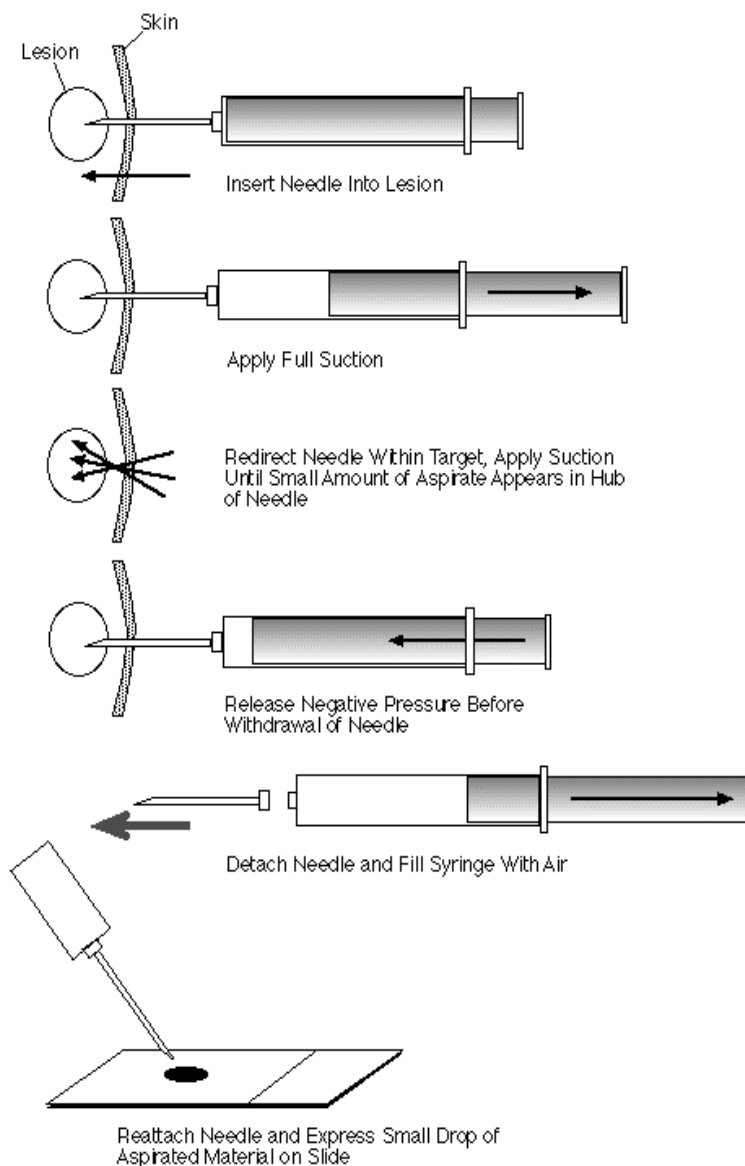
Nel corso degli anni l'agoaspirato è diventato un passo essenziale nella valutazione di un nodulo tiroideo.

Come test di screening per il carcinoma tiroideo, l'agoaspirato contribuisce a determinare il management terapeutico più indicato, selezionando i pazienti con neoplasia maligna necessitanti di terapia chirurgica dai restanti che possono essere trattati anche senza chirurgia. L'agoaspirato è ormai considerato come un sicuro, economico ed accurato strumento per la valutazione del nodulo tiroideo, avendo infatti ridotto del 50% il numero di pazienti operati e diminuito il costo di gestione del nodulo tiroideo di oltre il 25% (2).

Ad oggi è il test più specifico e sensibile per la diagnosi di carcinoma tiroideo, con un valore predittivo positivo fra l'89 e il 98% e predittivo negativo fra il 94 e il 98% (46). Questi valori dipendono tuttavia da diversi fattori, fra cui l'abilità dell'operatore nell'effettuare l'aspirazione e dell'anatomopatologo nell'analisi citologica.

Inizialmente il paziente viene disteso sul lettino a collo scoperto ed iperesteso, si disinfetta quindi la superficie cutanea per poi inserire (con o senza guida ecografica) l'ago nella regione del collo dove è situato il nodulo. Posizionato quindi l'ago all'interno del nodulo si provvede ad aspirare materiale fino a riempire il cono dell'ago. È consigliabile effettuare diversi passaggi ed aspirazioni, muovendo l'ago internamente al nodulo. Il materiale ottenuto viene quindi trasferito e strisciato su vetrini ed analizzato da un anatomopatologo.

**Figura 4.** Procedura per l'esecuzione di un agoaspirato



Una volta che il materiale è stato analizzato viene inserito un sistema di classificazione a 5 classi sviluppato nel Regno Unito nel 2002 e poi modificato ed adottato dalla SIAPEC (Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica) nel 2007 (47). Ad ogni classe è associata la diagnosi, il relativo rischio di malignità e il percorso terapeutico più indicato.

- **Categoria non diagnostica – TIR 1**

In questa categoria sono inclusi agoaspirati con cellularità indagata oppure composti da solo materiale necrotico o globuli rossi. In questi casi la migliore opzione è ripetere l'agoaspirato. La percentuale di agoaspirati in questa categoria non dovrebbe superare il 15%.

- **Categoria “benigna” - TIR 2**

In questa categoria è inclusa una ampia varietà di lesioni, fra le quali quelle infiammatorie, iperplastiche, le lesioni colloidali e neoplasie benigne. Circa il 70% degli agoaspirati cade in questa categoria, associata ad un rischio molto basso di malignità. In questi casi il management della patologia prevede un follow-up con ecografia ogni 6 – 12 mesi.

- **Categoria indeterminata – TIR 3a e TIR3 b**

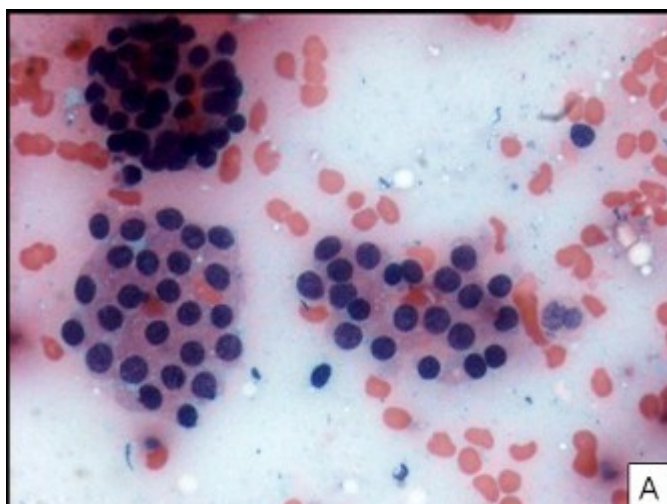
Circa il 30% degli agoaspirati è inserito in questa categoria, che generalmente comprende reperti presentanti popolazioni di cellule follicolari con pattern microfollicolare (Figura 6). Il rischio di malignità in questa categoria è del 15 – 30%, le neoplasie maligne più frequentemente diagnosticate sono il carcinoma follicolare e la variante follicolare del carcinoma papillare. Il criterio istologico per definire una lesione maligna follicolare è però l'invasione capsulare e/o vascolare, due caratteristiche non evidenziabili all'esame citologico, ma soltanto all'esame istologico definitivo. A seconda della presenza o meno di atipie questa classe è suddivisibile in TIR 3a e TIR 3b. Queste lesioni sono trattate chirurgicamente con una tiroidectomia totale o una lobectomia.

- **Categoria sospetta per malignità – TIR 4**

In questi casi l'agoaspirato è suggestivo di malignità, ma non sono presenti sufficienti caratteristiche per una sicura diagnosi di neoplasia maligna. Visto l'alto rischio queste lesioni sono generalmente trattate con una tiroidectomia totale. L'esame estemporaneo è consigliato.

- **Categoria diagnostica per malignità – TIR 5**

Circa il 10 – 15% di tutti gli agoaspirati sono inclusi in questa categoria che comprende i casi con citologia sicuramente diagnostica di neoplasia maligna, rappresentata nella maggior parte dei casi dal carcinoma papillare. Altre diagnosi incluse in questa categoria sono il carcinoma midollare, il carcinoma anaplastico, i linfomi e le metastasi. La terapia consiste nella tiroidectomia totale e successivo trattamento con radioiodio.



**Figura 5.** Neoplasia follicolare (categoria indeterminata – TIR 3). Questi aspirati mostrano piccoli gruppi sparsi di cellule follicolari con architettura microfollicolare



Come precedentemente visto l'agoaspirato è l'esame preoperatorio più efficace in pazienti con noduli tiroidei. La specificità e la sensibilità sono infatti vicine al 100% nei casi di noduli benigni e carcinoma papillare. In questi casi la diagnosi definitiva viene posta usando solamente i risultati dell'agoaspirato, permettendo stabilire la strategia terapeutica più corretta. Il campo delle “lesioni a pattern follicolare” rimane invece ancora una sfida.

Come precedentemente menzionato infatti, la diagnosi differenziale fra adenoma e carcinoma follicolare dipende dalla presenza di invasione capsulare e/o angioinvasione, un aspetto non apprezzabile all'agoaspirato. Inoltre anche la diagnosi differenziale fra adenoma follicolare e variante follicolare del carcinoma papillare è spesso difficoltosa e controversa. I criteri morfologici e citologici non quindi sono sufficienti per fare una netta distinzione fra tumori benigni e maligni nel gruppo delle neoplasie follicolari.

Questa difficoltà diagnostica determina problemi nella gestione del paziente, che può andare incontro ad un trattamento eccessivo, comprendente una tiroidectomia totale e trattamento con radioiodio, e a tutti i rischi a questo associati, oppure ad una diagnosi errata, che può portare a recidiva o aumentare il rischio di metastasi a distanza (48).

## ***2.6 Trattamento***

Il trattamento chirurgico rappresenta il primo e più importante atto terapeutico nella cura del carcinoma tiroideo e la completa rimozione della neoplasia viene giudicata, in analisi multivariata, fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza a lungo termine (49).

In particolare, la tiroidectomia totale rappresenta l'intervento d'elezione in quanto permette di asportare tutti i foci neoplastici presenti, di eseguire il successivo trattamento ablativo con Iodio - 131 e di sorvegliare facilmente il paziente con dosaggio della tireoglobulina (Tg) ematica circolante. La lobectomia totale, sebbene possa essere un intervento risolutivo per le neoplasie con diametro < 1 cm, viene invece poco utilizzata, soprattutto per la frequente multifocalità della neoplasia, fattore prognostico comunque non sicuramente sfavorevole in termini di mortalità tumore specifica.

L'enucleoresezione (asportazione del solo nodulo tiroideo e di una minima quota di tessuto circostante), la lobectomia parziale (asportazione del nodulo tiroideo con una maggiore porzione di parenchima tiroideo) e la tiroidectomia subtotale (rimozione bilaterale di più della metà della ghiandola da entrambi i lati e dell'istmo) sono interventi ritenuti assolutamente inadeguati, a causa dell'elevata percentuale di recidive e dalla frequente necessità di reintervento (49).

Il tipo di intervento chirurgico dipende dalla situazione clinica e si possono ipotizzare due diverse situazioni:

- nodulo solitario a citologia indeterminata (Tir 3), per il quale l'intervento chirurgico assume un ruolo terapeutico e diagnostico;
- carcinoma tiroideo già diagnosticato attraverso esame citologico.

Poiché il nodulo indeterminato all'esame citologico ("neoplasia follicolare") ha un rischio di malignità valutato intorno al 20% , la scelta dell'estensione chirurgica deve essere concordata tra chirurgo, endocrinologo e paziente.

In questo caso, le alternative chirurgiche sono

- la tiroidectomia totale (intervento gravato da un rischio di complicanze circa doppio rispetto alla semplice lobectomia)
- la lobectomia con eventuale successivo intervento di completamento di tiroidectomia, nei casi in cui l'esame istologico definitivo deponga per carcinoma.

Lo stesso atteggiamento terapeutico può essere consigliato per noduli risultanti ripetutamente non diagnostici al FNA, il cui rischio di malignità è sconosciuto, ma probabilmente vicino al 5 - 10% (50). Nel caso di pazienti con noduli indeterminati all'esame citologico, ma di grandi dimensioni (> 4.0 cm) e con marcate atipie cellulari, con familiarità per carcinoma tiroideo o con storia di pregressa esposizione a radiazioni ionizzanti, è sicuramente indicata la tiroidectomia totale, per l'elevato rischio di malignità (51). In caso di diagnosi pre-operatoria di carcinoma, la tiroidectomia totale o quasi totale permette di migliorare la sopravvivenza dei pazienti ad alto rischio e di ridurre la percentuale di recidive nei casi a basso rischio.

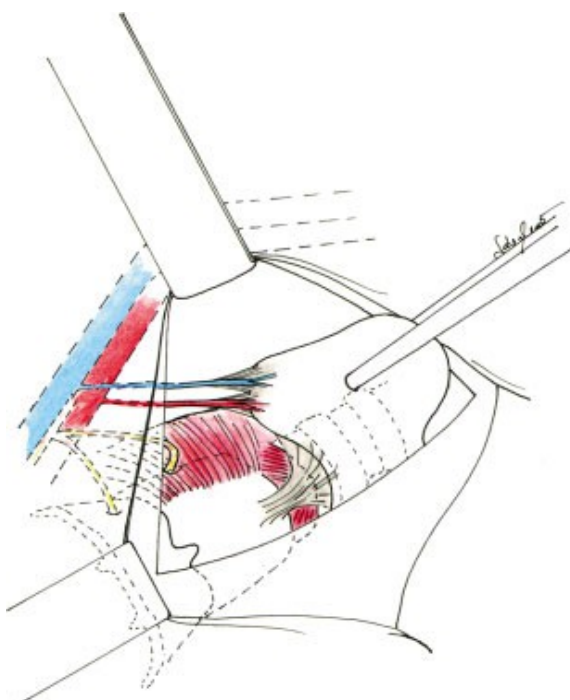
La tecnica chirurgica più frequentemente eseguita è la tiroidectomia open, consistente nella rimozione totale extracapsulare dei lobi tiroidei e dell'istmo preservando entrambe le ghiandole paratiroidei, il nervo laringeo ricorrente e la branca superiore esterna del nervo laringeo superiore, bilateralmente (51)

Il primo tempo consiste nell'incisione di cute e sottocute con bisturi a lama fredda. L'incisione è la classica cervicotomia a collare secondo Kocher, lievemente arcuata, a convessità inferiore e posta circa 2 centimetri cranialmente al giugulo, che si estende fra i margini anteriori dei muscoli sternocleidomastoidei, con una lunghezza di circa 6 -7 cm.

Successivamente si effettua tramite elettrobisturi lo scollamento dei lembi cutanei, dissecando il muscolo platisma dalla fascia cervicale superficiale fino al margine superiore della cartilagine tiroidea superiormente e fino al giugulo inferiormente.

Sempre attraverso elettrobisturi si procede con l'incisione della linea alba cervicale e la divaricazione dei muscoli sotto-ioidei, andando ad esporre la tiroide. La retrazione del muscolo sternotiroideo e sternoioideo permette una migliore visualizzazione del peduncolo tiroideo superiore (formato dalla vena ed arteria tiroidea superiore), che viene quindi isolato e sezionato, preservando la branca esterna del nervo laringeo superiore. Con la sezione del peduncolo superiore il polo superiore della tiroide può essere quindi mobilizzato e si può procedere con la dissezione della ghiandola in

senso mediale e la sezione delle vene inferiore e media.



**Figura 6.** Sezione dei vasi superiori della tiroide, con il polo superiore retratto nella posizione "down and out" in modo da evitare di danneggiare la branca esterna del nervo laringeo superiore.

A questo punto deve essere visualizzata e preservata la ghiandola paratiroide inferiore, cercando di evitare ogni possibile danno o devascularizzazione di questa. Quindi si procede con la legatura della arteria tiroidea inferiore.

Il successivo e fondamentale passo consiste nella identificazione e preservazione del nervo laringeo ricorrente (NLR). Vi sono diversi punti di riferimento che possono aiutare nella identificazione del nervo ricorrente, i più importanti sono l'arteria tiroidea inferiore, il tubercolo di Zuckerkandl e il rapporto fra di questo con le paratiroidi, il NLR decorre infatti infatti anteriormente alla ghiandola paratiroide superiore e posteriormente a quella inferiore.

Si rimuove quindi il lobo andando a separare il lobo tiroideo dalla trachea e si procede con una accurata verifica dell'emostasi.

Per effettuare una tiroidectomia completa si effettua lo stesso procedimento sul lobo controlaterale.

La chiusura avviene a strati, per prima cosa si riavvicinano i muscoli sottoioidei sulla linea mediana e vengono uniti con due o tre punti staccati, quindi si procede con la chiusura del muscolo platisma ed infine della cute.

In caso di carcinoma tiroideo con diametro massimo  $< 2$  cm, in alternativa alla tecnica chirurgica tradizionale, è possibile eseguire l'intervento di tiroidectomia con tecnica videoassistita (MIVAT, Minimally Invasive Video-Assisted Thyroidectomy), procedura che permette di ottenere la stessa radicalità oncologica dell'intervento tradizionale, con il notevole vantaggio di un decorso post-operatorio significativamente migliore sia in termini di dolore che di risultato estetico (53).

## ***2.7 Complicanze***

### **Lesioni del nervo laringeo ricorrente**

L'asportazione della tiroide impone una dissezione accurata del nervo laringeo ricorrente, essendo questo a stretto contatto con la parete posteriore della tiroide. Il meccanismo fisiopatologico del danno è vario, può infatti essere causato da una devascularizzazione del nervo, da una infiammazione locale e più raramente da una completa sezione del nervo. Il nervo laringeo ricorrente è un nervo misto derivante dal nervo vago che innerva tutti i muscoli laringei (eccetto il muscolo cricotiroideo) e trasmette informazioni sensitive dalla mucosa della laringe. Lesioni unilaterali del nervo (URLNP) possono quindi causare una insufficiente chiusura della laringe durante la deglutizione, la tosse e la fonazione, a causa dell'assenza della normale abduzione della corda vocale paralizzata. Il paziente presenterà quindi una modificazione importante del tono della voce, con raucedine ed indebolimento della potenza vocale. La frequenza di lesioni monolaterali temporanee del nervo è di circa il 3 – 4%, mentre la frequenza di lesioni permanenti (una disfonia > 12 mesi) si attesta sul 1- 2% (54).

La lesione bilaterale del nervo laringeo inferiore è una complicanza assai più rara e temibile poiché la paralisi delle corde in adduzione non permette la respirazione del paziente. Generalmente si presenta con una dispnea a riposo tale da richiedere l'intubazione e, nel caso non vi sia una pronta ripresa, la tracheotomia.

La paralisi in abduzione determina invece una perdita completa della fonazione e il rischio di una polmonite ab ingestis.

### **Lesione del nervo laringeo superiore**

La branca esterna del nervo laringeo superiore è probabilmente il nervo più frequente leso nella chirurgia tiroidea, con una incidenza stimata fino al 25% (55). La lesione di questo nervo determina una incapacità di allungamento della corda vocale e, quindi, l'incapacità di generare suoni acuti; questo può compromettere la carriera di cantanti o professionisti che basano sulla voce la loro professione. Generalmente però il paziente non si accorge di alcun cambiamento della voce e solo occasionalmente la lesione si presenta con raucedine o diminuzione della potenza vocale

### **Ipocalcemia**

L'ipocalcemia (calcemia  $< 8$  mg/dL) transitoria è la complicanza più comune della tiroidectomia totale, si presenta infatti con una frequenza del 50% circa. L'ipocalcemia permanente ha invece una frequenza molto più bassa, risultando nel 1 – 2% dei casi (56). Questa complicanza deriva da un danno alle paratiroidi durante l'operazione, compromettendo quindi la normale secrezione di paratormone. L'ipocalcemia è una possibile complicanza solo della tiroidectomia totale, nella lobectomia infatti le paratiroidi controlaterali non vengono messe a rischio.

I sintomi dell'ipocalcemia variano a seconda della gravità di questa. Tra i sintomi più precoci troviamo la sensazione di intorpidimento o formicolio attorno della bocca o delle dita; con un ulteriore abbassamento dei livelli ematici di calcio i formicolii si trasformano in crampi tetanici (con positività al segno di Chvostek e di Trousseau), fino alle convulsioni. Nelle condizioni più gravi insorgono palpitazioni ed aritmie cardiache severe che, insieme al laringospasmo, possono mettere in pericolo la vita stessa del paziente.

## **Rischio emorragico**

Il rischio di emorragie significative durante una tiroidectomia o lobectomia è piuttosto basso, tuttavia raramente può esserci un danno ai grandi vasi del collo tale da richiedere l'intervento dello specialista vascolare e se il danno è troppo importante può determinare gravi comorbidità.

Più frequenti e pericolose sono invece le emorragie postoperatorie, potenzialmente mortali anche senza l'interessamento di grandi vasi. Un semplice ematoma può ad esempio causare una compressione della trachea tale da provocare soffocamento.

Una grave, sebbene estremamente rara, complicanza è la fistolizzazione fra la trachea e l'arteria innominata.

Ulteriori rare complicanze della tiroidectomia sono le lesioni della trachea e dell'esofago. La trachea può essere lesionata intraoperativamente, tuttavia il danno è solitamente identificato e riparato immediatamente. L'esofago è spesso coinvolto solo superficialmente durante l'operazione, mentre un danno trasmurale è una complicanza estremamente rara, sebbene particolarmente grave, della tiroidectomia.



### **3. Biomarkers del carcinoma tiroideo**

A causa della mancanza di specificità e sensibilità dell'esame citologico all'agoaspirato nelle neoplasie a pattern follicolare, la ricerca di biomarkers del carcinoma tiroideo follicolare, e più in generale del carcinoma tiroideo, è diventata un'area di intensa ricerca. Nel corso dei quarant'anni dalla scoperta della calcitonina come biomarkers per il carcinoma midollare, sono stati individuati nuovi marcatori tumorali che potessero indicare con maggiore precisione il rischio di malignità di una neoplasia tiroidea.

#### ***3.1 Immunoistochimica***

Il termine immunoistochimica si riferisce alla possibilità di rilevare determinati antigeni (e.g. proteine) nelle cellule di un tessuto sfruttando il legame di questi con gli anticorpi. I due antigeni più studiati sono la galattina – 3 e HBME – 1 (Hector Battifora mesothelial cell antibody) (57). La galectina – 3 fa parte della famiglia delle lectine leganti  $\beta$ -galattoside ed è coinvolta in numerose funzioni, fra cui la adesione cellula – cellula e matrice – cellula, la regolazione del ciclo cellulare e la apoptosi (58).

Questa proteina era inizialmente stata descritta come un marker che potesse caratterizzare in modo accurato le neoplasie maligne tiroidee da quelle benigne, tuttavia i risultati degli studi seguenti stati contrastanti, a causa dell'individuazione della galattina – 3 anche in tessuto tiroideo normale o in neoplasie benigne. Inoltre un esame negativo per questo marker non può escludere in alcun modo la presenza di un carcinoma. In un recente studio multicentrico è stata verificata l'utilità della galectina – 3 come test di screening, analizzando un ampio numero di neoplasie follicolari classificate come indeterminate all'agoaspirato (59). La sensibilità complessiva del test è stata del 78% mentre la specificità del 93%. Gli autori hanno dichiarato

che, usando questo approccio, potrebbe essere evitato il 71% di tutte le operazioni chirurgiche non necessarie. Tuttavia questi dati devono essere letti con cautela, vista l'alta percentuale di falsi negativi ottenuta con questo test. Le neoplasie follicolari d'altro canto includono un'ampia gamma di sottotipi tumorali, rendendo quindi improbabile l'identificazione di un singolo marker capace di distinguere le neoplasie tiroidee da quelle tumorali. Prasad *et al.* hanno indagato sul possibile aumento dell'efficacia diagnostica dell'agoaspirato analizzando la galectina – 3 in combinazione con altri markers. L'insieme dei markers, comprendente la galectina – 3, la fibronectina e l'HBME1, ha individuato tutti i carcinomi follicolari, con una frequenza di falsi positivi del 24% (60). Uno studio successivo ha valutato l'espressione della galectina – 3 e di HBME – 1, in combinazione con CXCR4, in cento agoaspirati categorizzati come benigni (22), neoplasie indeterminate (43), sospetti di carcinoma papillare (10) e come carcinomi papillari (10) (61). L'espressione di ciascun marker era significativamente associato ad una diagnosi di malignità ( $p < 0,0001$ ), sebbene la sensibilità nell'individuare neoplasie maligne variasse dal 54% della galectina – 3 al 94% per HBME – 1. In particolare analizzando solamente le neoplasie indeterminate è emerso che solo l'espressione di CXCR4 e HBME – 1 era associata con la diagnosi di malignità, inoltre entrambi questi marker, presi insieme o singolarmente, hanno mostrato un buon valore di accuratezza diagnostica, pari al 88,4% al 90,7%. È da sottolineare però che l'espressione di CXCR4 è stata descritta solamente nel carcinoma papillare e non nel follicolare, indicando che le neoplasie maligne nel gruppo “indeterminato” erano rappresentate solo dalla variante follicolare del carcinoma papillare. Nonostante quindi numerosi dati incoraggianti, non è ancora possibile determinare con precisione la natura di una neoplasia indeterminata attraverso marker immunoistochimici.

### **3.2 Genomica**

Sono state scoperte numerose mutazioni geniche coinvolte nella patogenesi del carcinoma tiroideo, in Figura 7 sono rappresentati gli eventi molecolari, verificati o sospettati, che determinano la genesi dell'adenoma follicolare, del carcinoma follicolare e papillare e del carcinoma anaplastico.

Ad oggi si ritiene che il carcinoma papillare e follicolare si sviluppino in maniera indipendente, mentre alcune evidenze suggeriscono una evoluzione dall'adenoma follicolare al carcinoma follicolare.

Il carcinoma papillare presenta frequentemente mutazioni puntiformi del gene BRAF e RAS, così come riarrangiamenti RET/PTC, mutazioni entrambi capaci di attivare la via della MAP kinasi. Queste mutazioni, mutualmente esclusive, sono state individuate in più del 70% dei carcinomi papillari. I carcinomi follicolari presentano invece mutazioni RAS o riarrangiamenti PAX8/PPARc, due mutazioni evidenziabili nel 75% dei carcinomi follicolari. Le mutazioni riguardanti i carcinomi scarsamente differenziati coinvolgono invece i geni della p53 e della  $\beta$  – catenina.

L'applicazione di test genetici per la diagnosi e la prognosi del carcinoma tiroideo è stata lungamente studiata, tuttavia sono stati prodotti risultati soddisfacenti soltanto per il carcinoma papillare, che tuttavia non presenta difficoltà diagnostiche, attraverso l'identificazione delle mutazioni BRAF, un fattore prognostico negativo, e del riarrangiamento PTC/RET.

La mutazione oncogenica di BRAF è l'evento genetico prevalente del carcinoma papillare, presente mediamente nel 44% dei casi con una variabilità dal 28 all'83% nei diversi studi. E' rappresentato dall'attivazione oncogenica del gene BRAF, causata dalla mutazione Val600Glu (genotipo T1799A) (62) ed è riscontrata frequentemente anche in nevi benigni, melanomi maligni ed in un sottogruppo di tumori dell'ovaio e del colon.

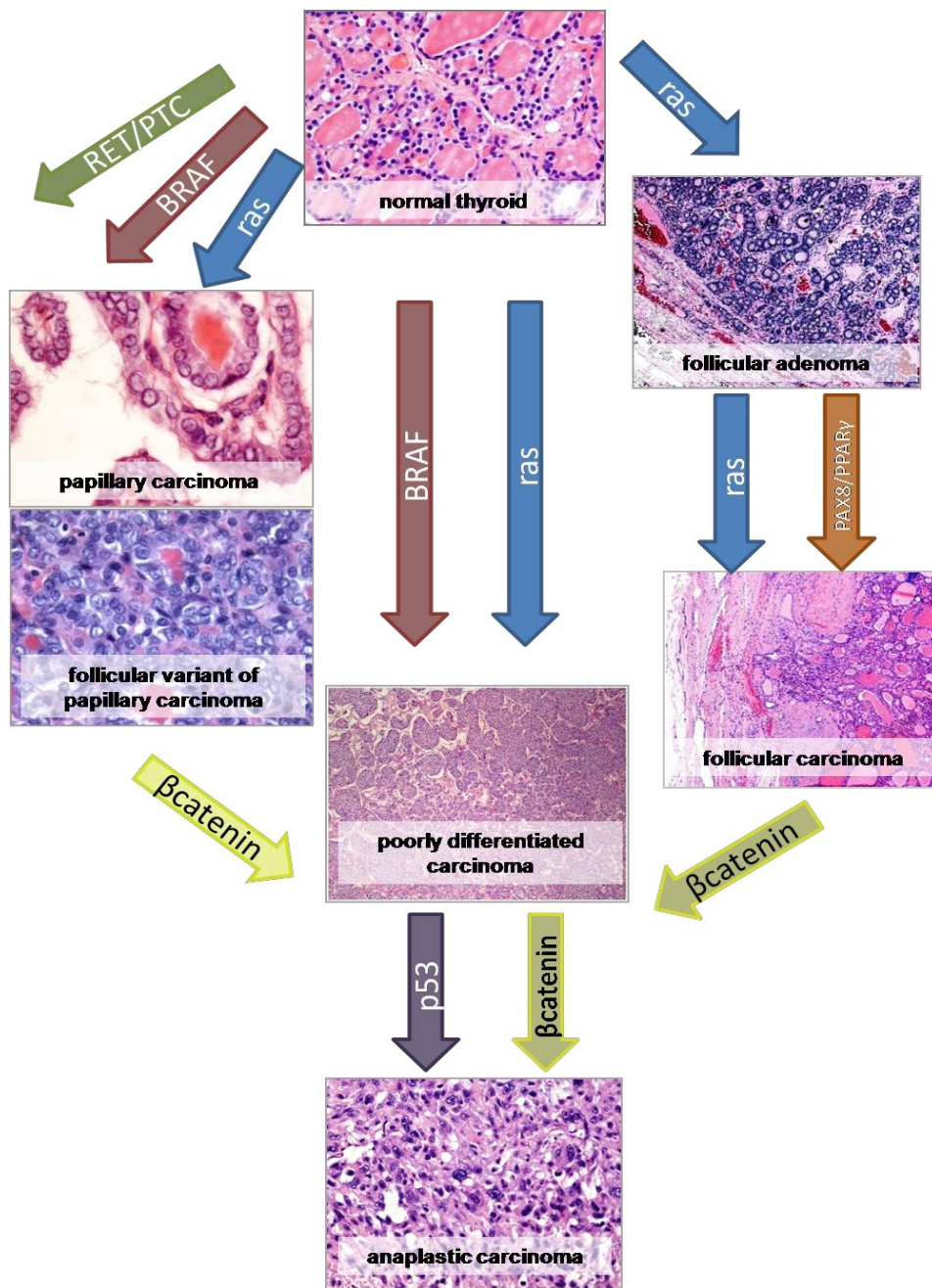
BRAF è un forte attivatore della chinasi MAP; infatti, risulta una

componente della cascata RAS>RAF>MEK>ERK/MAP che gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita, del ciclo cellulare e della proliferazione. Diversi studi indicano che le mutazioni in BRAF si associano ad una maggiore aggressività del tumore in termini di invasione, stadio clinico e rischio di ripresa. Le mutazioni in BRAF sono prevalentemente associate alle varianti a cellule alte e classica dell'istotipo papillare (68). Inoltre la mutazione in BRAF risulta anche associata alla perdita della capacità di captare lo Iodio 131 e quindi ad una scarsa risposta terapeutica.

La patogenesi molecolare del carcinoma follicolare rimane ancora irrisolta. Nel 2000 Kroll et al. identificarono una proteina di fusione chiamata PAX8/PPAR $\gamma$ , risultante da una traslocazione evidenziata soltanto nelle neoplasie follicolari. Tale alterazione genetica si crea come prodotto della traslocazione t(2;3)(q12-13; p24-25); l'intera sequenza codificante il gene PPAR $\gamma$  (3p25), fattore trascrizionale della famiglia dei recettori nucleari ormonali è fusa con i primi sei esoni del gene PAX8 (2q13), codificante per un attivatore trascrizionale tiroide-specifico (63). I risultati finora ottenuti attestano che in media il 50% (range 29-78%) dei carcinomi follicolari esprime il gene PAX8/PPAR $\gamma$ . L'adenoma presenta però una positività per il gene mediamente nel 17% dei casi (range 0-55%) ed inoltre la sua espressione potrebbe risultare persa o mancante in tumori più indifferenziati e più aggressivi. PAX8/PPAR $\gamma$  risulterebbe quindi un elemento genetico limitato all'adenoma e al carcinoma follicolare, che determina una accelerazione del ciclo cellulare, una inibizione dell'apoptosi e provoca la perdita di inibizione da contatto. Resta ancora da definire se l'individuazione del PAX8/PPAR $\gamma$  possa fornire un contributo per la diagnosi di carcinoma follicolare, infatti sebbene sia un marcatore specifico, l'analisi risulta negativa in un'alta percentuale dei casi (64).

E' comunque di notevole interesse l'osservazione di una mutua esclusione della presenza di oncogeni RAS e PAX8-PPAR $\gamma$  in tumori follicolari, come a sostenere l'ipotesi che esistono sottotipi molecolari distinti .

**Figura 7.** Alterazioni molecolari nei tumori della tiroide



### ***3.3 Proteomica***

L'applicazione della proteomica nella ricerca di markers tumorali tiroidei ha portato alla individuazione di numerose molecole implicate nella genesi del carcinoma tiroideo. L'elettroforesi bidimensionale su gel ha permesso l'identificazione di 31 proteine differientemente espresse nel carcinoma papillare rispetto al tessuto tiroideo sano. Fra tutte le proteine iperespresse la proteina S100A6 presenta la differenza più marcata, essendo espressa 6.5 volte di più. Analizzando invece la differente espressione di proteine fra il carcinoma follicolare e l'adenoma follicolare è stato evidenziato che fra le proteine differientemente espresse nessuna poteva essere ricondotta alle via di segnale o alle mutazione tipicamente descritte nel carcinoma follicolare. Un studio condotto sul materiale ottenuto dall'agoaspirato aveva come scopo la ricerca di cambiamenti nel pattern proteico fra due varianti di carcinoma papillare (la variante classica e la variante a cellule alte) (65). I cambiamenti dell'espressione proteica sono stati identificati usando l'elettroforesi bidimensionale e l'analisi con western blot. In questo caso 12 proteine sono stato trovate esclusivamente nella variante classica e tre esclusivamente nella variante a cellule alte. Questo studio dimostra la potenziale efficacia dell'analisi proteomica degli agoaspirati nell'evidenziare proteine associate al carcinoma tiroideo, tuttavia i carcinomi analizzati erano in maggioranza carcinomi papillari, quindi facilmente diagnosticabili all'analisi citologica. L'efficacia di questa tecnica nella diagnosi delle neoplasie indeterminate è ancora da dimostrare.

Nonostante quindi le numerose scoperte riguardo la genesi e lo sviluppo dei carcinomi tiroidei, ad oggi nessun biomarker può ancora fornire una risposta definitiva al problema della diagnosi preoperatoria delle neoplasie indeterminate della tiroide

#### **4. L'analisi metabolomica**

La metabolomica è lo studio sistematico delle uniche impronte chimiche lasciate da specifici processi cellulari ossia lo studio dei loro profili metabolici.

Il metaboloma rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti di un organismo biologico, vale a dire i prodotti finali della sua espressione genica. Il profilo metabolico fornisce quindi un'istantanea della fisiologia di quella cellula. In particolare genomica e proteomica forniscono la descrizione di ciò che l'organismo "può" ovvero la descrizione di un organismo in potenza. Ciò che invece un organismo "è" può essere definito tenendo in considerazione l'interazione con l'ambiente (66).

In tal senso un ruolo importante viene ad essere svolto dai metaboliti, composti a basso peso molecolare come acidi grassi, aminoacidi o zuccheri la cui concentrazione varia istante per istante, rappresentando una risposta ed una segnalazione in tempo reale in seguito a stimoli fisici, chimici, biologici, interni o esterni. La metabolomica quindi fornisce una descrizione attuale e non potenziale del funzionamento di un organismo, essendo i metaboliti i prodotti finali dell'espressione genica e della attività proteica. Perciò il metaboloma, l'insieme dei metaboliti di un organismo, valutato ad esempio sui fluidi biologici di un uomo ne riflette la storia, compresa l'età, il sesso, lo stile di vita lo stato nutrizionale, le interazioni con l'ambiente e i possibili stati patologici (67).

L'analisi metabolomica può essere effettuata sia *in vivo* sia *in vitro* utilizzando cellule, tessuti, organi o fluidi biologici quali siero, plasma, urine, fluido ascitico.

Considerando la suscettibilità del metaboloma a fattori esogeni è fondamentale che il metodo per la raccolta, la processazione e soprattutto la conservazione dei campioni biologici sia in grado di assicurare la stabilità a

lungo termine di una vasta gamma di metaboliti. Inoltre, considerando l'enorme variabilità del metaboloma è necessario affiancare la collezione dei campioni biologici con quella delle informazioni cliniche e non cliniche del paziente da studiare, quali patologia, diagnosi, sesso, età e stile di vita.

Tra le tecniche spettroscopiche di maggior utilizzo nell'analisi metabolomica vi sono la risonanza magnetica nucleare (RMN), principalmente con l'impiego della spettroscopia di RMN del protone ( $^1\text{H}$ ), e la spettrometria di massa (SM), in particolare accoppiata alla cromatografia liquida. Rispetto a quest'ultima la spettroscopia di RMN (MRS) è meno sensibile e più costosa, tuttavia è l'unica tecnica che non comporta la distruzione del campione da analizzare, permettendo quindi ulteriori analisi su di esso.

Il primo studio riguardante la spettro metabolico di cellule carcinomatose è stato effettuato nel 1973 da Block *et al.*, mentre nel 1978 una serie di esperimenti ha determinato la possibilità, da parte della RMN, di individuare alterazioni della cellula prima che queste fossero evidenti alla microscopia ottica. In particolare Muntford *et al.* dimostrarono i cambiamenti dello spettro metabolico di alcune cellule prima che queste alterazioni fossero evidenziabili istologicamente o citologicamente (68).

Il nucleo  $^1\text{H}$  è quello che meglio si presta ad essere utilizzato negli esperimenti di metabolomica, non solo per l'elevata abbondanza naturale, ma anche per la maggiore sensibilità rispetto agli altri nuclei, come  $^{31}\text{P}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Con la spettroscopia di RMN si possono ottenere informazioni da diversi tipi di campione, ad esempio da estratti cellulari o tissutali, con informazioni riguardanti i costituenti delle membrane, gli intermedi coinvolti nel bilancio energetico (ADP, ATP, lattato) o gli intermedi



catabolici ed anabolici dei fosfolipidi; oppure da cellule intatte, in questo caso l'analisi metabolomica può fornire una descrizione della compartimentazione dei metaboliti della cellula, esaminando equilibri osmotici e flussi metabolici.

Questo tipo di analisi può anche essere condotta *in vivo*, sebbene in questo caso vi siano difficoltà a causa della mancanza di sensibilità per l'uso di campi magnetici a potenza relativamente bassa e per la difficile localizzazione della zona interessata (69).

L'analisi metabolomica mediante  $^1\text{H}$  RMN richiede tecniche di analisi multivariata per estrarre relazioni statisticamente significative associate all'identificazione e quantificazione dei metaboliti, che possano essere tradotte in informazioni biologicamente rilevanti.

I dati sono generalmente strutturati in una matrice, le cui righe rappresentano i soggetti (cellule, organi, tessuti), e le cui colonne rappresentano le singole variabili (concentrazioni dei metaboliti, espresse in ppm). Essendo un problema ad alta complessità, visto l'elevato numero di variabili potenzialmente importanti, i metodi di analisi multivariata sono in grado di separare le informazioni utili alla risoluzione del problema dal "rumore" sperimentale e dalla informazione ridondante (caratteristica dei sistemi con variabili collegate), semplificando l'interpretazione del ruolo che le variabili hanno all'interno del sistema.

Uno specifico metodo per l'analisi non distruttiva di tessuti solidi, usato in questo studio, è la spettroscopia di RMN con High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS).

La HR – MAS NMR è una tecnica non distruttiva, che richiede una minima preparazione del campione e permette l'osservazione della maggior parte dei metaboliti usando solamente una minima quantità di tessuto (70). Siccome la composizione di un tessuto può essere estremamente eterogenea è comunque fondamentale assicurarsi che la regione d'interesse per la analisi sia stata sezionata da un chirurgo/patologo esperto. In seguito il campione deve essere immediatamente congelato a  $-80^{\circ}$  in modo da fermare qualsiasi attività enzimatica.

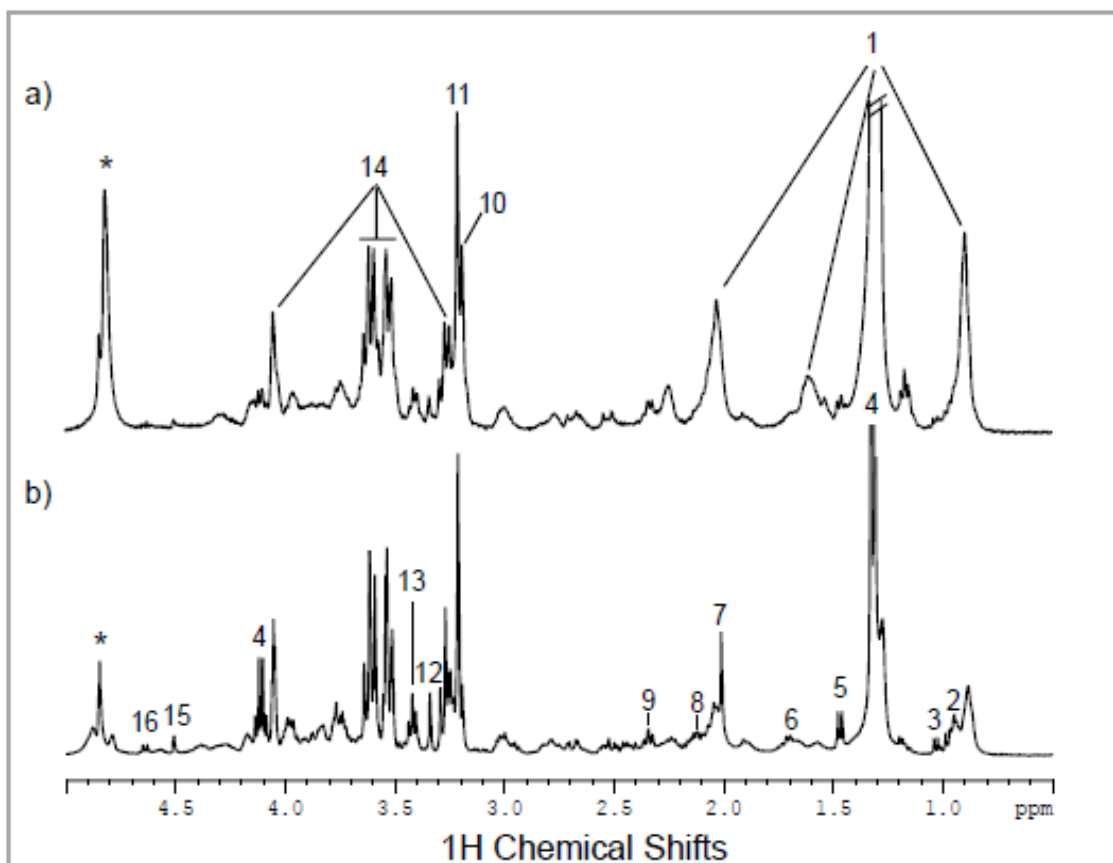
Il tempo per la preparazione del campione e per la acquisizione dei dati deve essere il più costante possibile e il campione deve essere accuratamente pesato per la successiva normalizzazione dei dati.

Generalmente anche la spettroscopia HR – MAS NMR si basa su nuclei di  $^1\text{H}$ , vista la naturale abbondanza di questi e il breve tempo di acquisizione. Un tipico spettro basato su  $^1\text{H}$  è mostrato nella **figura 8**.

Questo tipo di spettro è formato dai numerosi picchi derivanti da metaboliti a basso peso molecolare come zuccheri ed aminoacidi ed anche da metaboliti ad alto peso molecolare, come ad esempio differenti gruppi di lipidi, che appaiono come segnali con ampia larghezza d'onda. Queste ampie bande determinate da proteine e lipidi, insieme ai ripidi picchi di molecole a basso peso molecolare, vanno a formare lo spettro di risonanza magnetica su  $^1\text{H}$ .

L'identificazione dei picchi con i rispettivi metaboliti può essere ottenuta direttamente, tramite quindi la spettroscopia ad una dimensione, oppure con altre tecniche di editing dello spettro. La consultazione di database di profili metabolici può portare altre informazioni.

Spesso infatti la complessità dello spettro è troppo elevata per l'assegnazione dei picchi ai rispettivi metaboliti, richiedendo l'utilizzo ad esempio della spettroscopia a due dimensioni (TOCSY, HSQC) oppure, come menzionato precedentemente, di strumenti di analisi multivariata per l'identificazione di metaboliti statisticamente significativi per la differenziazione fra due profili metabolici



**Figura 8.** Spettro  $^1\text{H}$  HR-MAS derivato da (a) tessuto tiroideo sano e (b) neoplasia tiroidea (carcinoma papillare). *Assegnazione dei segnali:* 1, Acidi grassi; 2, Leucina e Isoleucina; 3, Valina; 4, Lattato; 5, Alanina; 6, Arginina e Lisina; 7, N-acylated composti; 8, Glutamina; 9, Glutammato; 10, Colina; 11, Fosfocolina e Glicerofosfocolina; 12, Scillo – Inositolo; 13, Taurina; 14, Mio - Inositolo; 15, Sconosciuto; 16,  $\beta$  - Glucosio; \*, acqua pre saturata.

## **5. Materiali e metodi**

Lo studio si compone di tre differenti parti. Inizialmente è stata testata l'efficienza dell'analisi metabolomica attraverso il confronto di biopsie chirurgiche ottenute da tessuto tiroideo sano e neoplastico, in modo da effettuare una prima discriminazione fra i profili metabolici.

In un secondo passaggio abbiamo focalizzato la nostra attenzione fra le differenze delle neoplasie maligne e benigne, con particolare riguardo per neoplasie a pattern follicolare, esaminando il potere predittivo dell'analisi metabolomica nella diagnosi.

Per ultimo, visto che lo scopo di questo progetto è di rendere questo tipo di analisi utilizzabile in clinica, abbiamo effettuato l'analisi metabolomica sul materiale cellulare ottenuto con l'agoaspirato. La popolazione studiata comprende 72 pazienti (47 donne e 25 uomini) con un nodulo solitario di dimensione compresa fra 1 e 8,5 cm. L'età media dei pazienti è di 42,8 anni. Le caratteristiche cliniche e patologiche sono riassunte nella tabella 6. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia totale presso il dipartimento di Endocrinochirurgia di Pisa. La diagnosi di questi pazienti era di neoplasia maligna (Tir 5) nel 39% dei casi (28 pazienti), di neoplasia indeterminata (Tir 3) nel 55,5% dei casi e di gozzo multinodulare (Tir 2) con sintomi compressivi nel 5,5%.

In seguito alla operazione chirurgica è stato esciso dal pezzo operatorio un campione del nodulo dal peso di circa 10 – 20 mg e un campione dal lobo controlaterale sano, entrambi sottoposti poi a analisi metabolomica tramite spettroscopia di risonanza magnetica. Il campione di controllo è stato ottenuto solo su 28 campioni dei 72 pazienti totali, nei rimanenti 44 è stato preso solo un campione dal nodulo tumorale. Tutti i campioni sono stati collocati in contenitori da 1,5 ml e immediatamente congelati tramite azoto liquido a -80°.

I corrispondenti pezzi operatori di tutti i pazienti sono stati fissati in formalina e incorporati in paraffina, quindi sezionati a 7  $\mu\text{m}$  e colorati con ematossilina ed eosina per la diagnosi istopatologica definitiva. Tutti i 72 casi inclusi nello studio sono stati quindi classificati istopatologicamente, secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Particolare attenzione è stata posta verso le neoplasie follicolari, in modo da individuare una eventuale invasione della capsula e/o dei vasi.

**Tabella 5.** Riassunto delle caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti

PAZIENTE	SESSO	ETA'	DIMENSIONE NODULO	ISTO	CITO	PAZIENTE	SESSO	ETA'	DIMENSIONE NODULO	ISTO	CITO
1	M	40	2.3	PTC	Thy5	37	F	47	1.8	PTC	Thy5
2	F	9	4.5	FTC	Tir3	38	F	32	6.0	FA	Thy3
3	F	41	2.0	GN	Thy2	39	M	59	5.0	FTC	Thy3
4	M	40	4.0	PTC	Thy5	40	M	36	6.5	FA	Thy3
5	F	46	1.8	FA	Thy3	41	F	33	4.0	FA	Thy3
6	F	88	7.0	PTC	Thy5	42	M	37	4.5	FA	Thy3
7	M	69	5.0	PTC	Thy5	43	F	10	2.3	FTC	Thy3
8	F	25	1.1	PTC	Thy5	44	F	80	7.0	AC	Thy5
9	M	55	3.2	FTC	Thy3	45	M	28	6.0	FA	Thy3
10	M	43	1.7	PTC	Thy5	46	M	40	2.2	FA	Thy3
11	F	40	3.5	PTC	Thy5	47	F	65	1.5	PTC	Thy5
12	M	60	2.6	PTC	Thy5	48	M	67	2.0	FA	Thy3
13	F	36	3.0	FTC	Thy3	49	F	53	2.0	FA	Thy3
14	F	42	1.5	PTC	Thy5	50	M	39	2.0	FA	Thy3
15	F	76	4.0	FA	Thy3	51	F	61	2.0	PTC	Thy5
16	F	45	2.5	FA	Thy3	52	M	62	2.5	FA	Thy3
17	F	42	1.3	PTC	Thy5	53	F	65	1.2	FA	Thy3
18	F	19	1.4	PTC	Thy5	54	F	28	2.5	FTC	Thy3
19	F	16	2.5	FTC	Thy3	55	M	31	2.5	FA	Thy3
20	M	50	2.5	FA	Thy3	56	M	34	4.5	FTC	Thy3
21	F	61	2.0	FA	Thy3	57	F	25	5.5	PTC	Thy5
22	M	35	8.0	PTC	Thy5	58	F	30	2.0	FA	Thy3
23	F	24	2.5	FA	Thy3	59	M	20	4.6	FA	Thy3
24	M	61	6.5	FA	Thy3	60	F	49	3.5	FTC	Thy3
25	F	13	7.5	FTC	Thy3	61	M	36	4.7	FA	Thy3
26	M	62	4.0	PTC	Thy5	62	F	34	3.8	FA	Thy3
27	M	17	2.5	FA	Thy3	63	F	38	4.0	PTC	Thy5
28	F	31	2.2	PTC	Thy5	64	F	55	2.1	GN	Thy2
29	F	27	2.5	FA	Thy3	65	F	37	4.0	FA	Thy3
30	F	19	2.0	GN	Thy2	66	F	52	2.0	FA	Thy3
31	F	28	1.7	PTC	Thy5	67	M	23	1.8	PTC	Thy5
32	F	77	4.3	FA	Thy3	68	F	28	2.5	GN	Thy2
33	F	39	1.3	PTC	Thy5	69	F	60	2.2	FA	Thy3
34	F	42	3.2	PTC	Thy5	70	F	43	3.1	PTC	Thy5
35	M	60	3.0	FA	Thy3	71	F	82	8.5	PTC	Thy5
36	F	39	1.5	PTC	Thy5	72	F	53	1.0	PTC	Thy5

*Legenda:* Isto, diagnosi istologica; Cito, diagnosi citologica; FA, adenoma follicolare; GN, gozzo multinodulare; PTC, carcinoma papillare tiroideo; FTC, carcinoma follicolare tiroideo; AC, carcinoma anaplastico.

### **Analisi metabolomica delle biopsie tiroidee e analisi dei dati**

Per prima cosa i campioni sono stati scongelati, per essere quindi analizzati attraverso la spettroscopia HR-MAS RMN. Ad ogni campione sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di D<sub>2</sub>O, immediatamente prima delle analisi. L'ossido di deuterio è utilizzato nella RMN quando il solvente interessato è l'acqua ed il nuclide interessato è l'idrogeno (<sup>1</sup>H NMR). Ciò avviene in quanto il segnale dell'acqua normale interferirebbe con il segnale della molecola in esame. Il deuterio ha, infatti, un momento magnetico diverso da quello dell'idrogeno e non contribuisce al segnale complessivo della RMN alla frequenza di risonanza dell'idrogeno. Per studiare e discriminare i campioni secondo il rispettivo tipo tissutale è stata applicata ai dati ottenuti dalla spettroscopia RMN l'analisi dei componenti principali (PCA) e il metodo dei minimi quadrati parziali (OPLS).

### **Analisi metabolomica degli agoaspirati**

Per verificare l'efficacia di quest'approccio verso cellule derivanti da agoaspirato, 9 campioni ottenuti *ex vivo* sono stati analizzati. In questa popolazione di pazienti l'indicazione alla chirurgia era data da una diagnosi preoperatoria di “diagnosi di malignità” (Tir 5) in 4 pazienti, “indeterminata” (Tir 3) in 4 pazienti e “citologia non neoplastica” (Tir 2) in 1 paziente. Il materiale è stato ottenuto *ex vivo* effettuando una aspirazione con ago sottile nei 30 minuti dopo la chirurgia dai pezzi operatori ottenuti in seguito a tiroidectomie o lobectomie. La procedura consiste nell'inserire un ago di 22 gauge, attaccato ad una siringa di 5 ml, nel nodulo da esaminare e quindi aspirare. Una volta rimosso l'ago parte del materiale aspirato viene spruzzato su vetrini e quindi colorato con colorazione di Papanicolau, in modo da ottenere una verifica rapida dell'adeguatezza del campione.

## 6. Risultati

### Analisi citologica ed istologica dei campioni

Per prima cosa il risultato degli agoaspirati è stato confrontato con la diagnosi ottenuta tramite esame istologico definitivo. All'esame istologico 27 dei 28 casi classificati con una diagnosi di malignità sono stati diagnosticati come carcinoma papillare, il caso rimanente è stato classificato come carcinoma anaplastico. Per quanto riguarda le neoplasie indeterminate 30 dei 40 casi sono stati diagnosticati come adenoma follicolare e 10 come carcinoma follicolare della tiroide.

Tutti i casi diagnosticati come non neoplastici dall'esame citologico dell'agoaspirato sono stati confermati come gozzi multinodulari (Tabella 7)

**Tabella 7.**

Esame citologico	Esame istologico definitivo				
	FA	GMN	PTC	FTC	AC
Non neoplastico (n=4)		4			
Indeterminato (n=40)	30			10	
Maligno (n=28)			27		1
Casi totali (n=72)	30	4	27	10	1

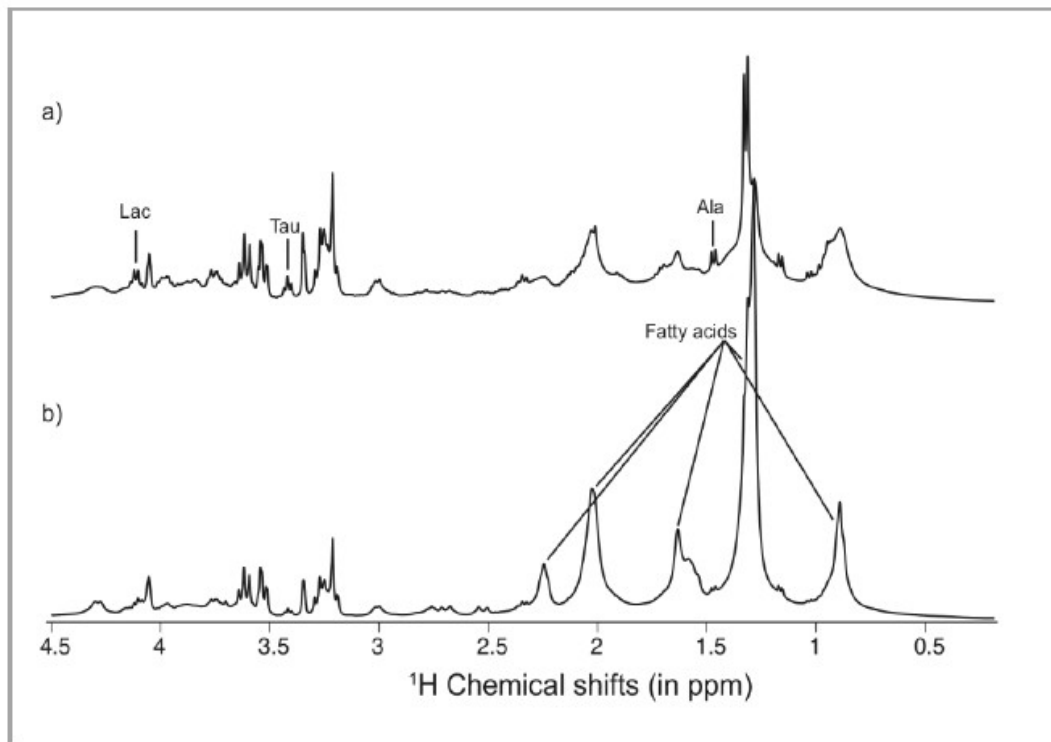
*Legenda:* FA, adenoma follicolare; GMN, gozzo multinodulare; PTC, carcinoma papillare tiroideo; FTC, carcinoma follicolare tiroideo; AC, carcinoma anaplastico.



## Confronto fra tessuto tiroideo neoplastico e tessuto tiroideo sano

Per verificare quindi le differenze metaboliche fra tessuto tiroideo neoplastico e tessuto tiroideo sano, sono stati confrontati i 28 campioni di tessuto neoplastico e i 28 campioni ottenuti dal lobo controlaterale sano.

Gli spettri metabolici (dati normalizzati) del tessuto tiroideo sano e neoplastico sono rappresentati in figura 9a e 9b. L'assegnazione di tutti i metaboliti individuati è riportata nella tabella 6.



**Figura 9.** Comparazione fra gli spettri metabolici da tessuto sano (b) e neoplastico (a)

**Tabella 6.** Assegnazione dei segnali ai metaboliti corrispondenti

<b>Composto</b>	<b><sup>1</sup>H chemical shift (in ppm)</b>	<b>Molteplicità</b>	<b>Assegnazione</b>
Alanina	3,77	-	CH
	1,47	d	CH3
Ascorbato	4,51	-	CH
	4,02	-	CH
	3,74	m	2xCH2
Arginina	3,78	-	CH
	3,23	-	Delta CH2
	1,91	m	BetaCH2
	1,68	m	GammaCH2
Colina	3,19	s	CH3
Citrato	2,68	d	CH2 (i)
	2,53	d	CH2 (ii)
Etanolammina	3,82	dd	CH2OH
	3,14	m	CH2NH2
Formiato	8,44	s	CH
Glutammina	3,77	-	alfaCH
	2,44	m	gammaCH2
	2,13	m	betaCH2
Glutammato	3,76	-	aplhaCH2
	2,34	dt	GammaCH2
	2,07	m	betaCH2
Lattato	4,12	q	CH3
	1,32	d	CH
Leucina	3,73	-	alfaCH
	2,06	m	CH2 e gamma CH
	0,96	d	CH3 terminale
Acidi grassi	2,25	ampia	CH2CO
	2,03	ampia	
	1,58	ampia	

	0,89	ampia	CH3CH2
Lisina	3,78	-	AlfaCH
	3,03	m	epsilonCH3
	1,9	m	betaCH2
	1,72	m	deltaCH2
	1,46	m	gammaCH2
Metionina	3,86	dd	AlfaCH
	2,63	m	SCH2
	2,15	m	betaCH2
	4,06	m	H2
	3,62	m	H4, H6
	3,54	m	H1, H3
	3,27	t	H5
Fenilalanina	7,4	m	H3, H5
	7,37	m	H4
	7,31	m	H2, H6
Fosforil/ Glicerofosfo- colina	7,4	s	CH3
Prolina	4,13	dd	alfaCH
	3,41	-	half deltaCH2
	3,34	-	half deltaCH2
	2,35	-	half betaCH2
	2	-	gammaCH2
Scillo- Inositolo	3,34	s	
Serina	3,97	-	beta CH2
	3,84	-	alfaCH
Treonina	4,25	dd	betaCH
	3,6	-	alfaCh
	1,32	d	CH3
Tirosina	7,17	d	oCH
	6,88	d	mCH

	3,99	-	CH
	3,22	-	CH2 (i)
	3,07	-	CH2 (ii)
Acidi grassi insaturi	5,32	ampia	CH=CH
	2,03	ampia	CH2-CH=
	1,3	ampia	CH2
Acidi grassi insaturi	5,32	ampia	CH=CH
	2,79	ampia	CH2
Uracile	7,52	-	H6
	5,78	-	H5
Valina	3,62	-	alfaCH2
	2,27	m	betaCH
	1,03	d	Gamma CH3
	0,99	d	Gamma CH3
Sconosciuto	3,86	-	
	3,35	-	
	2,65	-	

Differenze del profilo metabolico fra tessuto tiroideo sano e neoplastico sono facilmente osservabili, in particolare è evidenziabile un aumentato livello di acidi grassi (saturi ed insaturi) ed una diminuzione di aminoacidi e di colina nel campione di tessuto sano rispetto al campione tumorale.

Tuttavia, considerando la variabilità biologica dei pazienti, è necessaria l'analisi statistica di tutto lo spettro in modo da identificare i metaboliti statisticamente significativi per la discriminazione fra i diversi tessuti.

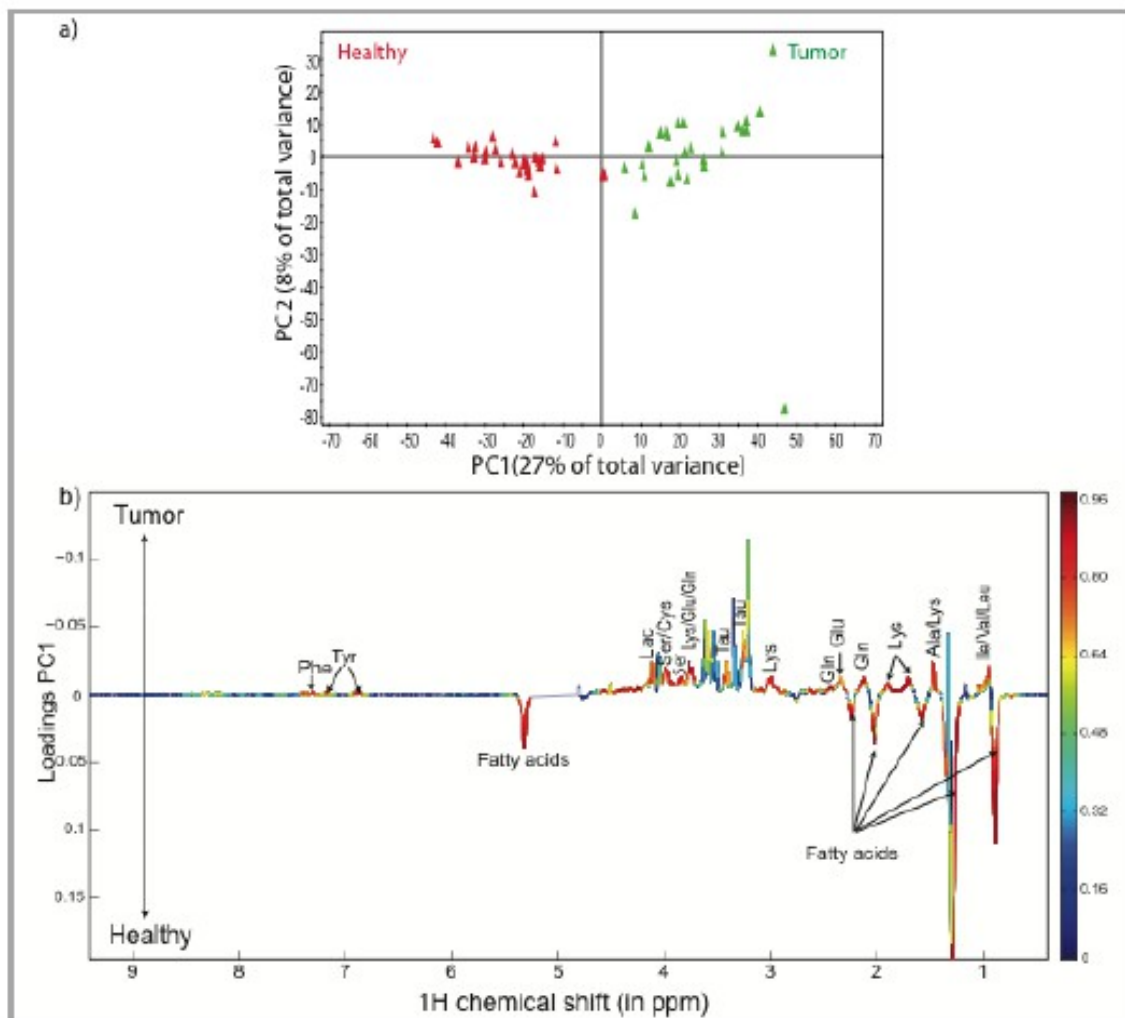
Di conseguenza è stata effettuata l'analisi dei componenti principali (PCA), basata sulla matrice di correlazione, sui tessuti tumorali e sulle rispettive controparti sane dei 28 pazienti. I due estremi nel gruppo tumorale (uno dei quali sospetto di errata diagnosi) sono stati scartati con la rispettiva controparte non neoplastica.

Una seconda analisi dei componenti principali è stata quindi effettuata sui campioni presi dai rimanenti 26 pazienti.

Una chiara differenza fra i due tipi di tessuto è osservabile lungo l'asse PC1.

L'analisi di PC1 mostra le differenze fra i due gruppi, evidenziando una maggiore concentrazione di diversi aminoacidi (fenilalanina, tirosina, serina, lisina, taurina, acido glutammico, alanina, isoleucina, leucina e valina) e di lattato ed una minore concentrazione di acidi grassi saturi ed insaturi nei campioni tumorali rispetto alla controparte non neoplastica.

Si può notare inoltre che, lungo l'asse PC2, un campione appartenente al gruppo dei carcinomi papillari tiroidei è isolato rispetto agli altri. Questo campione, che non può essere considerato un estremo, a causa della sua distanza dal valore medio, presenta un originale profilo metabolico, con un minore contenuto di lattato e una più elevata concentrazione di mioinositolo.



**Figura 10.** (a) Score plot dell'analisi dei componenti principali che illustra le differenze metaboliche fra tessuto tiroideo neoplastico e la rispettiva controparte sana.

## **Confronto fra tessuto neoplastico benigno e maligno**

Lo scopo del secondo step di questo studio è stato la verifica dell'efficienza dell'analisi metabolomica nel discriminare le neoplasie maligne da quelle benigne.

Per verificare ciò sono stati indipendentemente analizzati i 72 campioni.

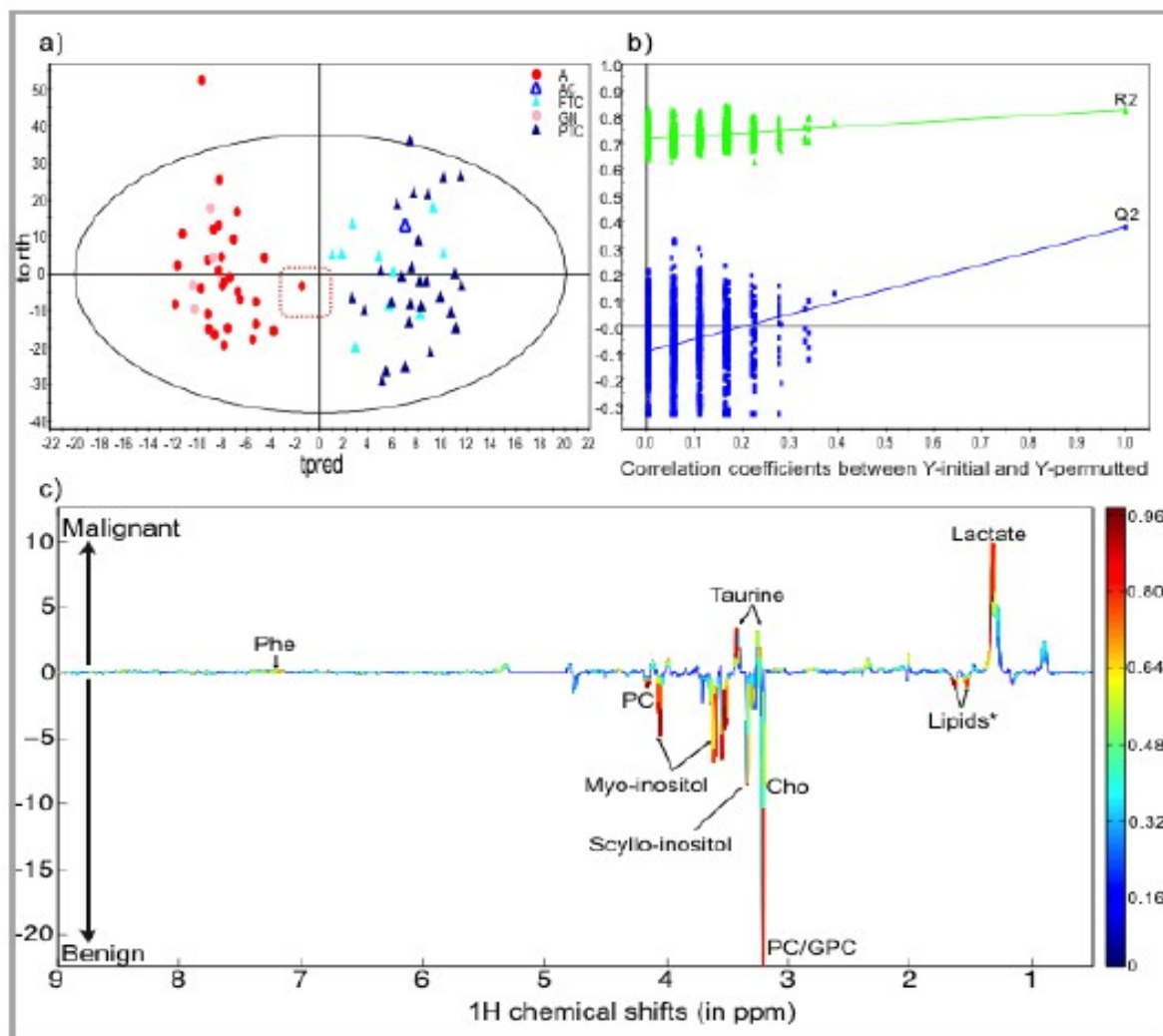
Tuttavia in questo caso non vi è una netta differenza fra i profili metabolici e neanche l'analisi dei componenti principali (PCA) è stata in grado di produrre una netta discriminazione fra i campioni.

Si è quindi rivelato necessario l'uso di ulteriori analisi statistiche per differenziare le neoplasie benigne (adenoma follicolare e gozzo multinodulare, n=34) da quelle maligne (carcinoma papillare, carcinoma follicolare ed anaplastico, n=38).

Lo score plot ottenuto mediante regressione parziale dei minimi quadrati (OPLS - DA) ha rilevato un aumento significativo di lattato e taurina ed una diminuzione di colina, fosfocolina, mioinositolo e scilloinositolo nei campioni provenienti da neoplasie maligne.

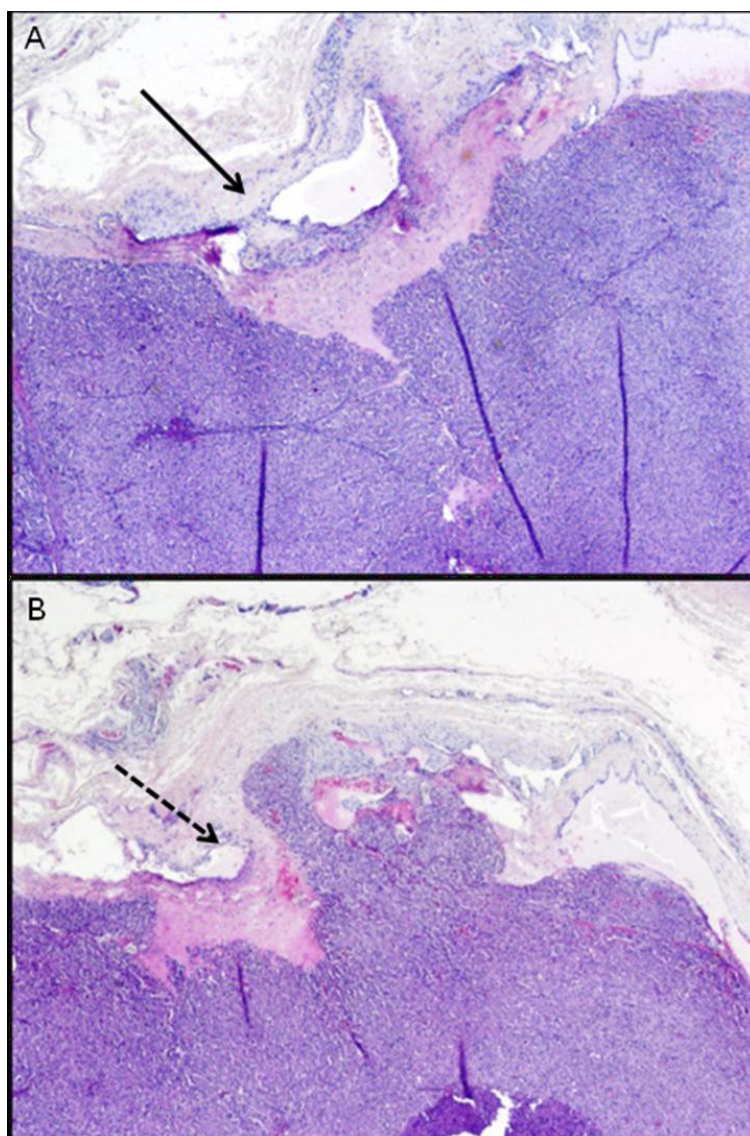
Un caso interessante è illustrato in figura 14. Questo campione era stato citologicamente classificato come indeterminato (Tir 3) ed istologicamente come adenoma follicolare (quindi come benigno). Tuttavia presentava un profilo metabolico alterato, come è osservabile dalla sua posizione nella figura 11. A causa di questa discrepanza è stato condotto un esame istologico più approfondito, analizzando più sezioni del nodulo, che ha infine mostrato la presenza di invasione capsulare da parte del tumore, classificando quindi il campione come carcinoma.

Considerando comunque la totalità dei campioni, emerge che la diagnosi definitiva è stata correttamente predetta dall'analisi metabolomica nel 77% dei casi.



**Figura 11.** (a) OPLS-DA score plot che illustra la discriminazione fra tessuto neoplastico maligno e benigno della tiroide *Abbreviazioni:* A = adenoma, AC = carcinoma anaplastico, FTC = carcinoma follicolare tiroideo, GN = gozzo multinodulare, PTC = carcinoma papillare tiroideo; Cho = Colina, PC = Fosforilcolina, GPC = glicerofosfocolina, Phe = fenilalanina, \* = assegnazione provvisoria.





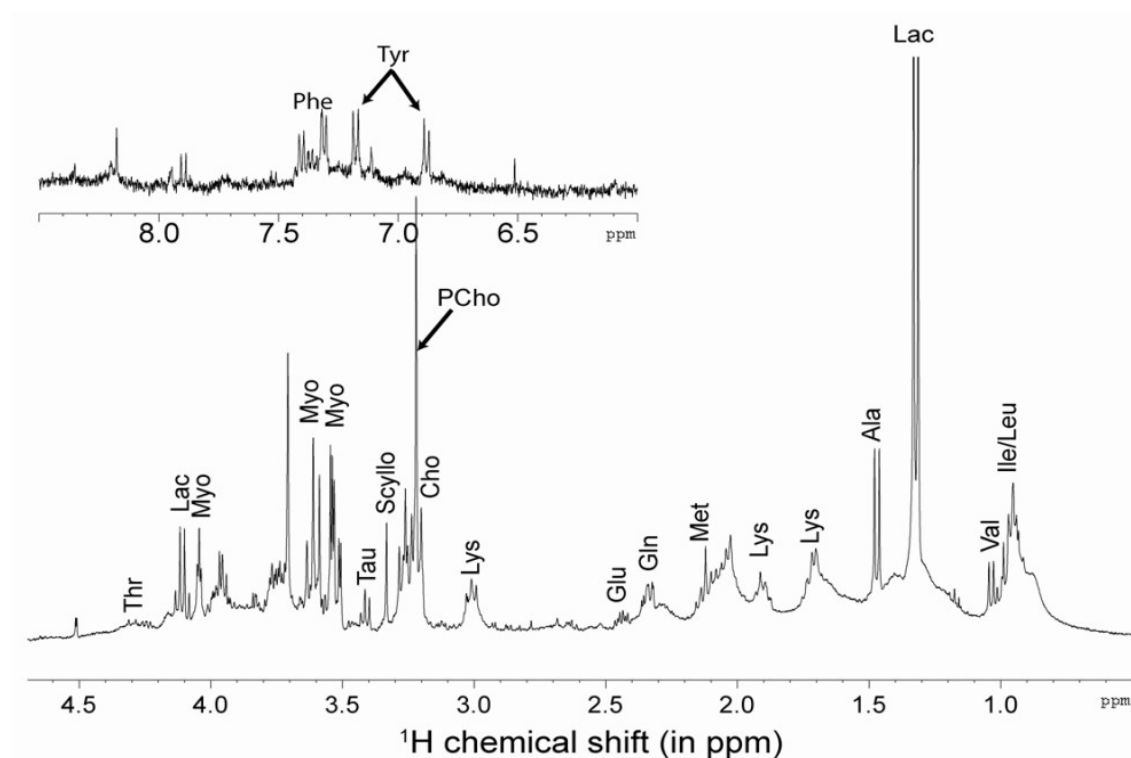
**Figura 12:** Immagine microscopica (colorata con ematossilina ed eosina) della neoplasia follicolare diagnosticata preoperativamente come indeterminata .

A) Prima valutazione istologica che mostra una spessa, ma intatta capsula intorno al nodulo, portando alla diagnosi di adenoma follicolare.

B) Dopo numerosi sezioni, la neoplasie mostra la presenza di invasione capsulare, cambiando la diagnosi in carcinoma follicolare.

## Analisi metabolomica degli agoaspirati

I test preliminari effettuati su 12 agoaspirati ottenuti *ex vivo* da pezzi operatori hanno confermato la possibilità e l'adeguatezza del metodo anche per campioni citologici. Come mostrato in figura 13, lo spettro ottenuto da campioni citologici *ex vivo* è molto simile a quello ottenuto dalla biopsie chirurgiche, in particolare analizzando la concentrazione di alcuni aminoacidi (taurina, isoleucina, leucina) e di lattato.



**Figura 13.** Spettro ottenuto tramite <sup>1</sup>H HR-MAS NMR da materiale citologico ottenuto tramite aspirazione con ago sottile (carcinoma papillare tiroideo). Abbreviazioni: Thr, Tironina; Lac, Lattato; Myo, Mioinositolo; Tau, Taurina; Scyllo, Scilloinositolo; PCho, Fosfocolina; Cho, Colina; Lys, Lisina; Glu, acido Glutamico; Gln, Glutammina; Met, Metionina; Ala, Alanina; Val, Valina; Ile/Leu, Leucina e Isoleucina; Phe, Fenilalanina; Tyr, Tirosina.

## 7. Discussione

In questo studio abbiamo per prima cosa analizzato le differenze metaboliche fra neoplasie tiroidee (benigne e maligne) e tessuto tiroideo sano. Come esposto precedentemente la differenziazione fra tessuto tiroideo neoplastico e la rispettiva controparte sana si basa sulla maggiore concentrazione di numerosi aminoacidi e di lattato e su una minore concentrazione di acidi grassi. Questi dati sono in linea con i precedenti dati ottenuti da Russel *et al.* (71).

In generale, il metabolismo degli acidi grassi sostiene i requisiti biosintetici e bioenergetici per la proliferazione e la sopravvivenza della cellula. Gli acidi grassi possono essere infatti convertiti in trigliceridi per l'immagazzinamento o in fosfolipidi per la formazione di membrane oppure ossidati in CO<sub>2</sub> per la produzione di energia. Nelle cellule proliferanti gli acidi grassi sono quindi indirizzati verso la sintesi di lipidi, che contribuiranno poi alla formazione delle membrane cellulari. Inoltre il consumo di acidi grassi attraverso la beta – ossidazione può sostenere la sopravvivenza cellulare quando il metabolismo glucidico è limitato. Possiamo quindi dedurre che il basso livello di lipidi osservato nelle neoplasie sia da correlarsi ad un maggiore turnover metabolico e ad una aumentata richiesta nella biosintesi di membrane.

Successivamente l'obiettivo è stato quello di valutare le differenze metaboliche fra neoplasie benigne e maligne. Lo score plot ottenuto mediante regressione parziale dei minimi quadrati (OPLSDA) mostra una significativa differenza fra tessuto maligno e benigno, con un valore di *p* di  $4 \cdot 10^{-4}$ .

In particolare un aumento di lattato e di taurina ed una diminuzione di composti contenenti colina e di mioinositolo e scilloinositolo sono evidenziabili nelle lesioni maligne.

Il significativo incremento di lattato nelle cellule carcinomatose è stato riportato in numerosi studi, segno probabilmente di un aumentato metabolismo anaerobico dovuto all'ipossia e all'ischemia, oppure come conseguenza del cosiddetto "Warburg effect".

L'aumento di taurina, in associazione alla diminuzione di mioinositolo e scilloinositolo può riflettere uno sbilanciamento osmolare delle cellule tumorali.

Un'altra categoria di composti che si presenta alterata nel tessuto tumorale è quella rappresentata dai composti contenenti colina, come la fosforilcolina, la fosfatidilcolina o la glicerofosfocolina, tutti importanti precursori dei costituenti delle membrane cellulari. Queste alterazioni metaboliche associate ad una patologia tumorale possono essere causate da un aumentato tasso del metabolismo dei fosfolipidi e dalla maggiore velocità di replicazione delle cellule tumorali rispetto ad altri tessuti. La crescita e la diffusione di molti tumori sono scatenate da cambiamenti del metabolismo delle membrane, che può portare ad alterazioni del livello sistemico di fosfolipidi. Precedentemente Raffelt *et al.* (72) hanno evidenziato un alterato metabolismo dei fosfolipidi nei pazienti con carcinoma tiroideo. In un altro studio gli autori hanno ipotizzato che i differenti livelli di fosfolipidi potessero differenziare fra residui tiroidei sani e residui di tumore tiroideo o metastasi. I dati mostrano infatti che il livello medio di sfingomielina e fosfatidilcolina sono significativamente più bassi in pazienti con carcinoma metastatico tiroideo rispetto ai pazienti in remissione.

Concludendo, in questo studio l'analisi metabolomica ha portato alla corretta identificazione de 77% dei campioni analizzati. Confrontando questo dato con altre tecniche di genomica e proteomica precedentemente illustrate, questo metodo sembra avere minore potere predittivo.

Considerando però il ridotto numero di casi analizzati, l'analisi metabolomica attraverso la spettroscopia di risonanza magnetica mostra comunque avere un buon valore predittivo nel differenziare neoplasie maligne e benigne.

Inoltre gli studi preliminari su agoaspirati *ex vivo* hanno mostrato risultati simili a quelli osservati utilizzando biopsie chirurgiche, evidenziando la validità dell'analisi metabolomica sulle cellule ottenute mediante agoaspirato.

Sebbene quindi da una parte questo modello debba essere ridefinito aumentando il numero di dati, la conferma di questo metodo come aiuto al patologo per la diagnosi preoperatoria delle neoplasie indeterminate può essere ottenuta solo spostando l'analisi su agoaspirati *in vivo*. Se questo metodo dovesse quindi rivelarsi adatto, potrebbe potenzialmente ridurre il numero di pazienti operati per le neoplasie indeterminate della tiroide.

## Bibliografia

1. Hodgson NC, Button J, Solorzano CC. Thyroid cancer: is the incidence still increasing? *Ann Surg Oncol* 2004;11(12):1093-1097.
2. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328(8):553-559.
3. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med* 2005;142(11):926-931.
4. Raphael SJ. The meanings of markers: ancillary techniques in diagnosis of thyroid neoplasia. *Endocr Pathol* 2002;13(4):301-311.
5. Krause K, Jessnitzer B, Fuhrer D. Proteomics in thyroid tumor research. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8):2717-2724.
6. Matson GB, Weiner MW. Spectroscopy. In: Stark DD, Bradley WG, editors. *Magnetic resonance imaging*. St. Louis: CV Mosby; 1991. pp 438-478.
7. Lean CL, Delbridge L, Russell P, et al. Diagnosis of follicular thyroid lesions by proton magnetic resonance on fine needle biopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(4):1306-1311.
8. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/)
9. Chung-Che Charles Wang, Lyssa Friedman, Giulia C. Kennedy, Hui Wang, Electron Kebebew. A Large Multicenter Correlation Study of Thyroid Nodule Cytopathology and Histopathology. *Thyroid*. 2011 March; 21(3): 243–251.
10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
11. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
12. Spitz, M, Sider, J, Katz, R, et al. Ethnic patterns of thyroid cancer incidence in the United States; 1973-1981. *Int J Cancer* 1988;42:549.
13. Leenhardt L, Grosclaude P, Chérié-Challine L; Thyroid Cancer Committee. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid

- nodule management effects? *Report from the French Thyroid Cancer Committee. Thyroid 2004;14(12):1056-1060.*
14. Kent WD, Hall SF, Isotalo PA, et al. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ 2007;177:1357–1361.*
  15. Zhang Y, Zhu Y, Risch HA. Changing incidence of thyroid cancer. *JAMA 2006;296:1350.*
  16. Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst 2005;97(19):1407-27*
  17. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Powell J, Teppo L. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication 155, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2003; *Volume VIII*
  18. Franceschi S, Boyle P, Maissonneuve P, La Vecchia C, Burt AD, Kerr DJ, MacFarlane GJ. The epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog 1993;4(1):25-52*
  19. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin 1998;48(6):329*
  20. Belfiore A, La Rosa G, La Porta G, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C, Vigneri R. Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age and multinodularity. *Am J Med 1992;93(4):363-9*
  21. Malchoff CD, Malchoff DM. Familial papillary thyroid carcinoma. *Cancer Treat Res 2004;122:381-7*
  22. Li Volsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, Baloch ZW, Sobrinho-Simoes M, Wenig B, DeLellis RA, Cady B, Mazzaferri EL, Hay I, Fagin JA, Weber AL, Caruso P. Papillary carcinoma. In: *Tumours of Endocrine Organs, World Health Organization Classification of Tumors. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU and Eng C. 2004;57-66*
  23. Harach HR, Williams GT, Williams ED. Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm.

*Histopathology 1994;25(6):549-61*

24. Farbota LM, Calandra DB, Lawrence AM, Paloyan E. Thyroid carcinoma in Graves'disease. *Surgery 1985;98(6):1148-53*
25. Pacini F, Elisei R, Di Coscio GC, Anelli S, Macchia E, Concetti R, Miccoli P, Organini M, Pinchera A. Thyroid carcinoma in thyrotoxic patients treated by surgery. *J Endocrinol Invest 1988;11(2):107-12*
26. 18. Segal K, Ben-Bassat M, Avrahm A, Har-El G, Sidi J. Hashimoto's thyroiditis and carcinoma of the thyroid gland. *Int Surg 1985;70(3):205-9*
27. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with cronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med 1985;312(10):601-4*
28. Goodman MT, Kolonel LN, Wilkens LR. The association of body size, reproductive factors and thyroid cancer. *Br J Cancer 1992;66(6):1180-4*
29. Ron E, Lunenfeld B, Menczer J, Blumstein T, Katz L, Oelsner G, Serr D. Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol 1987;125(5):789-90*
30. Dal Maso L, La Vecchia C, Franceschi S, Preston-Martin S, Ron E, Levi F, Mack W, Mark SD, McTiernan A, Kolonel L, Mabuchi K, Jin F, Wingren G, Galanti MR. A pooled analysis of thyroid cancer studies. Anthropometric factors. *Cancer Causes Control 2000;11(2):137-44*
31. De Lellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al., eds World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press; 2004
32. Pita JM, Banito A, Cavaco BM, et al. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *Br J cancer 2009; 101(10): 1782-1791.*
33. DeLellis RA. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol 2006;15;94(8).662-669.*
34. Lang W, Georgii A, Stauch G, et al. The differentiation of atypical adenomas and encapsulated follicular carcinoma in the thyroid gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1980;385(2):125-14.*
35. Lindsay S. Carcinoma of the thyroid gland: a clinical and pathologic study of 293 patients at the university of California Hospital. Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1960.



36. Quayle FJ, Moley JF (2005). "Medullary thyroid carcinoma: including MEN 2A and MEN 2B syndromes". *J Surg Oncol* **89** (3): 122–9.
37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, and Mitchel RN, "Robbins basic Pathology", Saunders, 8th ed., 200
38. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base Report on 53856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer* 1998;*83*(12):2638-2648
39. Shaha AR, Loree TR, Shah JP. Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1995; 118(6):1131-36
40. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, et al. Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: Initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* 1998;*8*(5):1012-102
41. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual, 6 th edition. *Thyroid*. New York, Springer-Verlag 2002;77-87
42. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. The American Thyroid Association Guidelines Task Force. *Thyroid* 2006;*16*(2):1-33
43. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR. Thyroid incidentalomas: prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994;*154*:1838-1840.
44. Pacini F , Fontanelli M, Fugazzola L, Elisei R, Romei C, Di Coscio G, Miccoli P, Pinchera A. Routine Measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;*78*:826-29
45. Eun-Kyung Kim, Cheong Soo Park, Woung Youn Chung, et al. New sonographic criteria for recommendig fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *Am J Roentgenol* 2002;*178*:687-691
46. Hamming JF, Goslings BM, van Steenis GJ, van Ravenswaay Claasen H, Hermans J, van de Velde CJ. The value of fine-needle aspiration biopsy in patients with nodular thyroid disease divided into groups of suspicion of malignat neoplasms on clinical grounds. *Arch Intern Med* 1990;*150*:113-1088.
47. SIAPEC-IAP- Gdl. Consenso italiano sulla gestione clinica del paziente con

patologia nodulare tiroidea, 2007. Available at:  
<http://www.citologia.novilab.it/docs/NoduloTiroideo-Citologia.pdf>.

48. Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnson DA, Ordonez NG. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: A retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 714-720
49. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos T, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, BMcIver S I, Sherman RM. Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce *Thyroid* 2006; 16:1-33
50. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": A gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002; 26: 41-44
51. Shaha AR, Jaffe BM. Completion thyroidectomy: a critical appraisal. *Surgery* 1992;112:1148-1152;
52. Cohen JI, Clayman GL. "Atlas of head & neck surgery", Elsevier Saunder 2011.
53. Miccoli P, Berti P, Materazzi G, Minuto M, Barellini L. Minimally invasive video-assisted thyroidectomy: five years of experience. *J Am Coll Surg* 2004;199:243-248
54. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos T. Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *The American Thyroid Association Guidelines Taskforce Thyroid* 2006;16:1-33
55. Goldstein RE, Netterville JL. Implications of follicular neoplasms, atypia, and lesions suspicious for malignancy diagnosed by fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Ann Surg* 2002; 235: 656-662; discussion 662-664
56. C. Gopalakrishnan Nair, Misha J. C. Babu, Riju Menon, Pradeep Jacob. Hypocalcaemia following total thyroidectomy: An analysis of 806 patients. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013 Mar-Apr; 17(2): 298–303.
57. Herrmann ME, LiVolsi VA, Pasha TL, et al. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:710-713.
58. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of

- human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:3015–3020.
59. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, et al.. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol* 2008;9:543–549
  60. Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, et al. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2005;18:48–57.
  61. Torregrossa L, Faviana P, Filice ME, et al. CXC chemokine receptor 4 immunodetection in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: comparison to galectin-3 and hector battifora mesothelial cell-1. *Thyroid* 2010;20(5):495-504.
  62. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):245-62. Review
  63. Nikiforova MN, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002;26(8):1016-23
  64. Sahin M, McIver B. PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPAR gamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(1):463-8
  65. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, II, Tallini G, Kroll TG & Nikiforov YE. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2318-2326
  66. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (November 1999). "'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data". *Xenobiotica* 29 (11): 1181–9.
  67. Teresa Whei-Mei., Richard M. Higashi, and Andrew N. Lane. *The Handbook of Metabolomics*. New York: Humana, 2012. 34-35.
  68. Mountford CE, Grossman G, Reid G, et al. Characterization of transformed cells

- and tumor by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 1982;42(6):2270-6
69. Robinson SP, Barton SJ, McSheehy PM, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of cancer. *Br J Radiol* 1997;70 Spec No:S60-90
70. Eldrid Borgan, Beathe Sitter, Ole Christian Lingjærd et al. Merging transcriptomics and metabolomics - advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer*. 2010; 10: 628.
71. Russel P, Lean CL, Delbridge L, et al. Proton magnetic resonance and thyroid neoplasia. I: Discrimination between benign and malignant neoplasms. *Am J Med* 1994;96(4):383-388.
72. Raffelt K, Moka D, Sullentrop F, et al. Systemic alteration in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in-vitro P-31 high resolution NMR study. *NMR in Biomedicine* 2000;13(1):8-13.