



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Medicina DIMED

---

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CLINICHE E SPERIMENTALI

CURRICOLO METODOLOGIA CLINICA E MEDICINA DELL'ESERCIZIO,  
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE, DIABETOLOGICHE E NEFROLOGICHE

CICLO XXXI

***Caratteristiche clinico molecolari dei carcinomi  
tiroidei differenziati ad alto rischio***

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Paolo Angeli

**Supervisore:** Prof.ssa Caterina Mian

**Correlatori:** Dr.ssa Susi Barollo

Dr. Loris Bertazza

**Dottorando:** Dr.ssa Sara Watutantrige Fernando

Anno Accademico: 2017/2018



# Sommario

1. Riassunto.....	1
2. Introduzione .....	5
2.1 Epidemiologia .....	5
2.1.1 Epidemiologia descrittiva .....	5
2.1.2 Fattori di rischio .....	5
2.2 Anatomia patologica .....	9
2.2.1 Carcinoma papillare della tiroide.....	9
2.2.2 Carcinoma follicolare della tiroide.....	10
2.3 Diagnosi .....	11
2.3.1 Semeiotica.....	11
2.3.2 Esami ematochimici.....	11
2.3.3 Ecografia.....	12
2.3.4 Elastosonografia tiroidea.....	13
2.3.5 Scintigrafia con radionuclidi .....	13
2.3.6 18-FDG PET .....	13
2.3.7 Agoaspirato .....	14
2.4 Stadiazione e Prognosi .....	16
2.4.1 Sistemi di stadiazione.....	16
2.4.2 Stratificazione del rischio di recidiva e mortalità .....	19
2.5 Trattamento .....	21
2.5.1 Chirurgia .....	21
2.5.2 Ormonoterapia. ....	22
2.5.3 Valutazione post-operatoria .....	22
2.5.4 Terapia radiometabolica.....	23
2.5.5. Altre terapie .....	24
2.5.6. Sorveglianza attiva.....	25
2.5.7 Follow-Up.....	25
2.6 Patogenesi molecolare dei carcinomi differenziati .....	28
2.6.1 Via MAPK/ERK .....	28
2.6.2 Via di segnale di PI3K-Akt.....	29
2.6.3 BRAF.....	30
2.6.4 RAS.....	31
2.6.5. hTERT.....	32
2.6.6 PTEN.....	33
2.6.7 PI3KCA.....	34

2.6.8 RET .....	34
2.6.9 PAX8/PPAR $\gamma$ .....	35
2.6.10 TP53 .....	36
3. Scopo della tesi .....	38
4. Materiali e Metodi .....	39
4.1 Pazienti studiati .....	39
4.2 Analisi molecolare .....	39
4.2.1 Estrazione di DNA .....	39
4.2.2 Determinazione della concentrazione di DNA .....	39
4.2.3. Amplificazione del DNA .....	40
4.2.4 Purificazione dei prodotti della PCR .....	41
4.2.5 PCR di sequenza e successiva purificazione .....	41
4.3 Analisi Statistica .....	41
5. Risultati .....	43
5.1 Caratterizzazione clinico-molecolare dei casi di DTC ad alto rischio dell'adulto ..	43
5.1.1. Caratterizzazione clinica .....	43
5.1.2 Caratterizzazione molecolare .....	48
5.1.3 Correlazione tra caratteristiche cliniche e molecolari. ....	51
5.2 Confronto tra casi e controlli .....	52
5.2.1 Caratterizzazione clinica .....	52
5.2.2 Confronto tra le caratteristiche molecolari tra i DTC ad alto e basso rischio. .	56
6. Discussione e conclusioni .....	58
7. Bibliografia .....	66

## 1. Riassunto

**Presupposti dello studio:** Alcuni pazienti affetti da carcinoma differenziato tiroideo (DTC) esitano in persistenza o decesso. Una maggiore definizione delle caratteristiche clinico-molecolari potrebbe consentire un miglior inquadramento diagnostico e l'esecuzione di una terapia individualizzata.

**Scopo dello studio:** 1) caratterizzazione clinica dei casi dei DTC ad alto rischio dell'adulto; 2) caratterizzazione molecolare (BRAF, RAS, TP53, PTEN, PIK3CA e di TERT promotore) nei DTC ad alto rischio dell'adulto; 3) correlazione tra gli aspetti clinico/molecolari; 4) confronto tra il profilo clinico/molecolare dei DTC ad alto rischio con quelli a basso rischio.

**Materiali e metodi:** Abbiamo studiato 119 pazienti con tumore ad alto rischio (dimensione maggiore >40mm e/o metastasi a distanza), sottoposti a intervento chirurgico per DTC tra il 2007 e il 2016. Le caratteristiche clinico/molecolari dei pazienti sono state confrontate con quelle di 144 pazienti adulti consecutivi per studio molecolare.

**Risultati:** I soggetti con tumore metastatico e metastatico di grosse dimensioni presentavano outcome peggiore dei soggetti con tumore >40mm: risultavano più frequentemente persistenti/deceduti (62% e 79% vs 13%,  $p < 0,01$ ), necessitavano più spesso di secondo trattamento (67% e 86% vs 8%,  $p < 0,01$ ) e presentavano Disease-Free Survival (DFS) ridotta ( $p < 0,01$ ). Nel gruppo dei carcinomi ad alto rischio sono state riscontrate mutazioni puntiformi a carico di BRAF (26%), RAS (10%), TERT promotore (18%), TP53 (1%), PTEN (2%) e PIK3CA (3%). Tra i pazienti mutati e quelli *wt* non è stata rilevata differenza di outcome fatta eccezione per la mutazione di TERT, che era correlata ad indici di malattia più severi. I soggetti metastatici presentavano una maggior prevalenza di mutazioni a carico di TERT rispetto ai soggetti con tumore >40mm (27% vs 11%,  $p < 0,01$ ).

I pazienti ad alto rischio differivano dai pazienti a basso rischio per tutte le caratteristiche clinico/patologiche analizzate, eccetto la frequenza di multifocalità, risultavano più spesso persistenti/deceduti, presentavano più frequentemente necessità di secondo trattamento e mostravano ridotta DFS.

Le mutazioni di BRAF sono risultate più frequenti nel gruppo di carcinomi a basso rischio (61% vs 26%,  $p<0,01$ ), mentre nei carcinomi ad alto rischio sono risultate più frequenti le mutazioni di RAS (10% vs 2%,  $p<0,01$ ), in particolare nei tumori  $>40\text{mm}$ , e di TERT promotore (18% vs 3%,  $p<0,01$ ), in particolare nei soggetti metastatici.

Globalmente la mutazione di TERT promotore, anche in associazione con altri eventi molecolari, era correlata ad età avanzata (64aa vs 47aa,  $p<0,01$ ), dimensione maggiore (43mm vs 17mm,  $p<0,01$ ), estensione del tumore (T4 11% vs 4%,  $p<0,01$ ), metastasi a distanza (56% vs 18%,  $p<0,01$ ), stadio avanzato (stadio IV 41% vs 11%,  $p<0,01$ ), necessità di secondo trattamento (57% vs 17%,  $p<0,01$ ) ed outcome peggiore (persistenza/decesso 69% vs 18%,  $p<0,01$ ).

All'analisi multivariata sono risultati fattori indipendenti di outcome negativo la presenza di mutazioni a carico di TERT, il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi a distanza ( $p<0,05$ ).

**Conclusioni:** i pazienti con tumore ad alto rischio, in particolare i metastatici, presentano un outcome peggiore. L'impatto prognostico di tutte le caratteristiche cliniche analizzate (sesso, età, dimensioni, multifocalità, T, N, M, stadio) è stato confermato, sebbene siano risultati fattori indipendenti per recidiva o persistenza di malattia la presenza di mutazioni di TERT promotore, il coinvolgimento linfonodale e le metastasi a distanza. La mutazione di TERT è associata ad una prognosi peggiore: i soggetti mutati presentano malattia più aggressiva e un outcome peggiore. Non sono state rilevate differenze di prognosi nei pazienti che presentavano mutazioni puntiformi negli altri geni indagati.

## **Abstract**

**Background:** Differentiated thyroid carcinoma (DTC) is the most common endocrine malignancy, and its incidence is rapidly increasing. Its prognosis is usually excellent, but some patients exhibit an aggressive tumor with poor clinical outcome. The clinical-molecular features that confer an aggressive phenotype in DTC are object of various studies, being the clinical significance of some of them

still uncertain. A greater knowledge of clinical, pathological and molecular features of DTC might improve the diagnostic frame and lead to an individualized therapy.

**The objectives of the study:** 1) clinical characterization of high-risk DTC cases; 2) molecular characterization with reference on the study of BRAF, RAS, TP53, PTEN and PIK3CA genes and TERT promoter; 3) correlation between clinical and molecular features; 4) comparison of clinical-molecular profile between high- and low risk DTC.

**Materials and methods:** We studied 119 high-risk patients (max dimension >40mm and/or metastatic) who underwent surgery for diagnosis of DTC between 2007 and 2016. Clinical-molecular features of these patients were compared with those of 144 adult patients, consecutive for molecular study, who underwent surgery for diagnosis of DTC between 2007 and 2010.

**Results:** subjects with metastatic tumor or both metastatic and tumor size larger than 40mm had worse outcome than subjects with tumor larger than 40mm: during the follow-up they had a persistent disease or were dead in 62% and 79% of cases respect to 13% of the latter ( $p<0,01$ ), they were also more likely to undergo a second treatment (67% and 86% respect to 8%,  $p<0,01$ ) and had a reduced **Disease-Free Survival (DFS)** ( $p<0,01$ ).

Among patients with high-risk tumors, we detected BRAF mutations in 26% of cases, RAS mutations in 10% of cases, TERT promoter mutations in 18% of cases, TP53 mutations in 1% of cases, PTEN mutations in 2% of cases, PIK3CA in 3% of cases. No link was found between these mutations and outcome, except for TERT promoter mutations that were linked to a more severe disease. Metastatic subjects had a higher prevalence of TERT promoter mutations than subjects with larger size tumors (27% vs 11%,  $p<0,01$ ).

Patients with high-risk cancer had worse clinical-pathological features than low-risk patients, except for the rate of multifocal disease. Regarding the outcome, high-risk patients had poorer clinical outcome, were more likely to have second treatment and had reduced DFS.

BRAF gene mutations were more often found in low-risk carcinomas respect to the high-risk ones (61% vs 26%,  $p<0,01$ ), while among high-risk cases respect to the low-risk ones, RAS mutations were more common (10% vs 2%,  $p<0,01$ ), particularly in tumors  $>40\text{mm}$ , so that TERT mutations (18% vs 3%,  $p<0,01$ ), particularly among metastatic subjects.

Globally, TERT promoter mutations, even in association with other molecular events, are related to older age (67 years vs 47 years,  $p<0,01$ ), larger tumor size (43mm vs 17mm,  $p<0,01$ ), tumor extension (T4: 11% vs 4%,  $p<0,01$ ), distant metastases (56% vs 18%,  $p<0,01$ ), advanced stage (stage IV: 41% vs 11%,  $p<0,01$ ), need for a second treatment (27% vs 17%,  $p<0,01$ ) and worse outcome (persistence/death 69% vs 18%,  $p<0,01$ ).

With the multivariate analysis, TERT mutations, lymph node involvement and distant metastasis resulted independent risk factors for predicting a persistent disease.

**Conclusions:** patients with high-risk tumors, particularly metastatic ones, had a worse outcome. The prognostic value of sex, age, tumor size, multifocality, T, N, M and stage was confirmed; TERT mutations, lymph node involvement and distant metastases were found to be independent risk factors for predicting a persistent disease. Patients carrying TERT promoter mutations were found to have a poorer prognosis: they have aggressive carcinomas and worse clinical outcome. No link was found between BRAF, RAS, TP53, PTEN and PIK3CA gene mutations and the clinical-pathological features analyzed.



## **2. Introduzione**

### **2.1 Epidemiologia**

#### **2.1.1 Epidemiologia descrittiva**

Il carcinoma tiroideo è la più comune neoplasia maligna dell'apparato endocrinologico. Secondo l'IARC (International Agency for Research on Cancer) la neoplasia occupava nel 2012 la settima posizione nel sesso femminile al mondo con circa 230.000 casi incidenti (3,5% del totale con incidenza di 6,1 casi/100.000 persone/anno standardizzato per età), mentre risultava molto più rara nel sesso maschile, con circa 68.000 casi incidenti (0,9% del totale con incidenza di 1,9 casi/100.000 persone/anno standardizzati per età)<sup>1</sup>.

L'incidenza del carcinoma tiroideo è aumentata significativamente negli ultimi decenni in tutto il mondo, verosimilmente in relazione all'aumento delle diagnosi di microcarcinoma papillare della tiroide (PTMC), in particolare nelle donne di mezza età<sup>2, 3, 4</sup>.

In Italia, escludendo i carcinomi della cute, il tumore tiroideo è la quinta neoplasia per incidenza nelle donne (11.000 casi incidenti stimati, 35,25 casi/100.000 persone/anno, 5% delle neoplasie maligne totali), e nella fascia di età compresa tra gli 0 e i 49 anni sale al secondo posto (15% dei tumori totali); risulta invece molto meno frequente negli uomini (4300 casi incidenti stimati, 14,60 casi/100.000 persone/anno, 2,26% delle neoplasie maligne totali)<sup>5</sup>.

I tumori maligni della tiroide originano principalmente da cellule follicolari tiroidee e vengono definiti tumori differenzianti della tiroide (DTC) e comprendono essenzialmente due tipi istologici: il carcinoma papillare (PTC) e il carcinoma follicolare (FTC). Il PTC è il più frequente, costituendo in USA, secondo i dati SEER del 2009, circa il 90% dei DTC e l'88% dei tumori maligni della tiroide; l'FTC rappresenta circa il 8% dei tumori maligni della tiroide<sup>6, 7</sup>.

#### **2.1.2 Fattori di rischio**

##### *2.1.2.1 Sesso ed età*

I DTC, come tutte le malattie tiroidee, sono più frequenti nel sesso femminile che in quello maschile: il rapporto maschi/femmine è circa di 1:3 ed è molto simile in

tutte le casistiche riportate. Alcuni autori sostengono che tale differenza di genere possa essere correlata al diverso assetto ormonale<sup>8</sup>.

Studi in vitro hanno evidenziato la presenza di recettori per gli estrogeni sulle cellule follicolari, la cui stimolazione porta a proliferazione delle cellule tumorali papillari<sup>9</sup>. Altri studi hanno inoltre evidenziato una modificazione fenotipica in senso metastatico delle cellule tumorali sottoposte a stimolo estrogenico<sup>10</sup>.

Per quanto riguarda l'età questa segue una distribuzione unimodale con picchi differenti tra uomini e donne: le donne presentano un aumento dell'incidenza con l'inizio dell'età riproduttiva e raggiungono il picco durante la quarta decade di vita, con forte accentuazione nelle ultime decadi, mentre gli uomini presentano il picco di incidenza durante la sesta decade di vita<sup>3</sup>. Il rischio tra maschi e femmine tende ad eguagliarsi superati gli 85 anni di vita<sup>8</sup>.

#### *2.1.2.2 Esposizione a radiazioni ionizzanti*

Il tessuto tiroideo è molto radiosensibile, specialmente in età pediatrica, e l'esposizione a radiazioni ionizzanti è correlato ad aumentato rischio di malattia nodulare sia benigna che maligna.

Studi condotti sui soggetti vittima dell'attacco atomico durante la seconda guerra mondiale e del disastro di Chernobyl hanno dimostrato un aumento del rischio relativo di tumore tiroideo nei pazienti esposti a radiazioni ionizzanti. Tale rischio è maggiormente aumentato nelle donne rispetto agli uomini e risulta massimo se l'esposizione è avvenuta durante l'età pediatrica, mentre non risulta statisticamente significativo nelle persone esposte in età adulta; inoltre il rischio tende a diminuire col passare degli anni dall'esposizione, senza tuttavia azzerarsi<sup>11, 12</sup>.

Anche il largo impiego della radioterapia esterna (RTE) negli anni '50 per il trattamento di patologie benigne pediatriche, quali iperplasia timica, acne ed emangiomi, è risultato associato ad aumentato rischio di sviluppare un carcinoma tiroideo, anche per bassi dosaggi di esposizione<sup>13, 14, 15</sup>.

Il trattamento con RTE in regione toracica o del collo in età evolutiva, soprattutto per il trattamento di linfoma di Hodgkin o non-Hodgkin, è considerato uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di seconde neoplasie. L'aumento di rischio relativo aumenta linearmente con la dose fino a circa 25 Gy<sup>16, 17, 18</sup>.

Per molti anni l'impatto dell'utilizzo diagnostico delle radiazioni è stato controverso. Un recente studio epidemiologico ha dimostrato la presenza di un legame statisticamente significativo tra alcune procedure diagnostiche nell'ambito della medicina nucleare o della radiologia (TAC, radiografie) e incidenza di PTMC<sup>19</sup>.

### 2.1.2.3 Storia Familiare e genetica

Una storia familiare di carcinoma tiroideo o di tireopatia benigna conferisce un aumentato rischio di cancro tiroideo, in modo particolare se ne risulta affetto un parente di primo grado, sebbene non sia stato ancora chiarito il meccanismo patogenetico alla base di questo fenomeno<sup>20, 21, 22</sup>.

Le forme familiari delle neoplasie follicolari sono state riconosciute come entità a sé stante solo recentemente, e si stima che possano comprendere una quota tra il 5 e il 15% di tutti i DTC<sup>23</sup>.

Il rischio di DTC è risultato elevato in varie sindromi, le più importanti tra queste e la variante istologica di DTC a cui sono associate sono riassunte nella tabella 1.

*Tabella 1 Sindromi tumorali ereditarie associate a DTC, tratta da "Management Guidelines for Children with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Pediatric Thyroid Cancer"<sup>24</sup>.*

Hereditary Syndrome	Gene (sede cromosomica)	Tipo di neoplasia tiroidea
<b>Poliposi associata ad APC (poliposi adenomatosa familiare [FAP], Poliposi adenomatosa familiare attenuata, sindrome di Gardner, sindrome di Turcot)</b>	• APC (5q21-q22)	• PTC (variante cribriforme-morulare)
<b>Complesso di Carney</b>	• PRKAR1A (17q24.2) • "CNC2" (2p16)	• Gozzo multinodulare • Adenoma follicolare • DTC (PTC e FTC)
<b>Sindrome DICER1</b>	• DICER1 (14q32.13)	• Gozzo multinodulare • DTC (dovuto a seconda mutazione somatica del gene DICER1, possibile correlazione con il trattamento per blastoma pleuro-polmonare)
<b>Amartomatosi PTEN correlate (sindrome di Cowden, sindrome</b>	• PTEN (10q23)	• Gozzo multinodulare • Adenoma follicolare

<b>Bannayan-Riley-Ruvalcaba, sindrome di Proteo associata a PTEN, sindrome Proteus-like)</b>		• DTC (soprattutto FTC)
<b>Sindrome di Werner</b>	• WRN (8p12)	• DTC (PTC e FTC)

#### 2.1.2.4. *Patologie autoimmuni*

L'associazione tra tiroidite di Hashimoto e carcinoma tiroideo papillare è molto controversa<sup>25, 26, 27, 28, 29, 30</sup>. Le ipotesi patogenetiche alla base di tale associazione sono: 1) l'aumento del TSH prolungato nel tempo che, per effetto trofico sulle cellule follicolari, può portare ad incrementato rischio di patologia tumorale; 2) la nota correlazione che esiste tra lo stato infiammatorio cronico e lo sviluppo di carcinoma.

Tra le svariate possibili associazioni tra patologie autoimmuni e tumorali a carico della tiroide, sembra esservi una correlazione più stretta tra tiroidite di Hashimoto e PTC. Due grosse come riportato da due meta-analisi condotte nel 2013<sup>31</sup> e nel 2017<sup>32</sup>, con numerosità rispettivamente di 10648 e 63628 soggetti.

#### 2.1.2.5. *Apporto di Iodio*

Studi su animali e su uomini hanno messo in evidenza un aumentato rischio di FTC nei pazienti che presentino carenza di iodio<sup>33, 34</sup>: l'ipotesi patogenetica più accreditata riconosce cruciale l'effetto trofico sulle cellule follicolari da parte dell'aumento del TSH che si verifica in caso di insufficienza di iodio; sono stati riconosciuti anche altri meccanismi, come ad esempio l'aumento di produzione di Radicali Liberi dell'Ossigeno (ROS) in condizioni di carenza di iodio, che potrebbero essere implicati nel processo tumorigenico<sup>35</sup>.

#### 2.1.2.6. *Esposizione ambientale e lavorativa a inquinanti*

Non ci sono sostanze attualmente riconosciute dall' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come carcinogeni per la tiroide nell'uomo.

Studi su modelli di laboratorio hanno ipotizzato che gli idrocarburi polialogenati aromatici, in particolare gli eteri di difenile polibromurati utilizzati come ritardanti di fiamma, possano portare ad un'alterata regolazione dell'omeostasi tiroidea ed ad un'aumentata incidenza di carcinoma tiroideo; tuttavia tali studi necessitano di essere traslati in studi epidemiologici su soggetti umani per verificarne l'effettivo legame<sup>36</sup>.

Un recente studio condotto su soggetti esposti a pesticidi e sembra indicare un possibile legame con il carcinoma alla tiroide<sup>37</sup>.

## **2.2 Anatomia patologica**

### **2.2.1 Carcinoma papillare della tiroide**

Il PTC è l'istotipo più frequente tra i DTC.

Macroscopicamente può presentarsi come una lesione solitaria o multifocale di dimensione media di 2-3 cm. La lesione può infiltrare la capsula e presentare margini non ben delimitati; inoltre possono essere presenti aree di fibrosi, aree cistiche e calcificazioni.

Microscopicamente il PTC presenta delle papille contenenti al centro un core fibrovascolare; tali papille sono ricoperte da epitelio cuboide mono- o pluristratificato.

Le atipie nucleari sono la caratteristica più importante dal punto di vista diagnostico: esse comprendono il nucleo a vetro smerigliato o ad occhio di Orphan Annie, le pseudoinclusioni nucleari, dovute a invaginazioni del citoplasma visibilmente in sezione trasverse, ed incisioni nucleari.

La presenza di calcificazioni concentriche (corpi psammomatosi) è spesso presente e può rafforzare il sospetto diagnostico.

Sono state descritte numerose varianti istologiche del PTC, ad impatto prognostico differente.

Il PTC viene definito microcarcinoma papillare (PTMC) se la dimensione della lesione è inferiore a 1 cm: l'incidenza di tali tumori è in rapida crescita negli ultimi decenni e presenta prognosi favorevole.

La variante follicolare è la più comune delle varianti di PTC (FVPTC), con incidenza variabile. La variante follicolare è definita come un tumore avente pattern di crescita follicolare ma atipie nucleari tipiche del PTC; tale tumore si caratterizza per la prognosi positiva.

La variante a cellule alte si rileva soprattutto nei soggetti anziani e costituisce circa il 10% dei PTC. Essa è caratterizzata dalla presenza per più del 50% del tumore di cellule eosinofile la cui altezza è doppia rispetto alla larghezza. Tali tumori si

presentano alla diagnosi spesso di grandi dimensioni, con invasione extratiroidea e angiovascolare, tendono a dare frequentemente metastasi linfonodali o a distanza. In relazione a tale comportamento aggressivo hanno una prognosi peggiore di altri sottotipi di PTC (sopravvivenza a 10 anni pari al 75%).

La variante sclerosante diffusa è rara e colpisce soprattutto soggetti giovani. Macroscopicamente la lesione presenta estese aree di fibrosi e calcificazione, rendendo la tiroide estremamente dura; microscopicamente presenta pattern di crescita papillare con aree di metaplasia squamosa. Spesso è presente un fitto infiltrato linfocitario sovrapponibile a quello della tiroidite di Hashimoto. La malattia ha una prognosi più sfavorevole rispetto al PTC classico per il maggior coinvolgimento linfonodale sin alla diagnosi ed alla tendenza di recidivare.

La variante Hobnail (HVPTC), recentemente descritta, presenta struttura non solida con componente a cellule alte/colonnare/sclerosante diffusa rappresentata per meno del 10%, perdita di polarità cellulare e nucleo posto in posizione atipica nel >10%. Ha comportamento aggressivo ed è associata a prognosi negativa<sup>38, 39</sup>.

I PTC tendono a diffondere soprattutto per via linfatica<sup>40, 41</sup>.

### **2.2.2 Carcinoma follicolare della tiroide**

I carcinomi follicolari comprendono circa il 10% delle lesioni carcinomatose della tiroide, anche se, in relazione all'aumento di diagnosi di PTMC e la riclassificazione in FVPTC sembrano in riduzione.

I FTC macroscopicamente si presentano solitamente come una lesione singola capsulata, possono essere presenti zone di necrosi o di calcificazione nel tumore.

Microscopicamente la morfologia è varia: spesso è simile a quella della tiroide sana, con la presenza di follicoli di medie dimensioni contenenti colloide, può esservi anche un pattern di crescita trabecolare o solido, soprattutto nelle varianti estesamente invasive. La presenza di macrofollicoli è estremamente rara e tale reperto impone una diagnosi differenziale con la variante follicolare del PTC. Nessuna atipia citologica o dell'architettura è patognomonica di malignità e pertanto la diagnosi differenziale tra FTC ed adenoma follicolare (FA) non è fattibile da citologia da agoaspirato.

I carcinomi follicolari si suddividono in minimamente invasivi (MI-FTC) ed estesamente invasivi (WI-FTC) e si differenziano per il grado di invasività capsulare/vascolare: i carcinomi estesamente invasivi mostrano marcata angioinvasività, infiltrazione della capsula e del parenchima tiroideo; possono inoltre estendersi ai tessuti molli extra-tiroidei.

La variante istologica più importante del carcinoma follicolare è la variante oncocitica o a cellule di Hürthle, caratterizzata dalla presenza superiore al 75% di oncociti; questa variante sembra essere meno sensibile alla terapia con lo radioiodio.

Il carcinoma follicolare della tiroide diffonde per via ematogena<sup>40, 42</sup>.

### **2.3 Diagnosi**

Il DTC si manifesta generalmente come nodulo tiroideo; circa il 5-15% dei noduli rilevati alla palpazione sono di natura maligna<sup>43</sup>.

Più raramente il tumore si manifesta con i sintomi da compressione da parte del nodulo, come disfagia, odinofagia, dispnea, disfonia o a causa di massa cervicale<sup>43</sup>.

#### **2.3.1 Semeiotica**

Il primo passo nell'inquadramento della malattia nodulare è la raccolta accurata delle informazioni anamnestiche: in particolare vanno investigati eventuali fattori di rischio, nonché il trend di crescita del nodulo.

All'anamnesi segue l'esame obiettivo del collo, comprendente la palpazione della tiroide e dei linfonodi laterocervicali; il rilevamento di un nodulo solitario grande, fisso, duro e immobile rispetto ai piani circostanti è la manifestazione classica del carcinoma, soprattutto in presenza di linfadenopatia. Vanno investigati inoltre eventuali segni e sintomi di ipotiroidismo o ipertiroidismo<sup>43, 44</sup>.

#### **2.3.2 Esami ematochimici**

Gli esami di funzionalità tiroidea vanno eseguiti in tutti i pazienti con noduli noti: la rilevazione di un TSH soppresso dovrebbe essere approfondita con una scintigrafia con <sup>123</sup>I o <sup>99m</sup>Tc per escludere la presenza di un nodulo autonomo, che non richiede l'accertamento citologico volto ad escludere la natura maligna del nodulo. La presenza di ipotiroidismo, sia esso franco o subclinico, o di TSH ai limiti superiori dei valori normali necessitano invece di un'investigazione più

approfondita, che comprende anche eventuale agoaspirato tiroideo per esame citologico. La valutazione della tireoglobulina in fase diagnostica non è raccomandata, avendo tale test bassa specificità e sensibilità. È ancora oggetto di discussione invece se un dosaggio della calcitonina ematica vada fatto di routine per escludere la presenza di carcinoma midollare della tiroide<sup>43, 44</sup>.

### 2.3.3 Ecografia

L'ecografia è il principale esame di imaging utilizzato per valutare i noduli tiroidei. Tale tecnica permette la valutazione delle caratteristiche ecostrutturali e di flusso del parenchima, della capsula e dei linfonodi cervicali e l'eventuale presenza di noduli. Il pattern ecografico fornisce una stima della possibile malignità del nodulo; caratteristiche sospette sono: nodulo solido ipoecogeno, margini irregolari, microcalcificazioni, estensione extratiroidea, linfadenopatia cervicale, aumentata vascolarizzazione intranodulare, forma "taller than wide" (Tabella 2)<sup>44</sup>.

*Tabella 2 Pattern ecografico, rischio stimato di malignità e guide per l'agoaspirato per i noduli<sup>44</sup>*

<b>Pattern ecografico</b>	<b>Caratteristiche ecografiche</b>	<b>Rischio stimato di malignità %</b>	<b>Cutoff dimensionale per eseguire FNA (dimensione maggiore)</b>
Sospetto alto	Nodo solido ipoecogeno o nodulo parzialmente cistico con componente solida ipoecogena con una o più delle seguenti caratteristiche: margini irregolari (infiltrativi, microlobulati), microcalcificazioni, forma "taller than wide", calcificazioni del bordo con una piccola estrusione di tessuto soffice, evidenza di estensione extra tiroidea (ETE)	>70-90	≥1 cm
Sospetto intermedio	Nodo solido ipoecogeno con margini lisci senza microcalcificazioni, ETE, o forma "taller than wide"	10-20	≥1 cm
Sospetto basso	Nodulo solido isoecogeno o iperecogeno, o parzialmente cistico con aree eccentriche solide senza microcalcificazioni, margini irregolari o ETE, o forma "taller than wide"	5-10	≥1.5 cm



Sospetto molto basso	Nodulo spongiforme o parzialmente cistico privo degli elementi ecografici descritti per le categorie basso, intermedio e alto rischio	<3	≥2 cm o follow-up Observation without FNA is also a reasonable option
Benignità	Noduli puramente cistici (assenza di componente solida)	<1	No FNA

L'ecografia tiroidea viene inoltre routinariamente utilizzata per guidare l'agoaspirato.

### 2.3.4 Elastosonografia tiroidea

L'elastosonografia tiroidea è una tecnica volta a valutare la consistenza del nodulo rispetto al parenchima circostante tramite l'utilizzo di una sonda ecografica attraverso cui si esercita una pressione esterna costante. I noduli di consistenza aumentata sono sospetti per malignità. La tecnica aveva mostrato risultati promettenti durante le prime valutazioni<sup>45</sup>, ma il suo impiego non viene attualmente formalmente riconosciuto nell'iter diagnostico del nodulo tiroideo, in quanto la sua performance è risultata estremamente variabile, probabilmente a causa della sua natura fortemente operatore-dipendente<sup>46</sup>.

### 2.3.5 Scintigrafia con radionuclidi

La scintigrafia con <sup>123</sup>I, <sup>131</sup>I o <sup>99m</sup>Tc, secondo le linee guida ATA, è indicata in tutti i pazienti con TSH ridotto per la valutazione della presenza di un eventuale nodulo autonomo, che non richiede alcuna valutazione citologica in quanto tali noduli risultano raramente maligni<sup>44</sup>. L'utilizzo della scintigrafia non è invece consigliata per differenziare i noduli benigni da quelli maligni in caso di TSH normale od elevato: quasi tutti i carcinomi appaiono alla scintigrafia come noduli ipocaptanti, ma tale caratteristica è presente anche in molti noduli benigni; inoltre alcuni tumori follicolari possono apparire come noduli isocaptanti all'esame, che quindi ha scarsa sensibilità e specificità<sup>40, 43, 44</sup>.

### 2.3.6 18-FDG PET

La PET non è indicata come esame per la valutazione del nodulo tiroideo. Il suo utilizzo nei noduli con citologia incerta non ha dimostrato un vantaggio diagnostico<sup>47</sup>. La positività incidentale di una PET eseguita per altre condizioni cliniche conferisce un rischio di malignità del 30%; una captazione tiroidea diffusa di 18-FDG può essere rilevata in presenza di tiroidite di Hashimoto<sup>43, 48</sup>.

### 2.3.7 Agoaspirato

L'esame citologico su agoaspirato è il gold standard per la diagnosi di carcinoma tiroideo, essendo una metodica semplice, ben tollerata, minimamente invasiva, con sensibilità dell'97% e specificità del 51%<sup>49</sup>.

Le indicazioni all'agoaspirato dipendono dalle dimensioni e dal rischio di malignità del nodulo dopo la valutazione iniziale (semeiotica, ecografica ed ematochimica): le recenti linee guida ATA<sup>44</sup> suggeriscono di eseguire l'agoaspirato su noduli a sospetto di malignità elevato ed intermedio di dimensioni  $\geq 1$  cm, su noduli a sospetto basso di dimensioni  $\geq 1,5$  cm e sui noduli a sospetto molto basso di dimensioni  $\geq 2$  cm (Tabella 2).

Il risultato dell'esame viene riportato secondo la classificazione "Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology", comprendente 6 categorie (Tabella 3)<sup>49</sup>.

*Tabella 3 Categorie diagnostiche per la valutazione dell'agoaspirato secondo il sistema Bethesda, adattato da The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology<sup>49</sup>*

<b>Sistema Bethesda per la citopatologia tiroidea: categorie diagnostiche raccomandate</b>
<b>I. Non diagnostica o non soddisfacente</b>
Liquido cistico
Vetrino privo di cellularità
Altro (sangue, artefatti da coagulazione, etc)
<b>II. Benignità</b>
Corrispondente a nodulo follicolare benigno ( inclusi noduli adenomatosi, noduli colloidali, etc)
Corrispondente a tiroidite linfocitica (t. di Hashimoto) in contesto clinico appropriato
Corrispondente a tiroidite granulomatosa (t. subacuta)
Altro
<b>III. Atipia di significato indeterminate o lesion follicolare di significato indeterminato (AUS)</b>
<b>IV. Neoplasia follicolare o sospetta per neoplasia follicolare (FLUSS)</b>
<b>V. Sospetto di malignità</b>
Sospetto per carcinoma papillare, carcinoma metastatico, carcinoma midollare, linfoma
Altro
<b>VI. Malignità</b>
Carcinoma papillare tiroideo
Carcinoma tiroideo scarsamente differenziato
Carcinoma midollare tiroideo
Carcinoma tiroideo indifferenziato (anaplastico)
Carcinoma a cellule squamose
Carcinoma a componenti miste
Carcinoma metastatico

L'agoaspirato è diagnostico in circa il 65% dei casi mentre risulta non diagnostico o insoddisfacente nel 13% dei casi. I campioni per essere considerati soddisfacenti devono contenere almeno 6 gruppi di cellule, ciascuno di almeno 10 cellule<sup>50</sup>. Un esito insoddisfacente o non diagnostico richiede la ripetizione della procedura di agoaspirato, possibilmente dopo 3 mesi per evitare falsi positivi dovuti a cambiamenti reattivi<sup>44</sup>.

La categoria (III) di Bethesda è quella in cui si riscontra la maggiore variabilità, sia in fatto di riproducibilità sia come rischio di malignità, che varia dal 12,5 al 50%<sup>51</sup>.

In caso di nodulo a citologia indeterminata le linee guida ATA suggeriscono di ripetere l'agoaspirato o eseguire una biopsia con ago tranciante, valutare le caratteristiche ecografiche ed eventualmente utilizzare tecniche di diagnostica molecolare per stratificare correttamente il rischio di malignità e indirizzare la scelta terapeutica<sup>44</sup>.

Negli ultimi decenni è stato dato molto spazio alla ricerca del profilo molecolare dei noduli, al fine di meglio caratterizzare e diagnosticare noduli maligni. Il primo gene ad essere valutato per tale scopo è BRAF: la mutazione BRAF V600E è presente nel 28-83% dei PTC a seconda delle casistiche<sup>52, 53</sup>. Secondo uno studio del 2014 di Hyeon et al. la specificità e sensibilità di BRAF per la rilevazione di carcinomi nei noduli classificati come AUS è del 95% e 70%<sup>54</sup>.

Alcuni autori hanno proposto uno studio molecolare più ampio, applicando un pannello di mutazioni quali BRAF, N-, H-, K-RAS, RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPAR con riscontro di una sensibilità maggiore rispetto alla mutazione del solo gene BRAF senza notevole decremento della specificità<sup>55</sup>.

Esiste inoltre una classificazione proposta nel 2013 dalla Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica e la divisione italiana dell'Accademia Internazionale di Patologia (SIAPeC-IAP)<sup>56</sup>, sintetizzata nella Tabella 4.

Tabella 4 Categorie diagnostiche suggerite dalla classificazione SIAPeC-IAP, adattata da Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology<sup>56</sup>

CODICE	CATEGORIA DIAGNOSTICA	RISCHIO ATTESO DI MALIGNITA' %	PERCORSO SUGGERITO
<b>TIR 1</b>	Non diagnostica	Non definito	Ripetizione dell'agoaspirato eco-guidato dopo almeno 1 mese
<b>TIR 1C</b>	Non diagnostica, cistica	Basso (variabile a seconda dei reperti clinici)	Valutazione dei reperti clinici e/o ripetizione della'agoaspirato
<b>TIR 2</b>	Né maligno né benigno	<3	Follow-up
<b>TIR 3A</b>	Lesione indeterminata a basso rischio (LRIL)	<10	Ripetizione dell'agoaspirato/ follow-up clinico
<b>TIR 3B</b>	Lesione indeterminata ad alto rischio (HRIL)	15-30	Chirurgia
<b>TIR 4</b>	Sospetto di malignità	60-80	Chirurgia
<b>TIR 5</b>	Malignità	>95	Chirurgia

## 2.4 Stadiazione e Prognosi

I carcinomi differenziati della tiroide hanno un'ottima prognosi, sia perché vengono diagnosticati prevalentemente in stadi precoci di malattia sia perché il tumore tende a crescere lentamente e in modo non aggressivo.

Uno studio retrospettivo del 2001 condotto su pazienti trattati per PTC ha rilevato un Overall Survival (OS) del 98% a 1 anno, 95% a 5 anni, 90% a 10 anni e 73% a 20 anni<sup>57</sup>. Uno studio simile su pazienti affetti da FTC ha rilevato una prognosi leggermente peggiore, con overall survival a 10 anni di 79%<sup>58</sup>.

### 2.4.1 Sistemi di stadiazione

#### 2.4.1.1 Il sistema TNM

Il sistema di stadiazione più utilizzato nella valutazione prognostica dei DTC è il sistema TNM, che prende in considerazione quattro parametri: l'età del paziente al momento della diagnosi, la dimensione del tumore e l'invasione dei tessuti circostanti (parametro T), la presenza di metastasi linfonodali (parametro N) e di metastasi a distanza (parametro M). La stadiazione si avvale di 4 stadi in grado di definire il rischio di mortalità della malattia<sup>59</sup> (Tabelle 5-8).

Tabella 5: definizione del parametro T nella stadiazione TNM <sup>59</sup>

Parametro T	Criteri
TX	Il tumore primitivo non può essere valutato
T0	Non evidenza del tumore primitivo
T1	Tumore $\leq 2$ cm nella dimensione maggiore, limitato alla tiroide
T1a	Tumore $\leq 1$ cm nella dimensione maggiore, limitato alla tiroide
T1b	Tumore $> 1$ cm ma $\leq 2$ cm nella dimensione maggiore, limitato alla tiroide
T2	Tumore $> 2$ cm ma $\leq 4$ cm nella dimensione maggiore, limitato alla tiroide
T3	Tumore $> 4$ cm limitato alla tiroide, o grossa estensione extratiroidea con invasione muscolare
T3a	Tumore $> 4$ cm, limitato alla tiroide
T3b	Grossa estensione extratiroidea con invasione dei muscoli sternoiideo, sternotiroideo, tiroideo o omoioideo, in presenza di tumore di qualsiasi dimensione
T4	Grossa estensione extratiroidea con estensione alle strutture maggiori del collo
T4a	Grossa estensione extratiroidea con invasione dei tessuti molli sottocutanei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente, in presenza di tumore di qualsiasi dimensione
T4b	Grossa estensione extratiroidea con invasione della fascia prevertebrale o inglobamento dell'arteria carotidea o delle vene mediastiniche, in presenza di tumore di qualsiasi dimensione
Tutte le categorie possono essere suddivise in: (s) tumore singolo; (m) tumore multifocale (il tumore di maggiori dimensioni determina la classificazione)	

Tabella 6: definizione del parametro N nella stadiazione TNM <sup>59</sup>

Parametro N	Criteri
NX	Il coinvolgimento linfonodale regionale non può essere determinato
N0	Non evidenza di metastasi linfonodali regionali
N0a	1 o più linfonodi benigni accertati alla citologia o istologia
N0b	Non evidenza clinica o radiologica di metastasi locoregionali
N1	Metastasi ai linfonodi regionali
N1a	Metastasi ai linfonodi dei livelli VI o VII (pretracheali, paratracheali, prelaringei/Delfici o mediastinici superiori), unilaterale o bilaterali.
N1b	Metastasi ai linfonodi unilaterali, bilaterali o controlaterali dei linfonodi dei livelli I, II, III, IV o V o retrofaringei

Tabella 7: definizione del parametro M nella stadiazione TNM <sup>59</sup>

Parametro M	Criteri
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

Tabella 8 Raggruppamento in stadi per i carcinomi differenziati della tiroide<sup>59</sup>

Età alla diagnosi	T	N	M	Stadio
<55 anni	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M0	I
	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	II
≥55 anni	T1	N0/NX	M0	I
	T1	N1	M0	II
	T2	N0/NX	M0	I
	T2	N1	M0	II
	T3a/T3b	Qualsiasi N	M0	II
	T4a	Qualsiasi N	M0	III
	T4b	Qualsiasi N	M0	IVA
	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	IVB

#### 2.4.1.2 Il sistema di stratificazione del rischio ATA 2015

Esiste inoltre una stratificazione del rischio in 3 classi proposta dall'ATA il cui lo scopo non è definire il rischio di mortalità della malattia come la stadiazione TNM ma quello di persistenza/recidiva. Tale sistema si avvale, oltre dei parametri TNM, di altre caratteristiche del tumore quali istotipo e variante istologica, mutazioni genetiche, radicalità dell'intervento, valutazione post-operatoria (Tabella 9)<sup>44</sup>.

Tabella 9 Il sistema di stratificazione del rischio ATA 2015<sup>44</sup>

Livello di rischio ATA	Caratteristiche
Basso rischio	<p>Carcinoma papillare della tiroide (con tutte le seguenti caratteristiche):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• assenza di metastasi locali o a distanza</li> <li>• resezione macroscopica completa del tumore</li> <li>• Assenza di invasione dei tessuti o delle strutture locoregionali</li> <li>• Istologia priva di elementi di aggressività (ad esempio variante tall cell, hobnail, colonnare)</li> <li>• in caso di somministrazione di <sup>131</sup>I, assenza di foci metastatici captanti al di fuori della loggia tiroidea rilevati alla scintigrafia total body eseguita in seguito al trattamento</li> <li>• assenza di invasione vascolare</li> <li>• N0 clinico, 5 o meno micrometastasi (&lt;0.2 cm di dimensione massima) linfonodali (N1)</li> </ul> <p>Carcinoma papillare della tiroide, variante follicolare, intratiroideo                      Carcinoma follicolare della tiroide, ben differenziato, intratiroideo, con invasione capsulare e assente o minima (&lt;4 foci) invasione vascolare                      Microcarcinoma papillare intratiroideo, unifocale o multifocale, inclusi i casi con mutazione BRAFV600E (se nota)</p>
Rischio intermedio	Invasione tumorale microscopica dei tessuti molli peritiroidei

	<p>Foci metastatici iodocaptanti nel collo rilevati alla scintigrafia total body eseguita in seguito al trattamento</p> <p>Caratteristiche istologiche di aggressività (ad esempio variante tall cell, hobnail, colonnare)</p> <p>Carcinoma papillare con invasione vascolare</p> <p>N1 clinico o 5 o più linfonodi patologici (N1) di dimensioni &lt;3 cm</p> <p>Microcarcinoma papillare multifocale con ETE con mutazione BRAFV600E (se nota)</p>
<b>Alto rischio</b>	<p>Invasione tumorale macroscopica nei tessuti molli peritiroidei (grossa ETE)</p> <p>Resezione tumorale incompleta</p> <p>Metastasi a distanza</p> <p>Tireoglobulina postchirurgica indicativa di metastasi a distanza</p> <p>N1 patologico con tutti i linfonodi <math>\geq 3</math> cm nella dimensione massima</p> <p>Tumore follicolare della tiroide con estesa invasione vascolare (&gt; 4 foci)</p>

## 2.4.2 Stratificazione del rischio di recidiva e mortalità

### 2.4.2.1 Età

L'età è un fattore prognostico molto importante nei DTC, tanto che è l'unica tipologia di tumore per il quale tale parametro è considerato nella stadiazione TNM. Il cut-off utilizzato da tale classificazione per stratificare il rischio di mortalità del paziente è stato recentemente innalzato ai 55 anni: la sopravvivenza causa specifica a 5 anni tende infatti a diminuire in maniera graduale superati i 35 anni<sup>60</sup> e rimane superiore al 90% fino ai 65 anni<sup>61</sup>. Inoltre diversi studi mostrano un forte aumento del rischio nei pazienti di età superiore ai 55-65 anni rispetto ai pazienti più giovani<sup>62-65</sup>.

### 2.4.2.2 Sesso

Il sesso maschile è associato ad una prognosi peggiore: è stata avanzata l'ipotesi che tale differenza sia dovuta sia alla ridotta mortalità delle donne rispetto agli uomini sia al fatto che i DTC vengono diagnosticati più precocemente a causa della maggiore attenzione nello screening di tale popolazione<sup>65</sup>.

### 2.4.2.3 Dimensioni e presenza di estensione extratiroidea

Sia la stadiazione TNM che quella ATA stratificano i pazienti in base alla dimensione ed alla presenza di estensione extratiroidea (ETE).

La dimensione è un fattore prognostico importante e si correla col rischio di ETE, di metastasi linfonodali ed a distanza<sup>66</sup>.

L'ETE può essere macroscopica o microscopica: la prima ha significato prognostico negativo mentre il riscontro di ETE microscopica ha significato prognostico incerto<sup>67-69</sup>.

#### *2.4.2.4 Margini di resezione*

I margini di resezione dopo la terapia possono essere classificati in R0 (margini non infiltrati), R1 (evidenza microscopica di malattia) e R2 (evidenza macroscopica di malattia). La presenza di margini di resezione R2 è predittiva sia di aumentato rischio di recidiva locoregionale che di mortalità, mentre non è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa in caso di R0 o R1<sup>69, 70</sup>.

#### *2.4.2.5 Metastasi linfonodali*

Le metastasi linfonodali sono il principale fattore di rischio per la ricorrenza di malattia, passando da rischio di ricorrenza quasi nullo per pazienti cN0 ad un rischio di ricorrenza del 22% in pazienti cN1. Nello specifico si devono considerare il numero di linfonodi coinvolti, la posizione, la dimensione del linfonodo più grande e la presenza di invasione extralinfonodale<sup>71</sup>. Oltre al numero assoluto dei linfonodi metastatici, anche il rapporto tra numero di linfonodi metastatici e numero di linfonodi esaminati è considerato un fattore di rischio: in relazione a ciò la prognosi peggiora quanto più il rapporto si avvicina a 1<sup>72</sup>.

Il significato prognostico della presenza di micrometastasi linfonodali (metastasi riscontrate prima della chirurgia; o visibili/palpabili durante la chirurgia, ma rilevate all'esame istologico) è incerto: alcuni studi riportano una prognosi uguale a quella dei soggetti N0<sup>73</sup> o intermedio tra N0 a N1<sup>74</sup>.

Nonostante i linfonodi riescano a predire in maniera accurata il rischio di recidiva, il loro ruolo sulla sopravvivenza è meno chiaro: uno studio retrospettivo non ha trovato correlazione tra la presenza di metastasi linfonodali ed il rischio di mortalità nei pazienti di età inferiore ai 45 anni mentre sembra correlare a sopravvivenza ridotta in pazienti di età superiore<sup>75</sup>.

#### *2.4.2.6 Metastasi a distanza*

Le metastasi a distanza sono riscontrate nel 9% dei DTC; tali percentuali sono inferiori nei PTC e superiori nei FTC<sup>76</sup>. Le sedi più frequenti di metastasi sono polmone e ossa, più raramente possono interessare altre regioni come SNC, sottocute e fegato<sup>76-78</sup>.



Le metastasi a distanza sono un marcatore prognostico fortemente negativo, conferendo una mortalità a 10 anni del 75%<sup>76</sup>.

## **2.5 Trattamento**

Il DTC ha un'ottima prognosi e gli interventi terapeutici che si mettono in atto sono solitamente curativi. I capisaldi della terapia sono la chirurgia associata o meno alla terapia radiometabolica, in relazione alla stratificazione del rischio precedentemente presentata. Altri trattamenti, come la radioterapia esterna, vengono riservati a casi selezionati in cui non si riesca a controllare la malattia.

### **2.5.1 Chirurgia**

La chirurgia ricopre un ruolo di primaria importanza nel trattamento dei carcinomi tiroidei e la strategia utilizzata è rappresentata dalla tiroidectomia totale o dalla lobo-istmectomia.

La scelta della tecnica per noduli unilaterali di dimensione inferiori al centimetro e cN0 è controversa: la metanalisi di Macedo et al., in cui si analizzavano 2989 pazienti, ha dimostrato una riduzione del numero di recidive nei pazienti sottoposti a tiroidectomia totale rispetto a quelli sottoposti a loboistmectomia senza tuttavia una corrispondente riduzione del tasso di mortalità<sup>79</sup>. Le recenti linee guida ATA suggeriscono di sottoporre i pazienti con sopraccitate caratteristiche istologiche a lobo-istmectomia. La tiroidectomia totale è consigliata in caso di tumori di dimensione superiore a 4 cm, o tumori con estensione extratiroidea, o con metastasi linfonodali o a distanza; in tutti gli altri casi la scelta tra intervento uni o bilaterale può variare a seconda del volume del chirurgo<sup>44</sup>.

La procedura chirurgica prevede la dissezione linfonodale del compartimento centrale (VI) nei tumori cN1 e nei pazienti sottoposti a tiroidectomia totale. Il ruolo di tale procedura nei pazienti cN0 è più incerto; al momento è consigliata nei pazienti con PTC di grosse dimensioni ma non in quelli affetti da FTC<sup>44</sup>.

La dissezione del compartimento laterocervicale è invece indicata in pazienti con metastasi linfonodale accertate da biopsia<sup>44</sup>.

Il rischio di complicanze varia a seconda delle condizioni del paziente, dall'abilità del chirurgo e dalla tecnica scelta; le più frequenti in caso di tiroidectomia totale sono ipocalcemia transitoria (circa 11,8%) o permanente (2,2%), lesione del nervo

ricorrente laringeo transiente (2,4%) o permanente (1,3%), infezione della ferita chirurgica (0,4%), emorragia (1,6%)<sup>80</sup>.

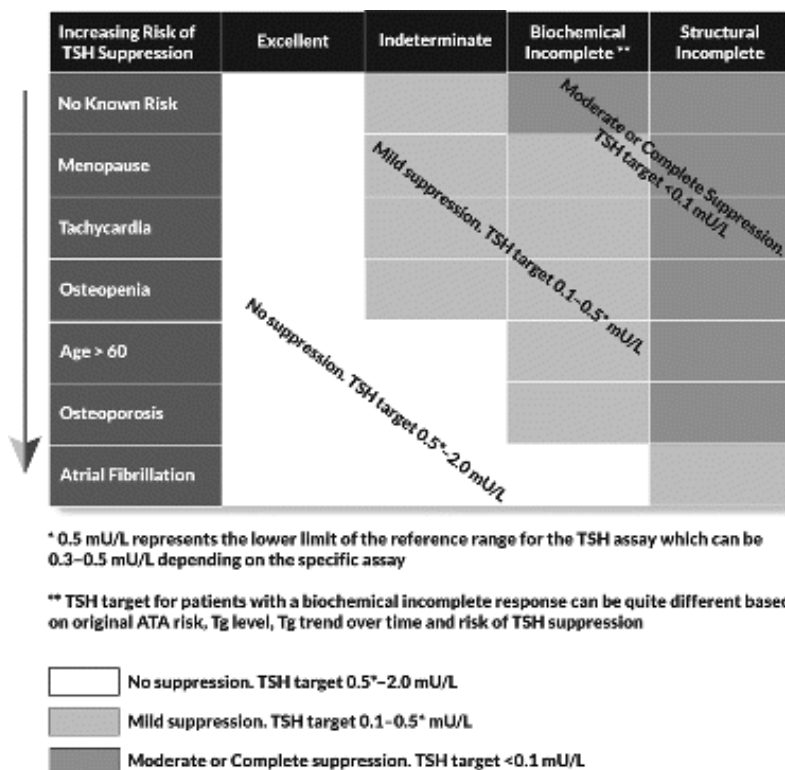
### 2.5.2 Ormonoterapia

Tutti i pazienti sottoposti a tiroidectomia totale, e circa il 22% di quelli sottoposti a lobo-istmectomia devono essere trattati con una terapia ormonale con analoghi degli ormoni tiroidei a vita<sup>81</sup>.

A causa dell'azione trofica esercitata dal TSH sui tireociti, nei pazienti a rischio di recidiva di malattia, la dose di ormoni tiroidei somministrata viene somministrata al fine di tenere soppresso o semi-soppresso il TSH.

Il target di TSH è variabile e dipende dalle caratteristiche cliniche del paziente e della risposta del tumore alla terapia (Tabella 10).

Tabella 10 Target del TSH per la terapia ormonale sostitutiva <sup>44</sup>



### 2.5.3 Valutazione post-operatoria

Le linee guida ATA suggeriscono una valutazione post-operatoria per scegliere come proseguire l'iter terapeutico.

È prevista la valutazione livelli ematici di tireoglobulina (Tg), il marker di malattia utilizzato nel follow-up. Le linee guida ATA suggeriscono di misurare la

tireoglobulina allo stato basale nei pazienti ATA low risk, in sospensione da terapia sostitutiva o sotto stimolo dell'ormone TSH ricombinante (rhTSH) nei pazienti a rischio intermedio o alto (vedi Tabella 8). La risposta viene definita eccellente se il valore di tireoglobulina basale è <0,1 ng/ml o quello sotto stimolo del TSH è <1 ng/ml, mentre è incompleta se tali valori sono rispettivamente >1 ng/ml o >10 ng/ml<sup>44, 82</sup>. Va inoltre sempre associato il dosaggio degli anticorpi anti-tireoglobulina (abTg), la cui presenza potrebbe sottostimare i valori di tireoglobulina<sup>44</sup>.

Le linee guida suggeriscono l'uso di radioisotopi dello iodio per eseguire una scintigrafia total-body in soggetti a rischio intermedio o elevato. Per tale esame viene somministrata una dose iodio radioattivo: l'uso dell'isotopo <sup>123</sup>I è preferibile in quanto a differenza del <sup>131</sup>I non porta ad aumentato rischio di fallimento terapeutico di un'eventuale successiva terapia ablativa a causa del fenomeno dello "stunning"<sup>44, 83</sup>; tale pratica non è però universalmente condivisa, principalmente a causa del notevole costo del <sup>123</sup>I rispetto al <sup>131</sup>I.

#### **2.5.4 Terapia radiometabolica**

Il trattamento ablativo con <sup>131</sup>I ha 4 obiettivi: 1) rimuovere residui di tessuto tiroideo in modo da rendere più accurato l'utilizzo della tireoglobulina sierica per il follow-up, 2) eliminare eventuali foci di malattia residua, metastasi linfonodali e a distanza, 3) ridurre il rischio di recidiva e 4) rilevare eventuali foci iodocaptanti patologici<sup>43, 84</sup>. Il suo utilizzo è indicato nei seguenti casi: 1) metastasi linfonodali non aggredibili chirurgicamente; 2) metastasi a distanza; 3) carcinoma T3-T4<sup>44</sup>.

L'attività di <sup>131</sup>I utilizzata varia a seconda del rischio di progressione della malattia valutata tramite la stadiazione ATA; vengono utilizzate dosi di 30 mCi per neoplasia a basso rischio, mentre possono essere utilizzate dosi superiori a 150 mCi in presenza di metastasi a distanza<sup>44</sup>.

Il paziente viene istruito a seguire una dieta povera di iodio ed evitare farmaci o esami di imaging con mezzo di contrasto iodato nel corso del mese antecedente il trattamento. In tale periodo viene inoltre sospesa la terapia ormonale sostitutiva in modo da aumentare i livelli di TSH, che devono superare le 30 mIU/l, in modo da massimizzare la sensibilità dei tireociti allo iodio. La disponibilità del rhTSH permette di eseguire la procedura senza sospensione del farmaco con notevole

incremento della qualità della vita del paziente<sup>43</sup>. Le linee guida ATA ne consigliano l'utilizzo solo in pazienti a basso rischio ed eventualmente a medio rischio, in quanto mancano ancora studi a lungo termine di non inferiorità nei pazienti ad alto rischio<sup>44</sup>.

Oltre agli effetti collaterali dovuti all'ipotiroidismo clinico che può venire indotto per la preparazione alla terapia, ci sono effetti avversi dovuti alla somministrazione di <sup>131</sup>I. Tali effetti tendono ad aumentare di frequenza ad attività più elevate e con esposizioni cumulative a terapia con radioiodio e possono essere suddivisi in precoci e tardivi. Tra quelli precoci ricordiamo nausea, xerostomia, scialoadenite, stenosi del dotto nasolacrimale, secchezza oculare, stomatite, disgeusia, alterazioni della gametogenesi, carie dentali, depressione midollare acuta; tra quelli a lungo termine sono rilevanti l'aumentato rischio di avere una seconda neoplasia maligna, fibrosi polmonare nei pazienti con metastasi polmonari, scialoadenite cronica, depressione midollare permanente, xeroftalmia cronica<sup>43, 85</sup>.

#### **2.5.5. Altre terapie**

Radioterapia esterna e chemioterapia sistemica non sono utilizzate di routine nel trattamento del tumore alla tiroide grazie all'eccellente controllo della malattia che si riesce ad ottenere nella quasi totalità dei casi grazie alla combinazione di trattamento chirurgico e terapia radiometabolica.

La radioterapia esterna stereotassica e i trattamenti termoablativi (con radiofrequenze o crioablazione) sono stati proposti come terapia per soggetti con poche metastasi refrattarie allo radioiodio, soprattutto nel caso queste siano sintomatiche. La radioterapia esterna stereotassica ricopre inoltre un ruolo rilevante nel trattamento delle metastasi encefaliche insieme alla terapia chirurgica, e può essere considerata in caso di tumori con estensione extratiroidea alla diagnosi<sup>44</sup>.

La chemioterapia citotossica ha dimostrato pochi effetti nei DTC: il più efficace farmaco appartenente a questa categoria è la doxorubicina che può essere utilizzata in rarissimi casi da sola o per potenziare un'eventuale RTE<sup>86</sup>.

Gli inibitori delle tirosin-kinasi (TKI), come il sorafenib e il lenvatinib, si sono dimostrati promettenti per il trattamento di malattia in stadio avanzato refrattaria allo iodio dimostrando un aumento della progression-free survival, ma presentano

effetti numerosi effetti avversi, alcuni dei quali potenzialmente letali. Mancano inoltre ancora studi in grado che dimostrino un aumento dell'overall survival dei pazienti trattati con TKI<sup>44</sup>.

### **2.5.6. Sorveglianza attiva**

Un protocollo di sorveglianza attiva è stato proposto nel 2003 da Ito et al. per PTMC a basso rischio<sup>87</sup>. A seguito di tale studio e all'aumento di incidenza dei PTMC l'ATA ha aggiunto tra le raccomandazioni il fatto che la sorveglianza attiva possa essere considerata come strategia terapeutica in tale tipologia di tumore<sup>44</sup>.

### **2.5.7 Follow-Up**

Il follow-up del paziente si avvale di varie tecniche per rilevare precocemente eventuali recidive di malattia, tra cui: controlli clinici periodici, ecografia, dosaggio di marcatori di malattia (Tg e abTg) scintigrafia total body, TC, 18-FDG PET.

La valutazione della Tg è un marker con eccellente sensibilità (96%) e specificità (94%) in condizioni ottimali. L'accuratezza della metodica è massima se il trattamento chirurgico è stato seguito dalla terapia radiometabolica e la misurazione viene eseguita in sospensione dalla terapia ormonale<sup>88</sup>. Il valore di Tg viene misurato inizialmente ogni 6-12 mesi, la cadenza degli esami ematochimici può essere ridotta nei pazienti a rischio basso o intermedio a 12-24 mesi. Circa ad un anno dal trattamento può essere eseguito un dosaggio della Tg sotto stimolo del rhTSH. La ripetizione di tale test in pazienti con una risposta eccellente non è consigliata grazie all'ottimo NPV (97%); in tali pazienti è sufficiente il monitoraggio a lungo termine della Tg basale<sup>44, 89, 90</sup>. La valutazione della Tg in pazienti non sottoposti a terapia con <sup>131</sup>I ha accuratezza inferiore ed i valori di cut-off ottimali non sono stati determinati; inoltre la Tg sotto stimolo risulta di scarsa utilità dovuta al basso PPV. In tali pazienti è più utile valutare l'andamento della tireoglobulina nel tempo, in quanto un suo aumento può essere sospetto per una ripresa della malattia<sup>44</sup>.

La presenza di anticorpi anti-Tg dosabili, condizione presente in circa il 20-25% dei pazienti affetti da cancro alla tiroide, può portare a valori erroneamente bassi o addirittura indosabili di Tg<sup>44, 91, 92</sup>. Esistono metodi di dosaggio della Tg che non risentono della presenza di abTg ma non hanno la stessa sensibilità degli assay convenzionali migliori e non sono pertanto entrati in utilizzo nella pratica clinica.

È stato evidenziato in vari studi che l'andamento degli anticorpi monoclonali possa essere utilizzato come marker surrogato di persistenza e risposta alla terapia: i livelli di abTg nei pazienti in cui questi sono dosabili prima del trattamento tendono a diminuire fino alla normalizzazione entro tre anni; viceversa l'aumento del valore degli abTg è un fenomeno da monitorare in quanto possibile segnale di ripresa di malattia<sup>93, 94</sup>.

L'ecografia è l'esame di imaging impiegato di routine per il follow-up dei pazienti trattati per DTC. La prima ecografia dovrebbe essere eseguita 6-12 mesi dopo il trattamento ed essere ripetuta periodicamente a seconda del rischio iniziale di ricorrenza e dei risultati degli esami clinici e dei livelli di Tg. Durante ogni esame ecografico vanno esaminati la loggia tiroidea e i compartimenti linfonodali centrale e laterocervicale; eventuali linfonodi sospetti di grandi dimensioni (>1cm) possono essere valutati tramite esame citologico su FNA e quantificazione dei livelli di Tg nel liquido di lavaggio dell'ago<sup>43, 44</sup>.

La ripetizione della scintigrafia total body con radioiodio non è indicata in pazienti a basso rischio negativi alla prima scintigrafia post-trattamento radiometabolico e con Tg, abTg e ecografia negativi<sup>44, 95</sup>. Il suo utilizzo è indicato in pazienti classe ATA ad alto rischio e nei pazienti con aumento di Tg, abTg o ecografia positiva<sup>44</sup>.

TC e RMN con o senza mezzo di contrasto sono utilizzabili per definire una recidiva locoregionale a completamento dell'ecografia, in caso di interessamento linfonodale massivo, o in casi sospetti di invasione del tratto respiratorio o digestivo per valutare l'estensione dell'invasione<sup>44</sup>. La RMN è l'esame più indicato in caso di sospetto di metastasi al sistema nervoso centrale, delle ossa e del fegato<sup>96</sup>, mentre la TC è più sensibile nella valutazione di nodularità polmonari<sup>97</sup>.

Entrambe le tecniche possono inoltre essere utilizzate, unitamente alla 18FDG-PET, per definire eventuali metastasi in pazienti con Tg o abTg elevati e refrattari allo iodio<sup>44, 45</sup>. La 18FDG-PET in combinazione con la TC per la ricerca di metastasi ha sensibilità di 93% e specificità 81%<sup>98</sup>. Tale accuratezza è influenzata da istotipo (maggiore nella variante a cellule di Hürthle), differenziazione del tumore, carico tumorale, valore di Tg sotto stimolo e valore di TSH al momento dello scan<sup>96</sup>.

La risposta alla terapia durante il follow-up viene divisa dall'ATA in 4 classi; tali classi e le rispettive implicazioni terapeutiche sono riassunte nella Tabella 11.

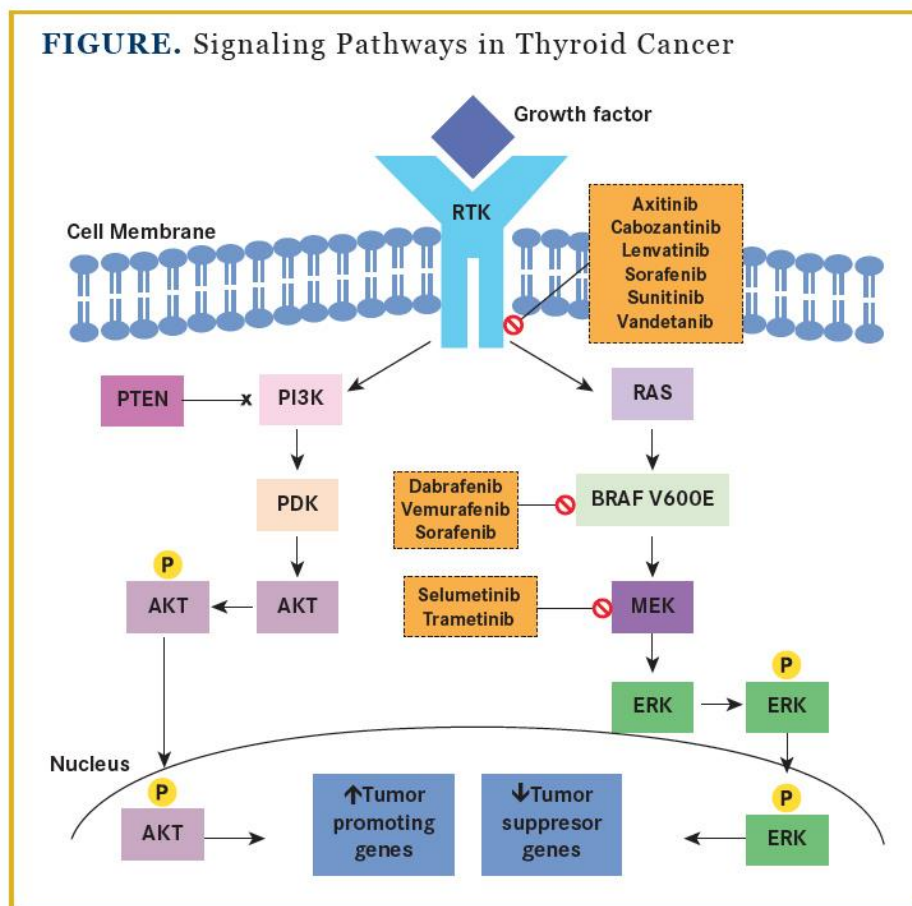
Tabella 11 Valutazione della risposta alla terapia dei carcinomi tiroidei differenziati<sup>44</sup>

Categoria	Definizione	Outcome clinico	Gestione
<b>Risposta eccellente</b>	Imaging negativo e/o Tg soppressa <0.2 ng/mL o Tg stimolata <1 ng/mL	1%–4% recidiva malattia relata <1% morte malattia relata	Precoce riduzione dell'intensità e frequenza del follow-up e riduzione del grado di soppressione del TSH.
<b>Risposta biochimica incompleta</b>	Imaging negativo e Tg soppressa ≥1 ng/mL o Tg stimolata ≥10 ng/ml o Valori crescenti di antiTg	Almeno 30% evolve spontaneamente in NED 20% raggiungono lo stato NED dopo una terapia addizionale 20% sviluppano malattia strutturale <1% morte malattia relata	Se associata a valori di Tg stabili o in diminuzione, una risposta biochimica incompleta dovrebbe prevedere un'osservazione continua in corso di soppressione del TSH in molti pazienti. Valori crescenti di Tg o antiTg dovrebbero imporre accertamenti addizionali e potenzialmente terapie ulteriori.
<b>Risposta strutturale incompleta</b>	Evidenza strutturale o funzionale di malattia in presenza di qualsiasi valore di Tg in presenza o assenza di antiTg	50%–85% continuano ad avere persistenza di malattia nonostante terapia addizionale Tasso di morte malattia relata: 11% se metastasi locoregionali, 50% se metastasi strutturali a distanza	Una risposta strutturale incompleta può portare ad ulteriori trattamenti o ad osservazione continua in base a multipli fattori clinico-patologici (dimensioni, sede, tasso di crescita, avidità per lo iodio, avidità per FDG, caratteristiche specifiche delle lesioni strutturali)
<b>Risposta indeterminata</b>	Reperti imaging aspecifici Debole captazione alla scintigrafia con iodio Tg non stimolata misurabile, ma <1 ng/mL o Tg stimolata misurabile, ma <10 ng/mL o AntiTg stabili o in diminuzione in assenza di malattia strutturale o funzionale	15%–20% avranno malattia strutturale indetificata nel corso del follow-up Nei restanti, i reperti aspecifici rimangono stabili o si risolvono <1% morte malattia relata	Una risposta indeterminata dovrebbe prevedere un'osservazione continua con imaging seriato delle lesioni aspecifiche e monitoraggio della Tg. I reperti aspecifici che divengono sospetti nel tempo possono essere approfonditi con imaging aggiuntivi o biopsia

## 2.6 Patogenesi molecolare dei carcinomi differenziati

Ad oggi sono stati descritti molti meccanismi alla base della carcinogenesi: mutazioni geniche puntiformi, amplificazioni geniche, traslocazioni, modifiche epigenetiche<sup>99</sup>. Queste alterazioni portano ad un'alterata funzione di varie vie di segnale, tra cui le più importanti sono la via MAPK/ERK e la via di PI3K-AKT<sup>100</sup>, 101 (Figura 1).

Figura 1 Vie di segnale più frequentemente alterate nella patogenesi del carcinoma tiroideo differenziato e farmaci che agiscono su tali vie, tratta da *Thyroid Cancer: Molecular Pathogenesis, Tyrosine Kinase Inhibitors, and Other New Therapies*<sup>100</sup>



### 2.6.1 Via MAPK/ERK

Le MAPK sono delle serina/treonina chinasi che trasmettono stimoli extracellulari e regolano proliferazione, differenziazione, motilità e sopravvivenza cellulare; alterazioni di questa via sono state correlate al processo tumorigenico in vari organi.

Le vie di segnalazione delle MAPK convenzionali sono state estremamente conservate e consistono in una cascata enzimatica costituita da MAPK, MAPK



kinasi (MAPKK) e MAPKK kinasi (MAPKKK); tali proteine sono conosciute nell'uomo come Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma=MAPKKK), Mek (Mapk/Erk Kinase=MAPKK) e Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase = MAPK). Fisiologicamente l'attivazione della via è controllata da varie molecole, quali citochine, fattori di crescita e ormoni attraverso l'azione attivante dei loro recettori su Ras, (RAf Sarcoma), una piccola GTPasi che si può trovare in due conformazioni: inattivata quando lega GDP (Guanosine DiPhosphate) e attivata quando lega GTP (Guanosine TriPhosphate); in forma attivata Ras è in grado di fosforilare Raf attivandola. I segnali extracellulari agiscono mediante recettori tirosin-kinasici di membrana che attivano proteine della famiglia delle Ras GEF (Guanoside nucleotide Exchange Factor) portando allo scambio del GDP legato a Ras col GTP e all'induzione della cascata fosforilativa. Erk infine fosforila varie proteine citosoliche e nucleari mediando gli effetti cellulari della via di segnale<sup>101-103</sup>.

### **2.6.2 Via di segnale di PI3K-Akt**

PI3K-Akt è un'altra via di segnale che ha varie funzioni: regola infatti l'accumulo di glucosio, sopravvivenza, migrazione e proliferazione cellulare. Le fosfatidilinositolo 3-kinasi (PI3K) sono delle proteine in grado di fosforilare il gruppo idrossile in posizione 3 del fosfatidilinositolo. Vengono divise in 4 classi, di cui la classe I è la più importante nella carcinogenesi. Le proteine della classe I sono eterodimeri formati da una subunità regolatoria (p85) e una subunità catalitica (p110), e sono a loro volta divise nelle due sottoclassi IA se sono attivate da recettori tirosin-kinasici e IB se sono attivate da recettori associati a proteine G; oltre a queste vie PI3K può essere attivata direttamente dall'interazione con Ras, fungendo quindi da effettore della via delle MAPK. Il substrato delle PI3K di classe I è il fosfoinositolo-4-5-bifosfonato (PIP2) che viene fosforilato a fosfoinositolo-3-4-5-trifosfonato (PIP3). Tale fosfolipide recluta attraverso il suo dominio PH (Pleckstrin homology) due proteine, Akt, detta anche PKB (Proteinkinasi B), e PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1). Questo porta alla fosforilazione ed attivazione di Akt da parte di PDK1. Akt è una serina/treonina kinasi che fosforila varie proteine a valle, regolandone l'azione. Tra le proteine modulate da Akt ricordiamo mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) e il suo regolatore Tsc2 (Tuberous sclerosis 2) favorendo la crescita cellulare, la sintesi proteica e

l'accumulo di glucosio. Vengono inoltre inattivate Bad (Bcl-2 Associated Death promoter) e la procaspasi-9, riducendo la sensibilità della cellula agli stimoli apoptotici. La proteina PTEN (Phosphatase and TENsin homologue) ha azione inattivante sulla via di segnale, catalizzando la defosforilazione di PIP3 a PIP<sub>3</sub><sup>101, 102, 104</sup>.

### **2.6.3 BRAF**

Raf è una superfamiglia di serina/treonina kinasi implicate nel controllo della via di defosforilazione di PIP3. Essa comprende tre isoforme: A-Raf, B-Raf e C-Raf; tutte e tre possono fungere da proto-oncogeni; B-Raf è il più frequentemente implicato nel processo di carcinogenesi.

Il gene codificante BRAF si trova sul braccio lungo del cromosoma 7. La mutazione più frequente (>95%)<sup>105</sup> di tale gene è la sostituzione puntiforme T1779A che provoca sostituzione di una valina con un acido glutammico in posizione 600 (BRAF V600E). La sostituzione di un amminoacido idrofobico con uno carico mima la fosforilazione nei siti di attivazione della proteina wild-type (T599 e S602), ciò porta all'allineamento del sito ATP-binding e i siti di riconoscimento dei peptidi e permette l'accesso al sito catalitico. Il risultato finale è un aumento dell'attività kinasica, pari a 500 quello di quella wild-type, e l'attivazione costitutiva della MAPK Pathway<sup>106, 107</sup>.

La mutazione BRAF V600E è associata alle varianti classica e a cellule alte del PTC<sup>108</sup> ed è la mutazione di più frequente riscontro nel carcinoma tiroideo. La sua prevalenza nei PTC varia molto nei vari studi (30-80%)<sup>53, 54</sup> ma si attesta mediamente sul 45%<sup>105, 109</sup>. Tale prevalenza è nettamente inferiore nei pazienti pediatrici, in cui l'evento molecolare più tipico è rappresentato dalle traslocazioni cromosomiche<sup>110</sup>.

La mutazione è stata associata a sviluppo di malattia più aggressiva e prognosi peggiore nei pazienti in cui è presente rispetto ai pazienti con variante *wt*BRAF: la presenza della mutazione si associa ad aumentato rischio di invasione dei tessuti extra-tiroidei, di metastasi linfonodali e a distanza; a causa di ciò i tumori BRAF V600E si presentano più frequentemente in stadio avanzato<sup>109, 111, 112</sup>. Inoltre i tumori BRAF V600E sono meno responsivi alla terapia radiometabolica a causa della downregolazione di geni implicati nel metabolismo dello iodio, come NIS

(Na/I Symporter), TPO (ThyreoPerOxydase) e Pendrina; questo effetto è più spiccato per mutazioni di BRAF rispetto ad altre mutazioni che agiscono sulla MAPK pathway come mutazioni di Ras o la mutazione RET/PCT<sup>113</sup>. La somma di questi effetti di BRAF porta sia ad un aumento rischio di ricorrenza e persistenza<sup>108, 111, 112</sup> che di quello di mortalità<sup>114, 115</sup>.

Alla luce di questi studi, l'ATA ha inserito la valutazione dello stato mutazionale di BRAF tra i parametri utilizzati nella stratificazione della malattia<sup>44</sup> (vedi Tabella 8).

#### **2.6.4 RAS**

Le proteine RAS sono GTPasi che fungono da trasduttori di segnale dei recettori Tirosin Kinasici e delle proteine G nelle vie di MAPK e PI3K-Akt. Le proteine Ras si trovano in due conformazioni: inattivata quando il nucleotide che legano è il GDT, e attivata quando è GTP. Lo stato di attivazione di Ras è finemente controllato dalle proteine GEF, con funzione attivante, e GAP (GTPase activating protein) che hanno funzione inattivante<sup>101</sup>.

Esistono 3 isoforme della proteina Ras: HRAS, KRAS e NRAS. Le alterazioni più comuni di Ras sono mutazioni puntiformi nel sito di legame con GAP (codoni 12, 13) e nel sito allosterico (codone 61); l'effetto finale è il mantenimento della conformazione attiva a causa della diminuita idrolisi del GTP legato a Ras<sup>116</sup>. Il carcinoma tiroideo è l'unico tumore in cui sono state descritte mutazioni di tutte e tre le isoforme. La mutazione più comunemente rilevata nei DTC è la mutazione Q61K dell'isoforma N (circa 88% delle mutazioni di RAS), ossia la sostituzione della guanina in posizione 61 con una lisina<sup>117</sup>. Mutazioni di RAS sono state descritte nel 25-45% dei FTC, nel 15-40% degli adenomi follicolari (FA) e nei 5-10% dei PTC<sup>117, 118</sup>. Ras è più frequentemente mutato negli FTC classici (circa 50%) che nei carcinomi a cellule di Hürthle (11%); inoltre la mutazione NRAS Q61K non è stata descritta in questi ultimi; la prevalenza è piuttosto elevata nei FVPTC, raggiungendo il 25-45%<sup>117</sup>.

Il ruolo prognostico delle mutazioni di Ras è ancora incerto: Fukahori et al. nel 2012 ha rilevato una correlazione statisticamente significativa tra la mutazione del codone 61 di NRAS e la presenza di metastasi a distanza<sup>119</sup>, a conferma di uno studio precedente in cui i PTC con RAS mutato presentavano un comportamento

più aggressivo<sup>120</sup>. Di contro un recente studio di Medici et al. ha invece riscontrato nei pazienti con mutazione di RAS un fenotipo a basso rischio di carcinoma<sup>121</sup>.

### **2.6.5. hTERT**

Le cellule somatiche hanno un numero limitato di replicazioni a cui possono andare incontro, superato il quale vanno incontro a fenomeni di senescenza e crisi. I telomeri sono nucleoproteine composte da regioni di DNA formate da ripetizioni dell'esanucleotide 5'-TTAGGG-3' posizionate alle estremità dei cromosomi e sono deputati a garantire l'integrità cromosomica. In relazione al metodo di funzionamento della DNA polimerasi III essi vengono accorciati ad ogni replicazione del DNA; quando diventano troppo brevi non sono più in grado di proteggere le estremità cromosomiche. Ciò porta alla fusione dei cromosomi ed alla morte della cellula per apoptosi; questo è uno dei meccanismi che limitano il potenziale replicativo delle cellule e prende il nome di crisi telomerica.

Una cellula per divenire tumorale deve quindi ottenere un potenziale replicativo illimitato, ossia deve diventare immortale. Uno dei meccanismi con cui ciò può accadere è la riattivazione della telomerasi, una proteina espressa nelle cellule embrionali ma silenziata nelle cellule dell'adulto, a parte rare eccezioni (e.g. le cellule germinali)<sup>122</sup>. La telomerasi è una DNA polimerasi RNA dipendente costituita da 2 subunità catalitiche (hTERT, ossia human TELomerase Reverse Transcriptase), due template RNA (TERC, ossia TELomerase RNA Component) e due proteine coinvolte nell'assemblaggio della telomerasi: diskarina (DKC1) e Nop10<sup>123</sup>. La telomerasi si lega ai telomeri ed utilizza il template RNA per allungarli; in questo modo la cellula è in grado di evitare la crisi telomerica.

La riattivazione della telomerasi nei tumori tiroidei è dovuta ad una mutazione del promotore di hTERT, posto 330bp a monte del codone di inizio. Esistono due hotspot mutazionali di tale promotore ossia chr5, 1,295,228 C>T (C228T) e 1,295,250 C>T (C250T). Tali mutazioni del promotore hTERT portano alla formazione di un sito di legame (consensus binding site) in grado di legare fattori di trascrizione che aumentano l'attività trascrizionale del gene. Le due mutazioni sono mutualmente esclusive e la prima è molto più prevalente della seconda; la presenza di una delle due mutazioni è stata rilevata nel 10-15% dei DTC, con

percentuali leggermente superiori nei FTC. Non sono state rilevate mutazioni di hTERT nei tumori benigni.

I tumori con mutazioni di hTERT sono associati ad età più avanzata al momento della diagnosi e hanno prognosi peggiore. In particolare diversi studi hanno confermato un rischio di metastasi più elevato, una presentazione clinica in stadio più avanzato ed un aumentato rischio di recidiva e di mortalità<sup>124</sup>. Le mutazioni di hTERT e BRAF agiscono in maniera sinergica e la loro coesistenza rappresenta un indicatore prognostico estremamente negativo, poiché associata a tumori poco differenziati e molto aggressivi<sup>124-126</sup>. Si è ipotizzato che ciò avvenga anche tra le mutazioni di hTERT e Ras, ma tale correlazione è stata meno studiata e non ci sono ad oggi evidenze forti che dimostrino ciò<sup>124</sup>.

#### **2.6.6 PTEN**

Il compito di PTEN è la modulazione negativa della via di PI3K-Akt; ciò avviene grazie alla sua azione fosfatase in grado di convertire PIP3 a PIP2 inattivando così la via di segnale. Mutazioni loss-of-function di PTEN provocano iperattivazione della via PI3K-Akt e sono state descritte sia in DTC sporadici che associati a sindromi genetiche. L'inattivazione di PTEN può avvenire per mutazione puntiforme, delezione, modifiche epigenetiche o post-traduzionali.

Pazienti che ereditano la mutazione di PTEN dai genitori sviluppano sindrome amartomatosa, che comprende la sindrome di Cowden e la sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba (Tabella 1). Il FTC si sviluppa in circa il 5-10% dei pazienti affetti da sindrome di Cowden e ne rappresenta uno dei criteri diagnostici maggiori<sup>23</sup>.

Mutazioni sporadiche di PTEN sono associate al FTC e al carcinoma anaplastico della tiroide (ATC), una forma altamente aggressiva con prognosi pessima. La prevalenza di tale mutazione è stata stimata essere circa 8% nei FTC, 2% nei PTC e 11% nei ATC<sup>127</sup>.

Il significato prognostico di PTEN nel carcinoma tiroideo è ancora incerto: tale mutazione è stata infatti correlata a invasione linfonodale laterocervicale ed estensione extratiroidea in uno studio del 2013 da Min et al.<sup>128</sup>, a differenza di quanto rilevato da Beg et al. nel 2015<sup>129</sup>.

### **2.6.7 PI3KCA**

PI3KCA codifica per la subunità P110 $\alpha$  di PI3K. Esso è un proto-oncogene in grado di portare all'iperattivazione della via di PI3K-Akt. Le mutazioni più frequenti che colpiscono tale gene sono duplicazioni (25% degli FTC) e mutazioni puntiformi gain-of-function (circa 10% degli FTC); le mutazioni puntiformi di PI3KCA sono mutualmente esclusive con quelle di PTEN<sup>127</sup>. Le duplicazioni di tale gene sono presenti nel 24% degli FTC e nel 40% degli ATC; mentre sia le mutazioni che le duplicazioni sono rare nei PTC<sup>130</sup>. È stato ipotizzato che la via delle MAPK sia implicata nel processo carcinogenico dei PTC mentre quella di PI3K-Akt in quello dei FTC e ATC; nonostante ciò c'è un'alta prevalenza di amplificazione di PI3KCA nei PTC in uno studio condotto su pazienti mediorientali, la cui causa è ancora ignota<sup>131</sup>.

### **2.6.8 RET**

RET (REarranged during Transfection) è un recettore tirosin kinasico implicato nella trasduzione di segnali extracellulari attraverso l'attivazione della via MAPK. Il suo gene codificante è localizzato nel cromosoma 10. Fisiologicamente nell'adulto RET viene espresso nei gangli enterici, nelle cellule cromaffini della midollare del surrene, nei gangli sensoriali ed autonomici del sistema nervoso periferico, nelle cellule C della tiroide e nelle cellule germinali del testicolo, dove lo stimolo mediato da fattori neurotrofici ligandi di tale recettore portano ad azione antiapoptotica. Il meccanismo di attivazione di RET nel PTC è un riarrangiamento cromosomico che porta alla formazione di varie proteine chimeriche chiamate RET/PTC, aventi attività costitutiva. Le inversioni paracentriche sono più comuni e danno origine a RET/PTC1 e RET/PTC3, dovute alla fusione del gene RET rispettivamente coi geni CCDC6 e NCOA4; RET/PTC2 è più rara ed è dovuta a una traslocazione<sup>132</sup>. Si pensa che tali aberrazioni cromosomiche siano indotte da errori nel processo di riparazione del DNA dopo la rottura di filamento o all'esposizione ad uno stimolo genotossico, come le radiazioni ionizzanti; il processo è favorito dalla vicinanza fisica dei locus genici dei geni RET, CCDC6 e NCOA4 nella cromatina delle cellule follicolari della tiroide. La prevalenza delle mutazioni varia notevolmente nella Letteratura, avendo in media valore di 20-25%<sup>133</sup>. Tale variabilità può essere attribuita a fattori ambientali e alla metodologia di rilevazione della mutazione; è particolarmente frequente nei pazienti pediatrici esposti a

radiazioni<sup>133</sup>. Nei soggetti pediatrici affetti da DTC provenienti da zone contaminate dalle radiazioni in Bielorussia si è riscontrata una prevalenza del 77%<sup>134</sup>.

L'effetto pro-tumorale della proteina chimerica può essere dato oltre che dall'attivazione di MAPK dall'attività del gene a cui si è fuso RET: ad esempio RET/PTC2 porta alla fusione di RET con PRKARIA, un gene oncosoppressore che viene così inattivato<sup>134</sup>.

Il significato prognostico del riarrangiamento RET/PTC è incerto<sup>135</sup>; inoltre sembra che RET/PTC3 possa avere un fenotipo più aggressivo rispetto a RET/PTC1<sup>134</sup>.

Mutazioni puntiformi di RET sono alla base della sindrome MEN2 (Multiple Endocrine Neoplasia) e della FMTC (Familial Medullary Thyroid Cancer). Sono inoltre presenti in molti MTC sporadici<sup>132</sup>.

#### **2.6.9 PAX8/PPAR $\gamma$**

PAX8/PPAR $\gamma$  è una proteina chimerica dovuta alla traslocazione tra la regione 2q13 e quella 3p25. La proteina di fusione PFP (PAX8PPAR $\gamma$ 1 Fusion Protein) mantiene i siti di legame al DNA di entrambi i fattori di trascrizione PAX8 e PPAR $\gamma$ . PFP è sotto il controllo del promotore del PAX8, il quale è molto attivo nelle cellule follicolari della tiroide.

PAX8 (Paired Box gene 8) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione Paired Box e nella sua forma *wild type* è necessario per il normale sviluppo della tiroide. Nel tireocita adulto PAX8 promuove l'espressione di vari geni tiroide specifici, quali Tg, TPO e NIS. Mutazioni di PAX 8 loss-of-function sono una causa nota di ipotiroidismo congenito.

PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ) è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia dei recettori nucleari. Ha ruolo preponderante nella regolazione del metabolismo lipidico e della sensibilità all'insulina, oltre a stimolare risposte anti-infiammatorie. Modelli murini knockout per PPAR $\gamma$  sviluppano carcinoma follicolare della tiroide, facendo ipotizzare un suo ruolo come oncosoppressore<sup>136</sup>.

La presenza di PFP è stata rilevata in circa il 36% dei FTC, mentre è molto più rara negli altri istotipi. È stato ipotizzato che la perdita dell'azione oncosoppressiva

di PPAR $\gamma$  possa avere un ruolo nella carcinogenesi; è possibile inoltre che entri in gioco anche un'alterata regolazione dei geni sotto il controllo di PAX8 (TPO, Tg, TSHR e NIS). Cellule in vitro trasfettate con PFPF hanno mostrato aumento della velocità di accrescimento, aumentata sintesi di DNA, diminuzione del numero di cellule in fase G0/G1 e diminuzione del numero di cellule apoptotiche<sup>137</sup>.

Il ruolo prognostico di tale evento molecolare non è chiaro: uno studio comparativo tra FTC con o senza PFPF non ha dimostrato alcuna differenza prognostica tra i due sottogruppi, ma tale risultato potrebbe essere dovuto alla bassa numerosità del campione<sup>138</sup>.

### **2.6.10 TP53**

TP53 (Tumor Protein 53) è un fattore di trascrizione implicato in molti processi oncosoppressivi. Vari segnali di stress o danno cellulare come radiazioni, chemioterapici, bassa tensione di ossigeno, demetilazione del DNA, carenza di nucleotidi, blocco della trascrizione o iperattivazione di oncogeni possono portare a stabilizzazione della proteina TP53. La via di segnale a valle di TP53 porta al blocco del ciclo cellulare, attivazione dei sistemi di riparazione del DNA, blocco dell'angiogenesi, senescenza ed eventualmente apoptosi.

TP53 è il gene più frequentemente mutato nei carcinomi e l'evento molecolare più comune è solitamente una mutazione puntiforme missenso. Tale mutazione porta a perdita della funzione oncosoppressiva di P53 e acquisizione di caratteristiche oncogeniche come un'attività antiapoptotica; inoltre a causa della conformazione tetramericica di TP53 la mutazione risulta essere dominante negativa in quanto interferisce con la funzione di *wt*TP53<sup>139</sup>.

La mutazione di TP53 è stata associata soprattutto a ATC mentre è raro nei DTC; è stato pertanto avanzata l'ipotesi che TP53 sia implicato nella progressione della malattia a forme meno differenziate e più aggressive<sup>140</sup>.

L'overespressione di TP53 viene considerata un segno indiretto di mutazione in quanto la proteina non funzionante non viene degradata da mdm2 (mouse double minute homologue 2); la prevalenza di tale evento nei DTC è circa 10%-20%<sup>141-143</sup>.

Dagli studi riportati in Letteratura si evince che mutazioni a carico di TP53 abbiano un significato prognostico negativo<sup>144-146</sup>.





### **3. Scopo della tesi**

Gli scopi dello studio sono:

- 1) caratterizzazione clinica dei casi dei DTC ad alto rischio dell'adulto;
- 2) caratterizzazione molecolare con riferimento allo studio delle mutazioni puntiformi dei geni BRAF, RAS, TP53, PTEN, PIK3CA e del promotore di TERT nei DTC ad alto rischio nella popolazione adulta;
- 3) correlazione tra gli aspetti clinici e molecolari;
- 4) confronto tra il profilo clinico-molecolare dei DTC dell'adulto ad alto rischio con quelli a basso rischio.

## **4. Materiali e Metodi**

### **4.1 Pazienti studiati**

I pazienti sono stati invitati a firmare il consenso informato prima di procedere all'analisi molecolare. Sono stati selezionati 119 pazienti sottoposti a tiroidectomia totale (tra il 2007 e il 2016) e seguiti presso l'U.O.C di Endocrinologia ed il reparto di Radioterapia di Padova con le seguenti caratteristiche: 1) DTC di dimensione >40mm alla diagnosi o 2) DTC metastatico alla diagnosi o di riscontro durante il follow-up.

Tutti i pazienti selezionati sono stati sottoposti a trattamento radiometabolico, con dose mediana somministrata di 200 mCi; inoltre 45/119 (38%) pazienti sono anche stati sottoposti a dissezione linfonodale.

I dati anagrafici, clinici e istopatologici sono stati ricavati da database elettronici. E' stata utilizzata l'ottava classificazione del TNM<sup>59</sup>.

Le caratteristiche clinico-molecolari dei pazienti ad alto rischio sono state confrontate con quelle di 144 pazienti consecutivi per studio molecolare, sottoposti a intervento chirurgico per diagnosi di DTC tra il 2007 e il 2010 e seguiti presso il reparto di Radioterapia e l'U.O.C. di Endocrinologia dell'Ospedale di Padova.

### **4.2 Analisi molecolare**

#### **4.2.1 Estrazione di DNA**

L'estrazione del DNA dal tessuto patologico tumorale è stata eseguita utilizzando il protocollo del kit QIAmp DNA tissue mini Kit (Qiagen). La procedura di purificazione comprende 4 fasi: lisi del campione biologico, assorbimento/legame del DNA alla membrana di silicio contenuta nella colonnina QIAamp, lavaggio e rimozione dei residui contaminanti, eluzione del DNA.

#### **4.2.2 Determinazione della concentrazione di DNA**

Il campione di DNA estratto dal tessuto viene analizzato grazie a uno spettrofotometro, il quale è in grado di valutare la concentrazione di acidi nucleici tramite la lettura della densità ottica alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Il campione da analizzare con lo spettrofotometro viene ottenuto miscelando 20 microlitri di DNA a 980 microlitri di acqua milliQ, ottenendo quindi una soluzione diluita 50 volte rispetto a quella madre.

Tale soluzione viene quindi esaminata a 3 lunghezze d'onda: 260, 280 e 320nm. L'assorbanza a 260nm consente di ricavare la concentrazione di DNA del campione. La lunghezza d'onda di 280 nm corrisponde al picco di assorbimento delle proteine, che rappresentano la fonte principale di contaminante. La presenza di assorbimento a 320nm indica una contaminazione del DNA da parte di solventi organici.

Viene calcolato il grado di purezza facendo il rapporto tra le assorbanze a 260 e 280 nm, il campione viene ritenuto accettabile se tale valore è compreso tra 1,8 e 2,0. Nel caso fossero ottenuti valori inferiori è opportuno ripetere l'estrazione.

#### **4.2.3. Amplificazione del DNA**

Successivamente alla purificazione il campione viene sottoposto alla polymerase chain reaction (PCR). Tale tecnica permette di amplificare selettivamente specifiche sequenze di DNA od in una popolazione complessa di cDNA. L'amplificazione necessita di due inneschi (primers) oligonucleotidici complementari alle sequenze che delimitano la regione da amplificare. La soluzione composta da buffer, enzimi, primer e DNA viene inserita nel termociclatore dove hanno luogo ripetuti cicli di riscaldamento e raffreddamento, in modo da ottenere l'amplificazione del DNA ad opera della DNA polimerasi. Tale procedura è in linea teorica in grado di raddoppiare la quantità della sequenza bersaglio nel campione per ciclo.

Tramite PCR sono stati amplificati l'esone 15 di BRAF, gli esoni 2 e 3 di H-, K-, N-RAS, gli esoni 5, 6, 7 e 8 di TP53, il promotore di TERT, gli esoni 5, 7 e 8 di PTEN, gli esoni 9 e 20 di PIK3CA (Tabella 12).

Tab 12: Tabella dei Primer utilizzati

GENE	PRIMER FORWARD 5'-3'	PRIMER REVERSE 5'-3'
<i>NRAS ex2</i>	GACTGAGTACAAACTGGTGG	GGGCCTCCTCTATGGTG
<i>NRAS ex3</i>	GGTGAAACCTGTTTGTGGGA	ATACACAGAGGAAGCCTTCG
<i>HRAS ex2</i>	CAGGCCCTGAGGAGCGATG	TTCGTCCACAAAATGGTTCT
<i>HRAS ex3</i>	TCCTGCAGGATTCCTACCGG	GTTACCTGTACTGGTGGA
<i>KRAS ex2</i>	GACTGAATATAAACTTGTGG	CTGTATCAAAGAATGGTCCT
<i>KRAS ex3</i>	GACTGTGTTTCTCCCTTCT	TGGCAAATACACAAAGAAAG
<i>BRAF ex15</i>	GCACAGGGCATGGACTT	GATGACTTCTGGTGCCATCC
<i>PIK3CA ex9</i>	TGGTCTTTCTGTCTCTGA	TGAGATCAGCCAAATTCAGTT
<i>PIK3CA ex20</i>	TGCTCCAAACTGACCAAAGT	ACAGTGCAGTGTGGAATCCA
<i>PTEN ex5</i>	ACCACAGTTGCACAATATCCT	AATCTAGGGCCTCTTGTGCC
<i>PTEN ex7</i>	TGACAGTTTGACAGTTAAAGGCA	TGTCTACCAATGCCAGAGT
<i>PTEN ex8</i>	GTGCAGATAATGACAAGGAATA	GACTTGTATGTATGTATGTGT
<i>TP53 ex5</i>	TTCCACACCCCGCCCGCA	ACCCTGGGCAACCAGCCCTG
<i>TP53 ex6</i>	ACAGGGCTGGTTGCCAGGG	AGTTGCAAACCAGACCTCAG
<i>TP53 ex7</i>	ACTGGCCTCATCTGGGCCT	GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT
<i>TP53 ex8</i>	TAAATGGGACAGGTAGGACC	TCCACCGTCTTGTCTCTGC
<i>hTERT</i>	AGTGGATTCGCGGGCACAGA	GAGTTTCAGGCAGCGCTGC

Il campione ottenuto dalla PCR viene successivamente verificato tramite un'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% (P/V) in TAE (50X).

#### 4.2.4 Purificazione dei prodotti della PCR

La purificazione dei prodotti di PCR è necessaria per eliminare sali, proteine, resine, primer e viene eseguita grazie alle colonnine Microcon (centrifugal filter devices) Millipore.

#### 4.2.5 PCR di sequenza e successiva purificazione

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

Al termine di tale procedura il prodotto viene purificato da Sali, dNTP e molecole a basso peso molecolare mediante colonnine AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare).

Il prodotto di tale purificazione viene dunque processato al sequenziatore automatico ABI PRISM (Applied Biosystems) per determinare le sequenze.

### 4.3 Analisi Statistica

Le variabili quantitative sono state caratterizzate dalla mediana e dai valori estremi, mentre le variabili qualitative sono state riportate come frequenze e percentuali. Le

mediane sono state confrontate mediante test di Mann-Whitney. Il confronto tra variabili qualitative è stato eseguito utilizzando il test del  $\chi^2$ ; la probabilità di sopravvivenza libera da malattia è stata stimata tramite il metodo Kaplan-Meier.

Il software utilizzato per l'analisi statistica è MedCalc versione 17.1. Tutti i test utilizzati sono bilaterali ed è stato considerato statisticamente significativo un p-value <0,05.

## 5. Risultati

### 5.1 Caratterizzazione clinico-molecolare dei casi di DTC ad alto rischio dell'adulto

#### 5.1.1. Caratterizzazione clinica

Dei soggetti selezionati, il 53% presentava un tumore di dimensioni > 40 mm, 35% presentava metastasi a distanza, 12% presentava entrambe le caratteristiche (Tabella 13)

*Tabella 13 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti selezionati; PTC, Carcinoma papillare della tiroide; FTC, Carcinoma follicolare della tiroide; WI-FTC carcinoma follicolare della tiroide estesamente invasivo; MI-FTC carcinoma follicolare della tiroide minimamente invasivo; FU, follow-up.*

Variabile	>40mm (n=63)	Metastatici (n=42)	>40mm e M+ (n=14)	p-value
<b>Sesso, F:M</b>	40:23 (1,73:1)	27:15 (1,8:1)	3:11 (0,27:1)	<0,01
<b>Età alla diagnosi, anni</b>				<0,01
Mediana	47	60	62	
Range	21-91	24 – 77	37-78	
<b>Dimensione, mm</b>				<0,01
Mediana	45	15	52	
Range	40 – 85	2 – 35	40-90	
<b>T</b>				<0,01
X	0/63 (0%)	2/41 (5%)	0/14 (0%)	
1	0/63 (0%)	22/41 (53%)	0/14 (0%)	
2	11/63 (18%)	10/41 (24%)	1/14 (7%)	
3	50/63 (79%)	1/41 (2%)	10/14 (72%)	
4	42/63 (3%)	6/41 (14%)	3/14 (21%)	
<b>N</b>				<0,01
X	33/63 (52%)	6/42 (14%)	4/14 (29%)	
0	19/63 (30%)	9/42 (22%)	4/14 (29%)	
1	11/63 (17%)	27/42 (64%)	6/14 (43%)	
<b>Metastasi a distanza</b>				<0,01
0	63/63 (100%)	0/42 (0%)	0/14 (0%)	
1	0/63 (0%)	42/42 (100%)	14/14 (100%)	
Alla diagnosi		31/42 (74%)	9/14 (64%)	0,49
Sviluppate durante il FU		11/42 (26%)	5/14 (36%)	
<b>Stadio</b>				<0,01
I	42/63 (67%)	0/42 (0%)	0/14 (0%)	

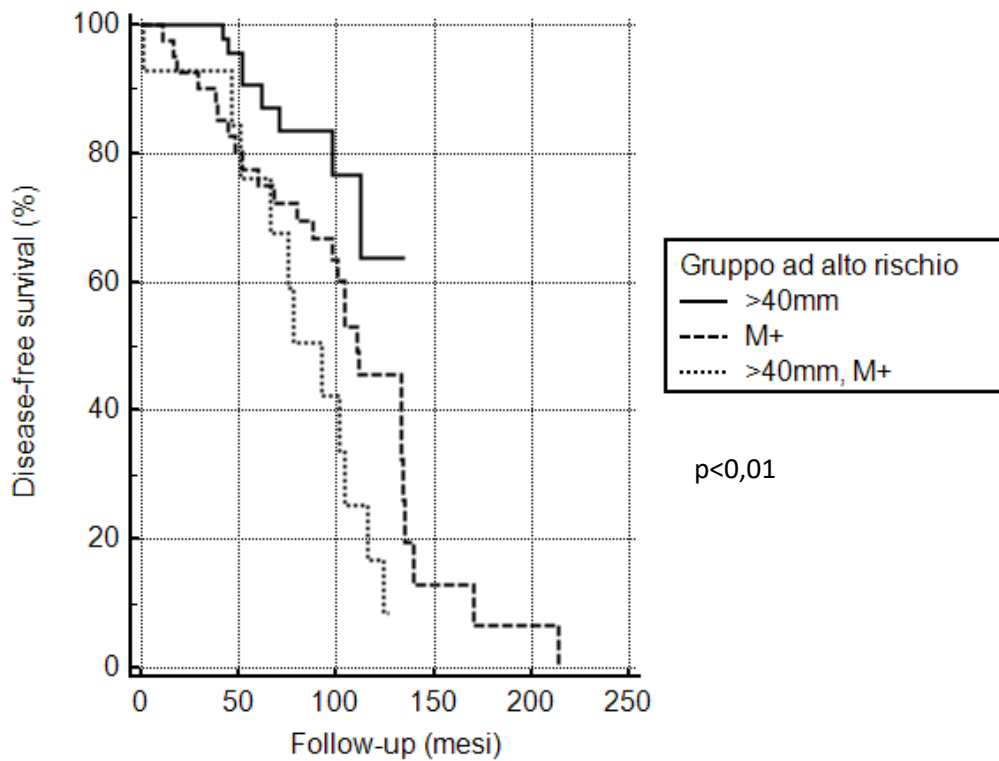
II	21/63 (33%)	14/42 (34%)	6/14 (43%)	
III	0/63 (0%)	1/42 (2%)	0/14 (0%)	
IV	0/63 (0%)	27/42 (64%)	8/14 (57%)	
<b>Istotipo</b>				<0,01
PTC	44/63 (70%)	34/42 (81%)	10/14 (71%)	
FTC	19/63 (30%)	7/42 (17%)	4/14 (29%)	
WI-FTC	7/19 (37%)	5/7 (71%)	3/4 (75%)	
MI-FTC	12/19 (63%)	2/7 (29%)	1/4 (25%)	
<b>Multifocalità</b>	19/63 (30%)	19/42 (45%)	7/14 (50%)	<0,01
<b>Follow-up, mesi</b>				<0,01
Mediana	57	98	76	
Range	13 – 135	11 – 214	1-127	
<b>Secondo Trattamento</b>	5/63 (8%)	28/42 (67%)	12/14 (86%)	<0,01
<b>Stato di malattia</b>				<0,01
Remissione	55/63 (87%)	14/41 (34%)	3/14 (21%)	
Malattia Biochimica	2/63 (3%)	1/41 (2%)	1/14 (7%)	
Indeterminato	4/63 (6%)	7/41 (17%)	0/14 (0%)	
Malattia strutturale	2/63 (3%)	18/41 (43%)	9/14 (65%)	
Decesso malattia relato	0/63 (0%)	1/41 (2%)	1/14 (7%)	
Non disponibile	0/63 (0%)	1/41 (2%)	0/14 (0%)	

I gruppi dei soggetti metastatici e metastatici con focus tumorale di grosse dimensioni presentava indici di malattia più severi rispetto al gruppo dei soggetti con solo focus tumorale di grosse dimensioni: età più avanzata al momento della diagnosi (60 e 62 anni versus 47 anni,  $p<0,01$ ), più frequente coinvolgimento linfonodale (64% e 43% versus 17%,  $p<0,01$ ), istotipo WI-FTC (71% e 75% versus 37%,  $p<0,01$ ), più frequente multifocalità (45% e 50% versus 30%,  $p<0,01$ ), maggiore necessità di secondo trattamento (67% e 86% versus 8%,  $p<0,01$ ), risultavano più frequentemente con persistenza di malattia o decesso malattia-relato (62% e 79% versus 13%,  $p<0,01$ ), presentano riduzione della DFS ( $p<0,01$ ) (Figura 13).

Il rapporto F/M era a sfavore degli uomini nel gruppo dei metastatici con focus tumorale di grosse dimensioni (1.73, 1.8 e 0.27 rispettivamente,  $p<0,01$ ).



Figura 13 Confronto fra la sopravvivenza libera da malattia tra pazienti con tumore >40 mm, metastatici e con entrambe le caratteristiche

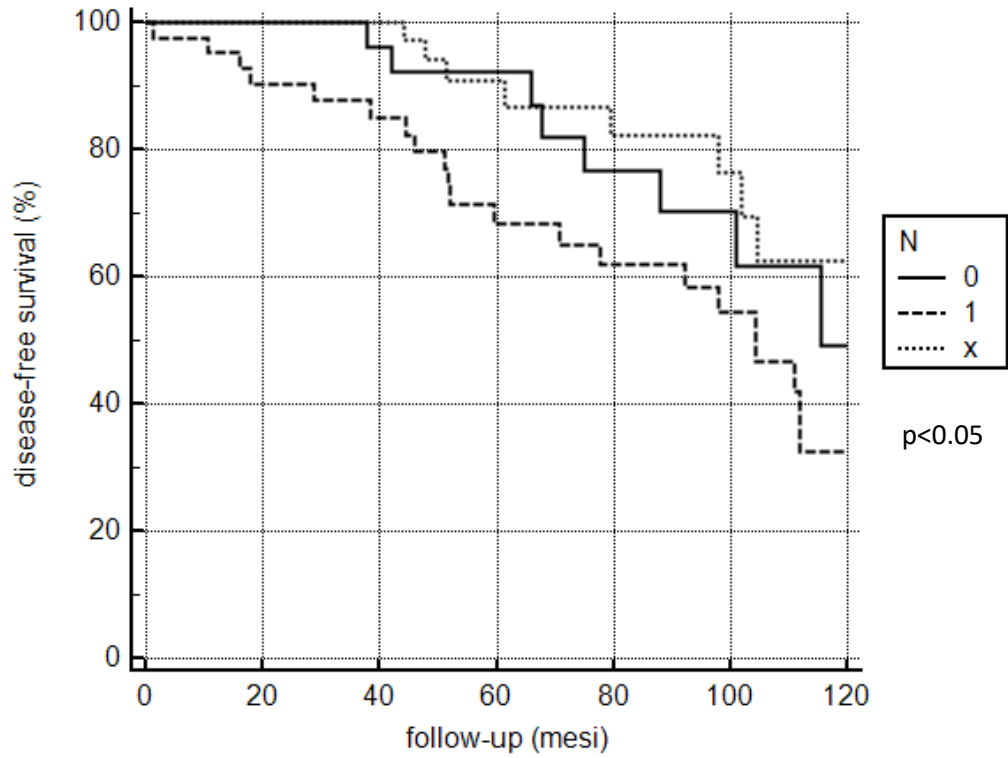


I soggetti che risultavano persistenti/deceduti durante il follow-up differivano dai pazienti in remissione per età più avanzata al momento della diagnosi (62 anni versus 47 anni,  $p<0,01$ ), multifocalità (49% versus 30%,  $p<0,01$ ), T maggiore (T4: 20% vs 3%,  $p=0,01$ ), più frequente coinvolgimento linfonodale (53% versus 25%,  $p=0,02$ ), metastasi a distanza (80% versus 25%,  $p<0,01$ ) e stadio avanzato (stadio IV: 53% vs 14%,  $p<0,01$ ).

I soggetti che ricevevano un secondo trattamento rispetto a quelli che non ne hanno avuto necessità presentavano età più avanzata al momento della diagnosi (62 anni versus 48anni,  $p<0,01$ ), multifocalità (49% vs 31%,  $p<0,01$ ), T maggiore (T4: 25% vs 0%,  $p<0,01$ ), coinvolgimento linfonodale (56% versus 24%,  $p=0,02$ ), metastasi a distanza (87% vs 22%,  $p<0,01$ ) e stadio avanzato (stadio IV 58% vs 12%,  $p<0,05$ ).

La DFS era ridotta nei pazienti con metastasi a distanza o stadio avanzato e con coinvolgimento linfonodale ( $p<0,05$ ) (Figura 14).

Figura 14 Sopravvivenza libera da persistenza/recidiva di malattia in relazione al coinvolgimento linfonodale.





## 5.1.2 Caratterizzazione molecolare

### 5.1.2.1 Mutazioni di BRAF

Mutazioni di BRAF sono state rilevate nel 26% dei pazienti esaminati: il 90% dei casi presentava la mutazione BRAF V600E (Figura 15), il 10% la mutazione BRAF K601E. La mutazione di BRAF correlava con l'istotipo: i pazienti con mutazione BRAF V600E risultano avere un PTC, i pazienti con mutazione BRAFK601E avevano FTC ( $p<0,01$ ) estesamente invasivi alla diagnosi (Tabella 14)

Tabella 14 Stato mutazionale in relazione alle caratteristiche istologiche.

mutazione	>40mm	M+	>40mm, M+
<b>DTC alto rischio (n=119)</b>	<b>n=63</b>	<b>n=42</b>	<b>n=14</b>
BRAF	11/63 (17%)	17/42 (40%)	3/14 (21%)
RAS	9/63 (41%)	1/42 (2%)	2/14 (14%)
TERT	7/63 (11%)	9/42 (21%)	6/14 (43%)
• TERT	2/7 (29%)	5/9 (56%)	2/6 (33%)
• TERT+BRAF	2/7 (29%)	4/9 (44%)	3/6 (50%)
• TERT+RAS	2/7 (29%)	0/9 (0%)	1/6 (17%)
• TERT+PTEN	1/7 (14%)	0/9 (0%)	0/6 (0%)
TP53	1/63 (2%)	0/42 (0%)	0/14 (0%)
PTEN	2/63 (3%)	0/42 (0%)	0/14 (0%)
PIK3CA	2/63 (3%)	1/42 (2%)	0/14 (0%)
<b>PTC (n=88)</b>	<b>n=44</b>	<b>n=34</b>	<b>n=10</b>
BRAF	11/44 (23%)	17/34 (50%)	1/10 (10%)
RAS	8/44 (18%)	0/34 (0%)	1/10 (10%)
TERT	2/44 (5%)	6/34 (18%)	3/10 (30%)
• TERT	0/2 (0%)	2/6 (33%)	2/3 (67%)
• TERT+BRAF	1/2 (50%)	4/6 (67%)	1/3 (33%)
• TERT+RAS	1/2 (50%)	0/6 (0%)	0/3 (0%)
TP53	1/44 (2%)	0/34 (0%)	0/34 (0%)
PTEN	1/44 (2%)	0/34 (0%)	0/10 (0%)
PIK3CA	2/44 (5%)	0/34 (0%)	0/10 (0%)
<b>FTC (n=30)</b>	<b>n=19</b>	<b>n=7</b>	<b>n=4</b>
BRAF	1/19 (5%)	0/7 (0%)	2/4 (50%)
RAS	1/19 (5%)	1/7 (14%)	1/4 (25%)
TERT	5/19 (26%)	2/7 (29%)	3/4 (75%)
• TERT	2/5 (40%)	2/2 (100%)	0/3 (0%)
• TERT+BRAF	1/5 (20%)	0/2 (0%)	2/3 (67%)
• TERT+RAS	1/5 (20%)	0/2 (0%)	1/3 (33%)
• TERT+PTEN	1/5 (20%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)
TP53	0/19 (0%)	0/7 (0%)	0/4 (0%)
PTEN	1/19 (5%)	0/7 (0%)	0/4 (0%)
PIK3CA	0/19 (0%)	1/7 (14%)	0/4 (0%)

#### 5.1.2.2 Mutazioni di RAS

Sono state rilevate mutazioni di RAS nel 10% dei casi esaminati: tutti i soggetti presentavano la mutazione nell'N-RAS esone 3 (Figura 15) (Tabella 14). La presenza di mutazioni di RAS è più frequente nei tumori di grosse dimensioni rispetto ai metastatici (41% versus 5%,  $p < 0,01$ ).

#### 5.1.2.3 Mutazioni di TERT

Mutazioni del promotore di TERT sono stati rilevate nel 18% dei soggetti: il 91% dei casi presentava la mutazione C228T, 9% presentavano la mutazione C250T (Figura 15). In relazione all'istotipo, 44% erano FTC, mentre 56% erano PTC (Tabella 14). La mutazione di TERT erano più frequenti nei soggetti metastatici piuttosto che nei soggetti con tumore di grandi dimensioni (27% versus 11%,  $p < 0,01$ ).

Tra i pazienti con TERT mutato, il 55% (12 casi) presentavano contemporaneamente una mutazione di BRAF.

Nel gruppo dei pazienti ad alto rischio, 3 soggetti presentavano sia la mutazione a carico di TERT (C228T) che di RAS (isoforma N). Un soggetto era di sesso maschile, con età alla diagnosi di 48 anni, affetto da carcinoma papillare della tiroide, variante follicolare, focus tumorale di 45 mm, non presentava coinvolgimento della capsula né angioinvasione; ad un follow-up di 83 mesi si trovava in remissione di malattia. Il secondo caso era relativo ad un soggetto di sesso femminile, di 92 anni al momento della diagnosi, affetta da carcinoma follicolare estesamente invasivo di 92 mm, non sottoposta a terapia radiometabolica data l'età avanzata; dopo un follow-up di 42 mesi presentava malattia strutturale. Il terzo caso coinvolgeva un soggetto di sesso maschile, con età alla diagnosi di 53 anni, affetto anch'esso da carcinoma follicolare estesamente invasivo di 90 mm di diametro massimo, con presenza di metastasi polmonari sin dalla diagnosi; ad un follow-up di 116 mesi presentava malattia strutturale.

#### 5.1.2.4 TP53

E' stata rilevata una mutazione puntiforme di TP53 nell'esone 6 (D208N) (Figura 15) (Tabella 14): il paziente era di sesso maschile con età alla diagnosi di 70 anni, affetto da carcinoma tiroideo di tipo papillare, bilaterale, con focus tumorale maggiore di 43 mm, che non invadeva la capsula tiroidea né presentava

angioinvasione, non sottoposto a terapia radiometabolica in quanto dializzato, in remissione di malattia dopo un follow-up di 39 mesi.

#### *5.1.2.5 PTEN*

Sono state rilevate due mutazioni puntiformi del gene PTEN nell'esone 5 (Tabella 14).

La mutazione D93N è stata rilevata in un soggetto di sesso femminile, con età alla diagnosi di 67anni, affetta da carcinoma follicolare tiroideo estesamente invasivo di 60 mm di diametro massimo, con persistenza di malattia dopo un follow-up di 44 mesi. Tale soggetto presentava anche la mutazione a carico del promotore di TERT.

La mutazione E99K è stata rilevata in un soggetto di sesso femminile, con età alla diagnosi di 47anni, affetta da carcinoma papillare variante classica, di 40mm di diametro massimo, che non presentava ne' invasione della capsula ne' angioinvasione, risultato in remissione di malattia dopo un follow-up di 116 mesi.

#### *5.1.2.6 PIK3CA*

Sono state rilevate 3 mutazioni puntiformi di PIK3CA (Figura 15) (Tabella 14).

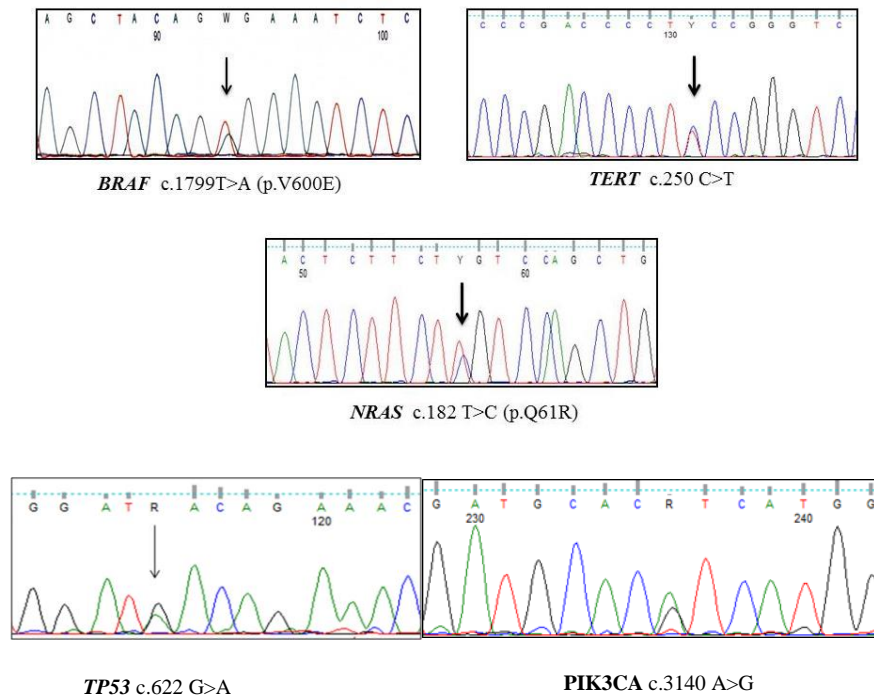
La mutazione H1047R (esone 20) (Figura 15), precedentemente descritta nell'ambito dei DTC come fattore di progressione verso il carcinoma tiroideo anaplastico<sup>147</sup>, è stata rilevata in un soggetto di sesso femminile con età alla diagnosi di 65 anni, affetta da carcinoma follicolare estesamente invasivo, che ha sviluppato metastasi ossee nel corso del follow-up, in persistenza di malattia (malattia strutturale) dopo un follow-up di 213 mesi.

La mutazione R516K (esone 9) è stata rilevata in un soggetto di sesso maschile con età alla diagnosi di 32 anni, affetto da carcinoma papillare (T4N1b) di 43 mm di diametro massimo, sottoposto a due trattamenti con terapia radiometabolica, in remissione di malattia dopo un follow-up di 135 mesi.

La mutazione L531P (esone 9) è stata rilevata in un soggetto di sesso femminile con età alla diagnosi di 50 anni, affetta da carcinoma papillare variante follicolare, a cellule ossifile e a cellule chiare, di 40 mm di diametro massimo, che non invadeva

la capsula tiroidea n  mostrava segni di angioinvasione, in remissione di malattia dopo un follow-up di 52 mesi.

*Figura 15 Spettrofotometria delle mutazioni puntiformi rilevate a carico di BRAF, TERT, NRAS, TP53 e PIK3CA.*



### 5.1.3 Correlazione tra caratteristiche cliniche e molecolari.

#### 5.1.3.1 BRAF, RAS, TP53, PTEN, PIK3CA

La presenza di mutazioni su BRAF, RAS, TP53, PTEN, PIK3CA non   risultata essere correlata a sesso, dimensione o estensione del tumore, presenza di multifocalit , di metastasi linfonodali o a distanza, di necessit  di un secondo trattamento, stato di malattia o o DFS ridotta.

#### 5.1.3.2 TERT

Il gruppo di pazienti con TERT mutato, rispetto ai soggetti wild type, presentava una et  mediana alla diagnosi superiore (64 anni versus 48 anni,  $p<0,01$ ), pi  frequenti metastasi a distanza (68% versus 42%,  $p=0,02$ ), stadio pi  avanzato alla diagnosi (stadio IV: 50% versus 25%,  $p=0,02$ ), maggiore necessit  di un secondo trattamento (68% versus 31%,  $p<0,01$ ), outcome peggiore (persistenza/decesso malattia relato 77% versus 29%,  $p<0,01$ ).

## 5.2 Confronto tra casi e controlli

### 5.2.1 Caratterizzazione clinica

Le caratteristiche dei carcinomi tiroidei ad alto rischio (Casi) rispetto a quelli a basso rischio (Controlli) sono riassunte nella Tabella 15.

*Tabella 15: Caratteristiche clinico-molecolari dei casi e dei controlli; PTC, Carcinoma papillare della tiroide; FTC, Carcinoma follicolare della tiroide; WI-FTC, carcinoma follicolare della tiroide estesamente invasivo; MI-FTC, carcinoma follicolare della tiroide minimamente invasivo; FU, follow-up.*

Variabile	Casi (n=119)	Controlli (n=144)	p-value
<b>Sesso, F:M</b>	70:49 (1,42:1)	118:26 (4,53:1)	<0,01
<b>Età alla diagnosi (anni)</b>			<0,01
Mediana	51	47	
Range	21 – 92	22 – 81	
<b>Dimensione, mm</b>			<0,01
Mediana	43	13	
Range	2 – 90	2 – 38	
<b>T</b>			<0,01
X	2/118 (1%)	0/144 (0%)	
1	22/118 (19%)	122/144 (85%)	
2	22/118 (19%)	22/144 (15%)	
3	61/118 (52%)	0/144 (0%)	
4	11/118 (9%)	0/144 (0%)	
<b>N</b>			<0,01
X	43/119 (36%)	14/144 (10%)	
0	32/119 (27%)	78/144 (54%)	
1	43/119 (36%)	52/144 (36%)	
Non disponibile	1/119 (1%)	0/144 (0%)	
<b>Metastasi a distanza</b>	56/119 (47%)	0/144 (0%)	<0,01
Alla diagnosi	40/56 (71%)	0/144 (0%)	
Sviluppate durante il FU	16/56 (29%)	0/144 (0%)	
<b>Stadio</b>			<0,01
1	42/119 (35%)	131/144 (91%)	
2	41/119 (34%)	13/144 (9%)	
3	1/119 (1%)	0/144 (0%)	
4	35/119 (30%)	0/144 (0%)	
<b>Istotipo</b>			<0,01
PTC	88/119 (74%)	144/144 (100%)	
FTC	30/119 (25%)	0/144 (0%)	
WI-FTC	15/30 (50%)	0/144 (0%)	
MI-FTC	15/30 (50%)	0/144 (0%)	



<b>Multifocalità</b>	45/119 (38%)	80/144 (56%)	<0,01
<b>Follow-up, mesi</b>			0,12
Mediana	69	81	
Range	1 – 213	18 – 131	
<b>Secondo Trattamento</b>	45/119 (38%)	8/144 (6%)	<0,01
<b>Stato di malattia</b>			<0,01
Remissione	72/119 (61%)	131/144 (91%)	
Malattia Biochimica	4/119 (3%)	5/144 (3%)	
Indeterminato	11/119 (9%)	6/144 (4%)	
Malattia strutturale	29/119 (24%)	2/144 (1%)	
Decesso malattia relato	2/119 (2%)	0/144 (0%)	
Non disponibile	1/119 (1%)	0/144 (0%)	
<b>Mutazioni</b>			
BRAF	31/119 (26%)	88/144 (61%)	<0,01
RAS	12/119 (10%)	3/144 (2%)	<0,01
TERT promotore	22/119 (18%)	5/144 (3%)	<0,01
TP53	1/119 (1%)	1/144 (1%)	0,55
PTEN	2/119 (2%)	0/144 (0%)	0,39
PIK3CA	3/119 (3%)	0/144 (0%)	0,13

Il gruppo dei soggetti con ad alto rischio presenta, in base ai criteri di selezione, caratteristiche più aggressive rispetto ai pazienti con tumori a basso rischio.

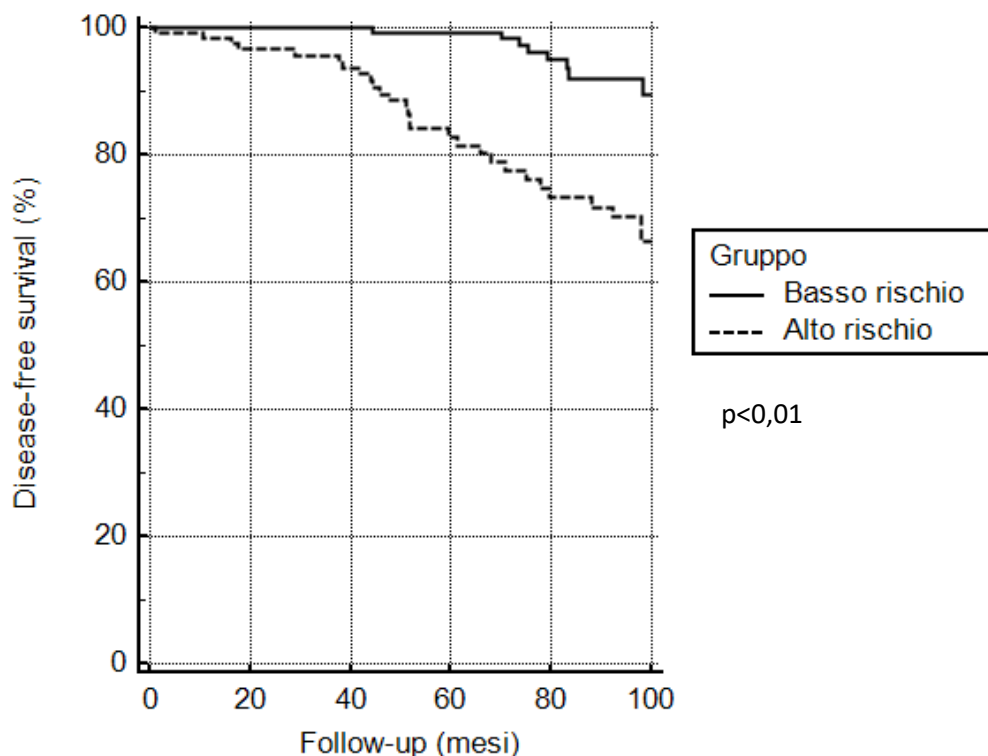
Il sesso maschile era relativamente maggiormente rappresentato nel gruppo ad alto rischio rispetto al gruppo di controllo: il rapporto F/M nei casi è di 1,42:1 versus 4,53:1 nei controlli ( $p < 0,01$ ).

I pazienti ad alto rischio, rispetto ai soggetti a basso rischio presentavano una'età alla diagnosi più elevata (51 anni versus 47 anni,  $p < 0,01$ ), e per selezione T maggiore (9% versus 0%,  $p < 0,01$ ); la multifocalità era meno frequente nei primi rispetto ai secondi (38% versus 56%,  $p < 0,01$ ); per quanto attiene al coinvolgimento linfonodale esso era presente in una proporzione analoga fra alto e basso rischio, sebbene nei primi vi fosse una maggiore prevalenza di pazienti con coinvolgimento linfonodale non definito.

Nel corso del follow-up, il 38% dei pazienti con tumore aggressivo ha necessitato di secondo trattamento versus il 6% dei controlli ( $p < 0,01$ ). Lo stato finale di malattia era peggiore, come atteso, nel gruppo di pazienti con tumore ad alto rischio: i pazienti con persistenza di malattia o deceduti era di 39% versus 9% del

gruppo di controllo ( $p<0,01$ ). Il gruppo di pazienti con tumore ad alto rischio mostrava una DFS ridotta durante il follow-up ( $p<0,01$ ) (Figura 17).

*Figura 17 Sopravvivenza libera da persistenza/recidiva di malattia nel gruppo ad alto rischio rispetto al gruppo a basso rischio*



Considerando globalmente i pazienti con carcinoma tiroideo, i soggetti che sono risultati essere persistenti/deceduti al follow-up, rispetto ai soggetti in remissione di malattia, erano prevalentemente di sesso maschile (40% versus 25%,  $p<0,01$ ), avevano un'età più avanzata al momento della diagnosi (60 anni versus 47 anni,  $p<0,01$ ), un focus tumorale di dimensione maggiore (22 mm versus 17 mm,  $p<0,01$ ), presentavano più frequentemente tumori multifocali (52% versus 46%,  $p<0,01$ ), un tumore maggiormente esteso (T4: 16% versus 1%,  $p<0,01$ ), più frequente coinvolgimento linfonodale (55% versus 30%,  $p<0,01$ ), metastasi a distanza (64% versus 9%,  $p<0,01$ ), stadio più avanzato (stadio IV: 41% versus 5%,  $p<0,01$ ) e necessitavano più frequentemente di secondo trattamento (72% versus 5%,  $p<0,01$ ).

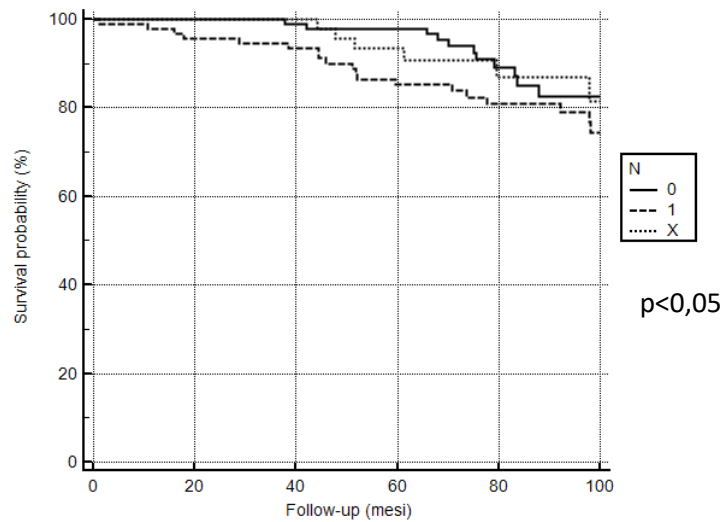
Globalmente, infine, i pazienti che hanno ricevuto un secondo trattamento durante il follow-up, rispetto a quelli che non ne hanno avuto necessità, avevano età più

avanzata (60 anni versus 47 anni,  $p < 0,01$ ), erano più frequentemente maschi (40% versus 28%,  $p = 0,04$ ), presentavano più frequentemente multifocalità (49% versus 47%,  $p < 0,01$ ), tumore più esteso (T4: 21% versus 0%,  $p < 0,01$ ), coinvolgimento linfonodale (58% versus 30%,  $p < 0,01$ ), metastasi a distanza (75% versus 8%,  $p < 0,01$ ), stadio più avanzato (stadio IV: 49% versus 4%,  $p < 0,01$ ).

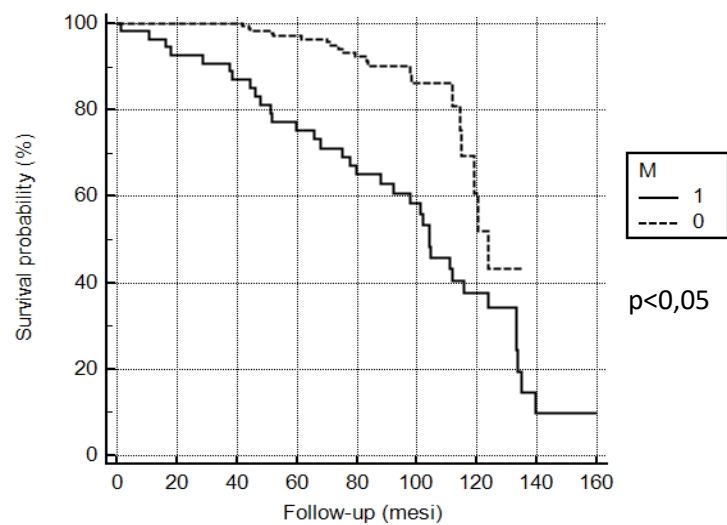
I parametri T, N, M e conseguentemente lo stadio erano associati a riduzione del DFS ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

Figura 19 Sopravvivenza libera da malattia secondo i seguenti fattori di rischio: a.N; b.M.

a.



b.



## 5.2.2 Confronto tra le caratteristiche molecolari tra i DTC ad alto e basso rischio.

### 5.2.2.1 BRAF e RAS

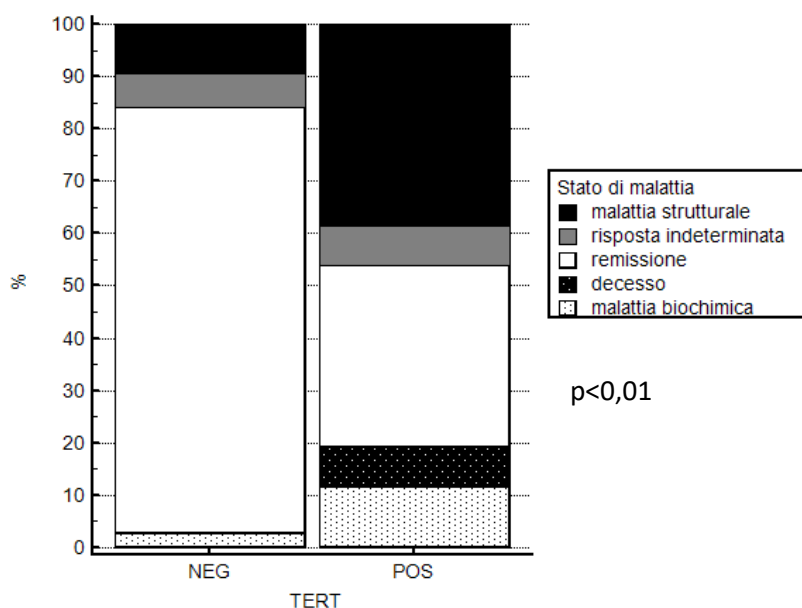
La mutazione di BRAF è risultata essere più rara nei pazienti ad alto rischio rispetto ai pazienti con tumore a basso rischio (26% versus 61%,  $p < 0,01$ ); la mutazione di RAS è risultata più frequente nei pazienti ad alto rischio rispetto al basso rischio (10% versus 2%,  $p < 0,01$ ). Non sono state rilevate differenze per quanto riguarda l'outcome tra i pazienti con mutazioni su tali geni e pazienti con geni *wt*.

### 5.2.2.2 TERT

Per quanto riguarda TERT, la mutazione è stata rilevata più frequentemente nei pazienti ad alto rischio rispetto a quelli a basso rischio (18% versus 3%,  $p < 0,01$ ).

Globalmente, i pazienti con TERT mutato avevano un'età mediana maggiore (64 anni versus 47 anni,  $p < 0,01$ ), focus tumorale di dimensioni maggiori (43mm versus 17mm,  $p < 0,01$ ), tumore più esteso (T4: 11% versus 4%,  $p < 0,01$ ), metastasi a distanza (56% versus 18%,  $p < 0,01$ ), stadio più avanzato (stadio IV: 41% versus 11%,  $p < 0,01$ ), maggiore necessità di secondo trattamento (57% versus 17%,  $p < 0,01$ ), outcome peggiore (69% versus 18%,  $p < 0,01$ ) (Figura 20).

Figura 20: Stato di malattia in relazione allo stato mutazionale di TERT.



La mutazione di TERT era correlata a una DFS ridotta ( $p < 0,01$ ).

La presenza di mutazioni a carico del promotore di TERT, sia come evento singolo sia in associazione con altre mutazioni puntiformi, si associava ad un outcome peggiore: 18/58 (31%) soggetti con persistenza di malattia presentavano mutazioni a carico di TERT, di cui 9/18 (50%) erano presenti come evento esclusivo e 9/18 (50%) in associazione ad altre mutazioni (BRAF, RAS e PTEN in ordine di frequenza), mentre tra i soggetti in remissione di malattia solo 8/193 (4%) presentavano la mutazione di TERT, di cui 3/8 (38%) con evento singolo e 5/8 (62%) in associazione ad altre mutazioni ( $p < 0,01$ ).

All'analisi univariata sono risultati statisticamente associati ad un outcome peggiore il sesso maschile, l'età più avanzata al momento della diagnosi, i parametri T, N, M, lo stadio, la necessità di secondo trattamento e la presenza di mutazioni del promotore TERT ( $p < 0,01$ ).

All'analisi multivariata, tuttavia, sono risultati fattori indipendenti di outcome negativo la presenza di mutazioni a carico di TERT (OR 4,9554, CI 1,3769-17,8342), il coinvolgimento linfonodale (OR 3,0387, CI 1,1712-7,8839) e la presenza di metastasi a distanza (OR 9,0933, CI 3,8675-21,3803) ( $p < 0,01$ ).

## 6. Discussione e conclusioni

Il DTC è una patologia che ha presentato un significativo aumento di incidenza negli ultimi anni a fronte di un tasso di mortalità stabile. Queste evidenze sono il risultato di un incremento della diagnosi di malattie senza significativo impatto clinico per il soggetto, grazie all'utilizzo sempre più diffuso dell'ecografia tiroidea<sup>1-6</sup>. L'incremento del numero di nuove diagnosi, considerata l'ottima prognosi della maggior parte dei DTC, ha sostenuto la ricerca di nuove evidenze volte a isolare quelle caratteristiche cliniche e molecolari in grado di identificare i rari casi di malattia aggressiva, associata a rischio di progressione e decesso, nello sforzo di attuare scelte terapeutiche mirate e programmi di follow-up personalizzati. Il tutto nell'ottica di un risparmio delle risorse sanitarie dove possibile e nell'utilizzo delle stesse dove è più indispensabile.

Molte delle caratteristiche cliniche e anatomo-patologiche utilizzabili a tale scopo sono riconosciute da tempo, sebbene per alcune di esse non esista ancora oggi un'opinione condivisa in Letteratura; infine, nuove acquisizioni, anch'esse non sempre condivise e riproducibili nei differenti studi, si stanno accumulando al fine di identificare quale possa essere il profilo molecolare del DTC aggressivo.

In tale contesto, il rischio di persistenza/recidiva di malattia durante il follow-up è stato definito per il DTC sulla base delle classi di rischio ATA, mentre il sistema di stratificazione TNM appare maggiormente utile per predire il rischio di morte. Tra le caratteristiche cliniche/anatomo-patologiche tradizionalmente associate ad una prognosi povera, sono definite da tempo la presenza di metastasi a distanza e le grosse dimensioni tumorali (>4 cm) in età maggiore di 45 anni<sup>44, 148</sup>. Tali aspetti clinici alla diagnosi raccomandano la scelta di una chirurgia radicale e l'impiego di terapia ablativa con <sup>131</sup>I, a scopo adiuvante<sup>44</sup>.

Per tale ragione abbiamo raccolto una casistica di pazienti con malattia tradizionalmente considerata aggressiva, includendo casi con metastasi a distanza e con tumore di dimensioni superiori a 40 mm, per definire se tali variabili si correlassero ad un analogo profilo molecolare e ad un decorso clinico, sovrapponibile in corso di follow-up; inoltre abbiamo confrontato tale casistica con una serie di carcinomi differenziati solitamente a prognosi favorevole. Quest'ultimo

aspetto risulta particolarmente importante in quanto, essendo uno studio monocentrico, tutti i pazienti sono stati trattati e seguiti in modo omogeneo e ovviamente conforme al tipo di malattia presentato.

La prognosi negativa conferita dai fattori di rischio noti in Letteratura per recidiva o mortalità, quali T, N, M e stadio<sup>77</sup> è stata confermata nel nostro studio. Tra questi fattori di rischio, la presenza di metastasi a distanza si conferma essere il fattore prognostico indipendente che incide in maniera maggiore sul rischio di persistenza e decesso dei pazienti.

Focalizzando l'analisi sul confronto delle caratteristiche cliniche e di outcome dei pazienti con tumore aggressivo, i soggetti con metastasi a distanza e metastatici con tumori di grosse dimensioni, rispetto ai pazienti con solo tumore primitivo maggiore di 40 mm, presentavano più frequentemente un genere maschile, età più avanzata alla diagnosi, multifocalità, coinvolgimento linfonodale, necessità di secondo trattamento e outcome peggiore in termini di frequenza di malattia stutturale e decesso malattia-relato; in vero, all'analisi multivariata, la presenza di coinvolgimento linfonodale e metastasi a distanza si confermano essere fattori di rischio indipendenti per la prognosi, a differenza invece delle dimensioni del tumore.

Alcune considerazioni sul genere vanno sottolineate. I dati della Letteratura riportano che il DTC sia più raro nel sesso maschile e che i maschi abbiano prognosi peggiore, verosimilmente per un ritardo nella diagnosi<sup>65, 149</sup>. Nella nostra casistica si osserva una riduzione del rapporto F/M nel gruppo dei DTC aggressivi rispetto al gruppo di controllo e all'interno del gruppo dei tumori aggressivi, fra i metastatici e non (rispettivamente 1,42/1 versus 4,53/1 versus 3/1). Nonostante ciò, all'analisi multivariata, il sesso non è risultato essere un fattore di rischio indipendente per la recidiva di malattia: il nostro studio sembra, quindi, confermare che la peggior prognosi dei maschi affetti da DTC sia dovuta ad un ritardo diagnostico, potenzialmente evitabile ponendo una maggiore attenzione verso i soggetti maschili in cui si sospetti una neoplasia tiroidea.

In Letteratura, infine, il significato prognostico della multifocalità resta un argomento dibattuto<sup>150-153</sup>: i dati del nostro studio sembrano suggerire che la

multifocalità si associ ad un outcome peggiore nel setting dei casi aggressivi, inteso sia come maggior probabilità di secondo trattamento che di presentare persistenza di malattia; tuttavia una maggiore frequenza di multifocalità non viene dimostrata dal confronto fra carcinomi tiroidei a cattiva e buona prognosi.

L'avvento di tecnologie capaci di sequenziare il DNA a costi sempre più contenuti ha fatto nascere molte speranze sulle potenzialità dell'uso di tali tecniche in ambito diagnostico e prognostico. Le mutazioni risultate essere più promettenti, e conseguentemente più approfondite, coinvolgono i geni BRAF, RAS, TP53, PTEN, PIK3CA e del promotore di TERT<sup>154-156</sup>.

La mutazione BRAF V600E è la più frequente mutazione rilevata nel DTC, attorno al 40-60% dei casi. La sua presenza è stata associata a tumori meno differenziati e con prognosi povera, in termini di maggior rischio di persistenza e recidiva e decesso malattia-relato; tali assunti non sono però confermati da tutte le evidenze presenti in Letteratura<sup>107, 110, 111, 113, 114</sup>.

La prevalenza globale di tale mutazione nel nostro studio è in linea con quella riportata in Letteratura<sup>157</sup>, sebbene prevalga nelle forme a basso rischio rispetto ai carcinomi con caratteri aggressivi (61% versus 26%); non abbiamo tuttavia rilevato alcun impatto statisticamente significativo sugli indici di prognosi analizzati.

I principali studi retrospettivi multicentrici che hanno indagato l'impatto di BRAF sulla prognosi del paziente con carcinoma tiroideo papillare hanno dimostrato una correlazione tra la presenza della mutazione stessa e i principali outcome prognostici negativi: in uno studio multicentrico del 2013, condotto su 1849 soggetti affetti da PTC, Xing e colleghi dimostrarono come la presenza della mutazione fosse significativamente associata ad un'aumentata mortalità tumore-relata, sebbene la mutazione non risultasse un predittore indipendente di mortalità<sup>158</sup>; uno successivo studio proposto dagli stessi Autori, condotto su 2099 pazienti affetti da PTC, dimostrò come la presenza di mutazioni a carico di BRAF avesse un ruolo prognostico indipendente per quanto riguarda persistenza e recidiva di malattia<sup>159</sup>. Anche alcune casistiche monocentriche forniscono dati a supporto del ruolo prognostico negativo di BRAF: nel 2012 Elisei e collaboratori dimostrarono che, nel setting di 319 soggetti con tumore intratiroideo a basso



rischio con un follow-up medio di 5 anni, la presenza di mutazione BRAF V600E si configurava come un fattore prognostico indipendente di persistenza di malattia<sup>160</sup>; anche uno studio monocentrico condotto dal nostro gruppo, che includeva 50 soggetti con recidiva laterocervicale di PTC, confermò l'associazione della mutazione BRAFV600E con una maggiore aggressività tumorale, caratterizzata dalla perdita della capacità, da parte delle recidive, di captare lo iodio radioattivo (correlata ad una *down-regulation* dei geni tiroideo-specifici) e l'acquisizione della capacità di captare il glucosio (correlata ad un aumento dell'espressione del trasportatore GLUT-1), dimostrabile alla 18-FDG-PET<sup>161</sup>.

Non hanno fornito, invece, dati sovrapponibili alcuni studi prospettici che hanno valutato l'impatto di BRAF sull'outcome: un nostro recente studio monocentrico, condotto su 185 soggetti sottoposti ad agoaspirato per studio molecolare di BRAF e a chirurgia con diagnosi istologica di PTC, con follow-up medio di 55 mesi, non confermava l'associazione tra la mutazione di BRAF e i fattori prognostici negativi finora indagati<sup>162</sup>. Analoghi risultati emergono da un recente studio di Damiani e colleghi, condotto su un setting di pazienti sovrapponibili al precedente, con follow-up fino a 10 anni<sup>163</sup>.

Un possibile bias degli studi prospettici su agoaspirato, così concepiti, è che verosimilmente la dimostrazione precoce di BRAF conduce ad una chirurgia altrettanto precoce, tale per cui la presenza della mutazione di BRAF non ha il tempo di conferire al tumore quelle caratteristiche di de-differenziazione e aggressività dimostrate negli studi retrospettivi.

A supporto di tali osservazioni, infine, una recente metaanalisi giapponese, estrapolata da 42 studi con numerosità complessiva di 11.109 soggetti con PTC, ha valutato l'impatto dei più noti/frequenti eventi mutazionali (TERT promotore, RAS e BRAF) sulla presenza di metastasi a distanza, dimostrando come la mutazione di BRAF non correli con questo parametro; tale evento mutazionale, invece, sembra invece associarsi alla presenza di metastasi a distanza solo in associazione alla mutazione di TERT promotore, probabilmente per la stretta correlazione di quest'ultimo evento molecolare con fattori prognostici negativi, come peraltro dimostrato anche dai dati del presente studio<sup>164</sup>.

Il nostro studio conferma che la mutazione BRAF K601E è un raro evento genico: tale mutazione è classicamente associata a FVPTC e adenomi follicolari ed in Letteratura viene associata a prognosi favorevole<sup>165</sup>. Nella nostra casistica tale mutazione è stata rilevata nel contesto di FTC aggressivi e pertanto, nonostante non sia possibile valutarne l'impatto clinico a causa del limitato numero di soggetti che ne sono portatori, essa potrebbe avere una prognosi peggiore di quella riportata in precedenza.

La frequenza delle mutazioni di RAS, ristrette all'isoforma *NRAS*, rilevata nei nostri pazienti è superiore rispetto a quanto riportato in Letteratura<sup>116, 117, 157</sup> e tale evento risultava più evidente nel setting dei carcinomi ad alto rischio e di grosse dimensioni, dove è stata dimostrata una frequenza pari al 14% nei tumori >40 mm, più o meno metastatici, rispetto al 2% dei carcinomi che presentavano anche metastasi a distanza e al 2% dei carcinomi a buona prognosi. Non abbiamo rilevato, tuttavia, associazioni statisticamente significative tra la presenza di mutazione di RAS e le caratteristiche cliniche analizzate, verosimilmente per la ridotta numerosità di casi mutati.

La presenza di mutazioni del promotore di TERT nei DTC è stata descritta per la prima volta nel 2013<sup>123, 166</sup> e tali mutazioni sono ancora oggetto di studio di numerosi gruppi di ricerca, con il fine di chiarirne il ruolo biologico ed il significato clinico. Globalmente nella nostra casistica la prevalenza delle mutazioni di TERT, rappresentate principalmente dalla mutazione C228T, era pari al 11%, lievemente inferiore rispetto a quanto riportato in Letteratura<sup>157, 166</sup>. Tra i tumori ad alto rischio la prevalenza maggiore di mutazioni di TERT era nel gruppo dei soggetti metastatici.

In Letteratura è stata descritta un'associazione tra mutazione di TERT e outcome di malattia sfavorevole<sup>166</sup>: in accordo con quanto emerso dagli studi precedenti, nella nostra casistica i pazienti con tumore aggressivo presentavano una frequenza significativamente maggiore di mutazioni di TERT rispetto a quelli con tumore a prognosi favorevole (18% versus 3%); limitandoci all'analisi dei pazienti con tumore più aggressivo, i soggetti con metastasi a distanza presentavano un frequenza di mutazioni di TERT del 27% versus l'11% di coloro che presentavano unicamente un tumore di grandi dimensioni. Globalmente nell'intera casistica, la

presenza di mutazioni di TERT, risultava essere associata ad aspetti clinico-patologici associati a prognosi povera quali età alla diagnosi avanzata, stadio avanzato alla diagnosi; nel corso del follow-up, la presenza di tale evento mutazionale correlava con una maggiore frequenza di secondo trattamento e con un outcome clinico peggiore, infatti circa l'80% dei soggetti mutati presentava persistenza di malattia o decesso malattia-relato; in accordo con tali premesse, all'analisi multivariata tale evento molecolare, unico fra quelli presi in esame, emergeva come fattore prognostico negativo indipendente.

In Letteratura è stata più volte descritta la contemporanea presenza di mutazioni a carico di TERT in associazione a BRAF, RAS o TERT<sup>167, 168</sup>, e tale quadro molecolare sembra rappresentare la massima aggressività riscontrata nel setting dei carcinomi tiroidei<sup>159</sup>; anche i dati della nostra casistica sembrano supportare questa osservazione, sebbene non sia stato possibile rilevare differenze di outcome tra i pazienti con la sola mutazione di TERT e i pazienti che presentavano più eventi mutazionali, verosimilmente per la bassa numerosità.

Nel futuro potrebbe essere interessante ampliare la casistica in oggetto al fine di descrivere meglio il comportamento dei tumori che presentino più di un evento mutazionale e confrontare tale profilo molecolare con quello di tumori tiroidei a basso rischio.

Nel setting dei carcinomi ad alto rischio per dimensioni superiori a 40 mm abbiamo rilevato due casi in cui erano presenti mutazioni a carico del gene PTEN (una delle quali precedentemente descritta in un caso di carcinoma tiroideo pediatrico ben differenziato<sup>169</sup>).

A differenza di altre tipologie di tumore, la mutazione di TP53 è un evento raro nel DTC, mentre è di più comune riscontro nei carcinomi anaplastici<sup>140</sup>. Tra i pazienti esaminati, soltanto due presentavano mutazione di TP53: un soggetto apparteneva al gruppo ad alto rischio mentre l'altro al gruppo di controllo. La Letteratura, nell'ambito dei carcinomi differenziati tiroidei, riporta una prevalenza stimata delle mutazioni nella via di TP53 pari al 10-15%<sup>141-143</sup>; tali stime sono frutto di studi che impiegavano l'immunoistochimica come metodica di rilevamento, mentre il nostro studio ha usato il sequenziamento genico come metodica di scelta. La differente

prevalenza della mutazione può pertanto essere ricondotta a più spiegazioni: 1) la mutazione di TP53 è un evento tardivo che porta alla progressione dei DTC verso forme di cancro meno differenziate e più aggressive quali il carcinoma anaplastico; 2) esistono mutazioni in altri punti della via di TP53 (e.g. MDM2); 3) l'espressione di TP53 è alterata in maniera non dipendente da una mutazione puntiforme; 4) la mutazione puntiforme di TP53 non è localizzata negli esoni esaminati nei DTC.

In conclusione, il nostro studio ha confermato che vi è una prognosi peggiore nei pazienti con focus tumorale >40 mm e/o metastasi a distanza rispetto ai pazienti che non presentavano tali caratteristiche ed inoltre i pazienti con metastasi a distanza sono nel complesso quelli a prognosi più severa. L'impatto di tutte le caratteristiche cliniche e anatomo-patologiche analizzate (sesso, età, dimensioni, multifocalità, T, N, M, stadio) sulla prognosi è stato confermato, sebbene siano risultati fattori indipendenti per recidiva o persistenza di malattia solo il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi a distanza.

Nei pazienti con tumori aggressivi è stata dimostrata un'aumentata frequenza di mutazione a carico del promotore TERT e ciò è particolarmente evidente nei pazienti con metastasi a distanza. La presenza di mutazioni di TERT si conferma essere un evidente fattore in grado di influenzare la prognosi del paziente con DTC, associato a tutte le caratteristiche clinico-patologiche di aggressività analizzate e unico fra i fattori molecolari presi in esami a influenzare l'*outcome* in modo indipendente. Non sono state, invece, rilevate differenze di prognosi nei pazienti che presentavano mutazioni puntiformi di BRAF, RAS e TP53, PTEN e PIK3CA.



## 7. Bibliografia

1. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. population fact sheets. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) Web site. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Accessed Aug 15, 2017.
2. Davies L, Welch H. Increasing incidence of thyroid cancer in the united states, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295(18):2164-2167.
3. Vaccarella S, Dal Maso L, Laversanne M, Bray F, Plummer M, Franceschi S. The impact of diagnostic changes on the rise in thyroid cancer incidence: A population-based study in selected high-resource countries. *Thyroid*. 2015;25(10):1127-1136.
4. Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide thyroid-cancer epidemic? the increasing impact of overdiagnosis. *N Engl J Med*. 2016;375(7):614-617.
5. Associazione italiana di oncologia medica. I numeri del cancro in italia. 2014.
6. Davies L, Welch H. Current thyroid cancer trends in the united states. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2014;140(4):317-322.
7. Aschebrook-Kilfoy B, Grogan RH, Ward MH, Kaplan E, Devesa SS. Follicular thyroid cancer incidence patterns in the united states, 1980–2009. *Thyroid*. 2013;23(8):1015-1021.
8. Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. *Future oncology (London, England)*. 2010;6(11):1771-1779.

9. Zeng Q, Chen GG, Vlantis AC, Van Hasselt CA. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor – ERK pathway. *Cell Prolif.* 2007;40(6):921-935.
10. Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, et al. Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells. *Thyroid.* 2010;20(1):33-41.
11. Moysich KB, Menezes RJ, Michalek AM. Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: An epidemiological review. *The Lancet Oncology.* 2002;3(5):269-279.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204502007271>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00727-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00727-1).
12. Furukawa K, Preston D, Funamoto S, et al. Long-term trend of thyroid cancer risk among japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 2012;132(5):1222-1226.
13. Shore RE, Hildreth N, Dvoretzky P, Andresen E, Moseson M, Pasternack B. Thyroid cancer among persons given X-ray treatment in infancy for an enlarged thymus gland. *Am J Epidemiol.* 1993;137(10):1068-1080.
14. Lundell M, Hakulinen T, Holm LE. Thyroid cancer after radiotherapy for skin hemangioma in infancy. *Radiat Res.* 1994;140(3):334-339.
15. Paloyan E, Lawrence AM. Thyroid neoplasms after radiation therapy for adolescent acne vulgaris. *Arch Dermatol.* 1978;114(1):53-55.
16. Acharya S, Sarafoglou K, LaQuaglia M, et al. Thyroid neoplasms after therapeutic radiation for malignancies during childhood or adolescence. *Cancer.* 2003;97(10):2397-2403.

17. Bhatti P, Veiga LHS, Ronckers C, et al. Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: An update from the childhood cancer survivor study. *Radiat Res.* 2010;174(6):741-752.
18. Podda MG, Terenziani M, Gandola L, et al. Thyroid carcinoma after treatment for malignancies in childhood and adolescence: From diagnosis through follow-up. *Medical Oncology.* 2014;31(8):121.
19. Zhang Y, Chen Y, Huang H, et al. Diagnostic x-ray exposure increases the risk of thyroid microcarcinoma: A population-based case-control study. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP).* 2015;24(5):439-446.
20. Xu L, Li G, Wei Q, El-Naggar A, Sturgis EM. Family history of cancer and risk of sporadic differentiated thyroid carcinoma. *Cancer.* 2011;118(5):1228-1235.
21. Memon A, Berrington de González A, Luqmani Y, Suresh A. Family history of benign thyroid disease and cancer and risk of thyroid cancer. *European Journal of Cancer.* 2004;40(5):754-760.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804904000024>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2003.12.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2003.12.011).
22. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(21):1600-1608.
23. Nose V. Familial thyroid cancer: A review. *Mod Pathol.* 2011;24 Suppl 2:19.
24. Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, et al. Management guidelines for children with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.*



2015;25(7):716-759. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0460>. doi:  
10.1089/thy.2014.0460.

25. Jankovic B, Le KT, Hershman JM. Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma: Is there a correlation? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(2):474-482.

26. Mazokopakis EE, Tzortzinis AA, Dalieraki-Ott EI, et al. Coexistence of hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. A retrospective study. *Hormones (Athens)*. 2010;9(4):312-317.

27. Anil C, Goksel S, Gursoy A. Hashimoto's thyroiditis is not associated with increased risk of thyroid cancer in patients with thyroid nodules: A single-center prospective study. *Thyroid*. 2010;20(6):601-606.

28. Replinger D, Bargren A, Zhang Y, Adler JT, Haymart M, Chen H. Is hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *Journal of Surgical Research*. 2008;150(1):49-52.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480407005926>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.jss.2007.09.020](https://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2007.09.020).

29. Larson SD, Jackson LN, Riall TS, et al. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with hashimoto's thyroiditis and the role of the pi3k/akt pathway. *J Am Coll Surg*. 2007;204(5):764-775.

30. Azizi G, Malchoff C. Autoimmune thyroid disease: A risk factor for thyroid cancer. *Endocrine Practice*. 2011;17(2):201-209.

31. Lee J, Kim Y, Choi J, Kim Y. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven hashimoto's thyroiditis: A meta-analysis. *European Journal of Endocrinology*. 2013;168(3):343-349.
32. Resende dP, Grønhøj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C. Association between hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer in 64,628 patients. *Frontiers in Oncology*. 2017;7:53.
33. AXELRAD AA, LEBLOND CP. Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer*. 1955;8(2):339-367.
34. Kanno J, Onodera H, Furuta K, Maekawa A, Kasuga T, Hayashi Y. Tumor-promoting effects of both iodine deficiency and iodine excess in the rat thyroid. *Toxicol Pathol*. 1992;20(2):226-235. doi: 10.1177/019262339202000209 [doi].
35. Zimmermann MB, Galetti V. Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: A comprehensive review of animal and human studies. *Thyroid Research*. 2015;8(1):8.
36. Zhang Y, Guo GL, Han X, et al. Do polybrominated diphenyl ethers (PBDE) increase the risk of thyroid cancer? *Bioscience Hypotheses*. 2008;1(4):195-199. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756239208000657>. doi: [//dx.doi.org/10.1016/j.bihy.2008.06.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.bihy.2008.06.003).
37. Zeng F, Lerro C, Lavoué J, et al. Occupational exposure to pesticides and other biocides and risk of thyroid cancer. *Occup Environ Med*. 2017;74(7):502.
38. Asioli S, Erickson LA, Sebo TJ, et al. Papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: A new aggressive variant of moderately differentiated papillary carcinoma. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular

study of eight cases. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(1):44-52. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181c46677 [doi].

39. Watutantrige-Fernando S, Vianello F, Barollo S, Bertazza L, Galuppini F, Cavedon E, Censi S, Benna C, Ide EC, Parisi A, Nacamulli D, Iacobone M, Pennelli G, Mian C. The Hobnail Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Clinical/Molecular Characteristics of a Large Monocentric Series and Comparison with Conventional Histotypes. *Thyroid*. 2018; 28: 96-103.

40. Maitra A. The endocrine system. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J, eds. *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia: Elsevier; 2009:1119-1124.

41. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: An update. *Mod Pathol*. 2011;24:S9.

42. Sobrinho-Simoes M, Eloy C, Magalhaes J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24:S18.

43. Schlumberger M, Filetti S, Alexander EK, Hay ID. Nontoxic diffuse goiter, nodular thyroid disorders, and thyroid malignancies. In: Melmed S, Polonsky K, Larsen R, Kronenberg H, eds. *Williams textbook of endocrinology 13th edition*. Philadelphia: Elsevier; 2015:453-481.

44. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 american thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.

45. Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P. Elastography: New developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(8):2917-2922.
46. Bhatia KSS, Tong CSL, Cho CCM, Yuen EHY, Lee YYP, Ahuja AT. Shear wave elastography of thyroid nodules in routine clinical practice: Preliminary observations and utility for detecting malignancy. *Eur Radiol*. 2012;22(11):2397-2406.
47. Deandreis D, Al Ghuzlan A, Auperin A, et al. Is (18)F-fluorodeoxyglucose-PET/CT useful for the presurgical characterization of thyroid nodules with indeterminate fine needle aspiration cytology? *Thyroid*. 2012;22(2):165-172.
48. Bertagna F, Treglia G, Piccardo A, Giubbini R. Diagnostic and clinical significance of F-18-FDG-PET/CT thyroid incidentalomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(11):3866-3875.
49. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: A meta-analysis. *Acta Cytologica*. 2012;56(4):333-339.
50. Cibas ES, Ali S,Z. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *American Journal of Clinical Pathology*. 2015;132(5):658-665.
51. Straccia P, Rossi ED, Bizzarro T, et al. A meta-analytic review of the Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: Has the rate of malignancy in indeterminate lesions been underestimated? *Cancer Cytopathology*. 2015;123(12):713-722.

52. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(9):4393-4397. doi: 10.1210/jc.2003-030305 [doi].
53. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J*. 2004;45(5):818-821. doi: 200410818 [pii].
54. Hyeon J, Ahn S, Shin JH, Oh YL. The prediction of malignant risk in the category “atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance” of the Bethesda system for reporting thyroid cytopathology using subcategorization and BRAF mutation results. *Cancer Cytopathology*. 2014;122(5):368-376.
55. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: A prospective analysis of 1,056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96.
56. Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, et al. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(6):593-599.
57. Lin JD, Hsieh SH, Chang HY, Huang CC, Chao TC. Outcome after treatment for papillary thyroid cancer. *Head Neck*. 2001;23(2):140-146.
58. Lo C, Chan W, Lam K, Wan K. Follicular thyroid carcinoma: The role of histology and staging systems in predicting survival. *Ann Surg*. 2005;242(5):708-715.

59. Tuttle M, Morris LF, Haugen B, Shah J, Sosa JA, Rohren E, Subramaniam RM, Hunt JL, Perrier ND. Thyroid 2017. Differentiated and Anaplastic Carcinoma (Chapter 73). In: Amin MB, Edge SB, Greene F, Byrd D, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley J, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (eds) AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer International Publishing, New York City
60. Oyer SL, Smith VA, Lentsch EJ. Reevaluating the prognostic significance of age in differentiated thyroid cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;147(2):221-226.
61. Bischoff LA, Curry J, Ahmed I, Pribitkin E, Miller JL. Is above age 45 appropriate for upstaging well-differentiated papillary thyroid cancer? *Endocr Pract.* 2013;19(6):995-997.
62. Amphlett B, Lawson Z, Abdulrahman GO, Jr, et al. Recent trends in the incidence, geographical distribution, and survival from thyroid cancer in wales, 1985-2010. *Thyroid.* 2013;23(11):1470-1478.
63. Cho JS, Yoon JH, Park MH, et al. Age and prognosis of papillary thyroid carcinoma: Retrospective stratification into three groups. *Journal of the Korean Surgical Society.* 2012;83(5):259-266.
64. Nixon IJ, Kuk D, Wreesmann V, et al. Defining a valid age cutoff in staging of well-differentiated thyroid cancer. *Annals of surgical oncology.* 2015;23(2):410-415.

65. Papaleontiou M, Haymart MR. New insights in risk stratification of differentiated thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(1):1-7.
66. Machens A, Holzhausen H, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer*. 2005;103(11):2269-2273.
67. Arora N, Turbendian HK, Scognamiglio T, et al. Extrathyroidal extension is not all equal: Implications of macroscopic versus microscopic extent in papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2008;144(6):8.
68. Jung SP, Kim M, Choe JH, Kim JS, Nam SJ, Kim JH. Clinical implication of cancer adhesion in papillary thyroid carcinoma: Clinicopathologic characteristics and prognosis analyzed with degree of extrathyroidal extension. *World J Surg*. 2013;37(7):1606-1613.
69. Wang LY, Nixon IJ, Patel SG, et al. Operative management of locally advanced, differentiated thyroid cancer. *Surgery*. 2016;160(3):738-746.
70. Wang LY, Ghossein R, Palmer FL, et al. Microscopic positive margins in differentiated thyroid cancer is not an independent predictor of local failure. *Thyroid*. 2015;25(9):993-998.
71. Randolph GW, Duh QY, Heller KS, et al. The prognostic significance of nodal metastases from papillary thyroid carcinoma can be stratified based on the size and number of metastatic lymph nodes, as well as the presence of extranodal extension. *Thyroid*. 2012;22(11):1144-1152.
72. Schneider DF, Chen H, Sippel RS. Impact of lymph node ratio on survival in papillary thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(6):1906-1911.

73. Bardet S, Malville E, Rame J, et al. Macroscopic lymph-node involvement and neck dissection predict lymph-node recurrence in papillary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology*. 2008;158(4):551-560.
74. Bardet S, Ciappuccini R, Quak E, et al. Prognostic value of microscopic lymph node involvement in patients with papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(1):132-140.
75. Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, Phay JE. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery*. 2008;144(6):8.
76. Ruegamer JJ, Hay ID, Bergstralh EJ, Ryan JJ, Offord KP, Gorman CA. Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: A multivariate analysis of prognostic variables. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1988;67(3):501-508.
77. Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, et al. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*. 2003;197(2):191-197. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1072751503003326>. doi: [//dx.doi.org/10.1016/S1072-7515\(03\)00332-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1072-7515(03)00332-6).
78. Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: Benefits and limits of radioiodine therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(8):2892-2899.



79. Macedo FIB, Mittal VK. Total thyroidectomy versus lobectomy as initial operation for small unilateral papillary thyroid carcinoma: A meta-analysis. *Surgical Oncology*. 2015;24(2):117-122. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960740415000274>. doi: [//dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2015.04.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2015.04.005).
80. Rosato L, Avenia N, Bernante P, et al. Complications of thyroid surgery: Analysis of a multicentric study on 14,934 patients operated on in Italy over 5 years. *World J Surg*. 2004;28(3):271-276.
81. Verloop H, Louwerens M, Schoones JW, Kievit J, Smit JW, Dekkers OM. Risk of hypothyroidism following hemithyroidectomy: Systematic review and meta-analysis of prognostic studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(7):2243-2255.
82. Polachek A, Hirsch D, Tzvetov G, et al. Prognostic value of post-thyroidectomy thyroglobulin levels in patients with differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(11):855-860.
83. Park H, Gerard SK. Stunning by 131I scanning: Untoward effect of 131I thyroid imaging prior to radioablation therapy. In: Wartofsky L, Van Nostrand D, eds. *Thyroid cancer: A comprehensive guide to clinical management*. New York, NY: Springer New York; 2016:225-235. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3314-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3314-3_16). 10.1007/978-1-4939-3314-3\_16.
84. Schlumberger M, Catargi B, Borget I, et al. Strategies of radioiodine ablation in patients with low-risk thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(18):1663-1673.

85. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, et al. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008;35(10):1941.
86. Sherman SI. Cytotoxic chemotherapy for differentiated thyroid carcinoma. *Clinical Oncology*. 2010;22(6):464-468.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0936655510001263>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.clon.2010.03.014](http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2010.03.014).
87. Ito Y, Uruno T, Nakano K, et al. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid*. 2003;13(4):381-387.
88. Eustatia-Rutten CFA, Smit JWA, Romijn JA, et al. Diagnostic value of serum thyroglobulin measurements in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma, a structured meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(1):61-74.
89. Han JM, Kim WB, Yim JH, et al. Long-term clinical outcome of differentiated thyroid cancer patients with undetectable stimulated thyroglobulin level one year after initial treatment. *Thyroid*. 2012;22(8):784-790.
90. Klubo-Gwiedzinska J, Burman KD, Van Nostrand D, Wartofsky L. Does an undetectable rhTSH-stimulated tg level 12 months after initial treatment of thyroid cancer indicate remission? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74(1):111-117.
91. Krahn J, Dembinski T. Thyroglobulin and anti-thyroglobulin assays in thyroid cancer monitoring. *Clinical Biochemistry*. 2009;42(4):416-419.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912008006449>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.12.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.12.017).

92. Chung J-, Park YJ, Kim TY, et al. Clinical significance of elevated level of serum antithyroglobulin antibody in patients with differentiated thyroid cancer after thyroid ablation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(2):215-221.
93. Ringel M,D., Nabhan F. Approach to follow-up of the patient with differentiated thyroid cancer and positive anti-thyroglobulin antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(8):3104-3110.
94. de Meer, Siegrid G A, Vorselaars, Wessel M C M, Kist JW, et al. Follow-up of patients with thyroglobulin-antibodies: Rising tg-ab trend is a risk factor for recurrence of differentiated thyroid cancer. *Endocr Res*. 2017:1-9.
95. Kalender E, Elboga U, Celen YZ, Demi HD, Sahin E, Yilmaz M. Is it necessary to perform control diagnostic 131I whole body scan after remnant ablation in differentiated thyroid carcinoma patients who have stimulated tg levels under 2 ng/ml? *Internal Medicine Inside*. 2013;1(1).
96. Lamartina L, Deandreis D, Durante C, Filetti S. Endocrine tumours: Imaging in the follow-up of differentiated thyroid cancer: Current evidence and future perspectives for a risk-adapted approach. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(5):185.
97. Ma C. Differentiated thyroid carcinoma with elevated thyroglobulin and negative radioiodine whole-body scan metastases. In: Ahmadzadehfar H, ed. *Thyroid cancer - advances in diagnosis and therapy*. Rijeka: InTech; 2016:Ch. 08. <http://dx.doi.org/10.5772/64356>. 10.5772/64356.
98. Caetano R, Bastos CR, de Oliveira IA, et al. Accuracy of positron emission tomography and positron emission tomography-CT in the detection of

differentiated thyroid cancer recurrence with negative (131) I whole-body scan results: A meta-analysis. *Head Neck*. 2016;38(2):316-327.

99. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13.

100. Tanaka TN, Alloju SK, Oh DK, Cohen EE. Thyroid cancer: Molecular pathogenesis, tyrosine kinase inhibitors, and other new therapies. *American Journal of Hematology/Oncology®*. 2015;11(4).

101. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Signaling through enzyme-coupled cell-surface receptors. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, eds. *Molecular biology of the cell, 5th edition*. New York: Garland Science; 2007:921-944.

102. Weinberg R. Growth factors, receptors and cancer. In: Weinberg R, ed. *The biology of cancer, 2nd edition*. New York: Garland Science; 2013:131-174.

103. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22.

104. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004;30(2):193-204.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737203001622>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007).

105. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol*. 2011;24:S43.

106. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAF<sup>V600E</sup>: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(3):385-394. <http://mct.aacrjournals.org/content/10/3/385.abstract>. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0799.
107. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged. *Cancer Cell.* 2004;6(4):313-319. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153561080400279X>. doi: [//dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022](http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022).
108. Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg.* 2007;246(3):466-471.
109. Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H, Shi Y, Alzahrani AS. Classical V600E and other non-hotspot BRAF mutations in adult differentiated thyroid cancer. *Journal of Translational Medicine.* 2016;14:204.
110. Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailem M, Al-Hindi H, Shi Y. Single point mutations in pediatric differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2017;27(2):189-196.
111. Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Cancer.* 2012;118(7):1764-1773.
112. Czarniecka A, Oczko-Wojciechowska M, Barczyński M. BRAF V600E mutation in prognostication of papillary thyroid cancer (PTC) recurrence. *Gland Surgery.* 2016;5(5):495-505.

113. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews*. 2007;28(7):742-762.
114. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013;309.
115. Li J, Zhang S, Zheng S, Zhang D, Qiu X. The BRAF V600E mutation predicts poor survival outcome in patients with papillary thyroid carcinoma: A meta analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(12):22246-22253.
116. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-2467.
117. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist*. 2013;18.
118. Xing M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: A blurred picture now emerging clearer. *BMC Medicine*. 2016;14:12.
119. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: New insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid*. 2012;22.
120. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: An independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 1994;116(6):1010-1016.

121. Medici M, Kwong N, Angell TE, Marqusee E, Kim MI, Frates MC. The variable phenotype and low-risk nature of RAS-positive thyroid nodules. *BMC Med.* 2015;13.
122. Weinberg R. Eternal life: Cell immortalization and tumorigenesis. In: Weinberg R, ed. *The biology of cancer, 2nd edition.* ; 2013:391-437.
123. Sandin S, Rhodes D. Telomerase structure(). *Curr Opin Struct Biol.* 2014;25(100):104-110.
124. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(3):R155.
125. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol.* 2014;32.
126. Xing M, Liu R, Bishop J. TERT promoter and BRAF mutations cooperatively promote papillary thyroid cancer-related mortality. *Thyroid.* 2014;24.
127. Vu-Phan D, Koenig RJ. Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2014;386(1):55-66.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720713003250>. doi:  
[//dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.030](http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.030).
128. Min HS, Lee C, Jung KC. Correlation of immunohistochemical markers and BRAF mutation status with histological variants of papillary thyroid carcinoma in the korean population. *J Korean Med Sci.* 2013;28(4):534-541.

129. Beg S, Siraj AK, Jehan Z, et al. PTEN loss is associated with follicular variant of middle eastern papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1938-1943.
130. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid*. 2010;20.
131. Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, et al. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a middle eastern population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(2):611-618. doi: jc.2007-1717 [pii].
132. Santoro M, Carlomagno F. Central role of RET in thyroid cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(12):a009233.
133. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: Effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3603-3610.
134. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res*. 1997;57(9):1690-1694.
135. Romei C, Elisei R. RET/PTC translocations and clinico-pathological features in human papillary thyroid carcinoma. *Frontiers in Endocrinology*. 2012;3:54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356050/>. doi: 10.3389/fendo.2012.00054.



136. Kato Y, Ying H, Zhao L, et al. PPARgamma insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Oncogene*. 2006;25(19):2736-2747. doi: 1209299 [pii].
137. Raman P, Koenig RJ. PAX8-PPAR $\gamma$  fusion protein in thyroid carcinoma. *Nature reviews.Endocrinology*. 2014;10(10):616-623.
138. Boos LA, Dettmer M, Schmitt A, et al. Diagnostic and prognostic implications of the PAX8-PPARgamma translocation in thyroid carcinomas-a TMA-based study of 226 cases. *Histopathology*. 2013;63(2):234-241.
139. Weinberg R. p53 and apoptosis: Master guardian and executioner. In: Weinberg R, ed. *The biology of cancer, 2nd edition*. New York: Garland Science; 2013:331-390.
140. Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. P53 family proteins in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2007;14(1):43-60.
141. Park, Koh, Kim, et al. Prevalences of gsa, ras, p53 mutations and ret/PTC rearrangement in differentiated thyroid tumours in a korean population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(3):317-323. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2265.1998.00515.x>. doi: 10.1046/j.1365-2265.1998.00515.x.
142. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. Bcl-2, P53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 1996;73(2):139-143.
143. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*. 1994;24(3):205-210.

144. Omar E, Madhavan M, Othman NH. Immunohistochemical localisation of RET and p53 mutant protein of thyroid lesions in a north-eastern malaysian population and its prognostic implications. *Pathology*. 2004;36(2):152-159.
145. Bachmann K, Pawliska D, Kaifi J, et al. P53 is an independent prognostic factor for survival in thyroid cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(6B):3993-3997.
146. Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical significance of P53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2008;32(12):2617.
147. Charles RP, Silva J, Iezza G, Phillips WA, McMahon. M. Activating BRAF, PIK3CA Mutations Cooperate to Promote Anaplastic Thyroid Carcinogenesis. *Mol Cancer Res*. 2014; 12:979–86. <https://doi.org/10.1158/1541-7786>.
148. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer<sup>1</sup>, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1167-214. doi: 10.1089/thy.2009.0110.
149. Nilubol N, Zhang L, Kebebew E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid*. 2013;23(6):695-702.
150. Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D, et al. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid*. 2006;16(12):1229-1242.

151. Xue S, Wang P, Liu J, Chen G. Total thyroidectomy may be more reasonable as initial surgery in unilateral multifocal papillary thyroid microcarcinoma: A single-center experience. *World Journal of Surgical Oncology*. 2017;15(1):62. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1130-7>. doi: 10.1186/s12957-017-1130-7.
152. Papageorgiou MS, Liratzopoulos N, Efremidou EI, Karanikas M, Minipoulos G, Manolas KJ. Multifocality of thyroid carcinomas: A "privilege" of papillary tumors or not? *G Chir*. 2010;31(1-2):20-23. doi: 4014 [pii].
153. Kuo S, Lin S, Chao T, Hsueh C, Lin K, Lin J. Prognosis of multifocal papillary thyroid carcinoma. *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013:6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/809382>.
154. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, Deraje S, Carlson DL, Migliacci J, Knauf JA, Untch B, Berger MF, Morris L, Tuttle RM, Chan T, Fagin JA, Ghossein R, Ganly I. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res*. 2017 Oct 1;23(19):5970-5980. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1183.
155. Agrawal N et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. Cancer Genome Atlas Research Network1. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):676-90. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050.
156. Charles RP, Silva J, Iezza G, Phillips WA, McMahon. M. Activating BRAF, PIK3CA Mutations Cooperate to Promote Anaplastic Thyroid Carcinogenesis. *Mol Cancer Res*. 2014; 12:979–86. <https://doi.org/10.1158/1541-7786>.

157. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Leite V, Lobo C, Cameselle-Teijeiro JM, Cavadas B, Pereira L, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Jun 1;102(6):1898-1907. doi: 10.1210/jc.2016-2785.

158 Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013 Apr 10;309(14):1493-501. doi: 10.1001/jama.2013.3190

159 Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Jan 1;33(1):42-50. doi: 10.1200/JCO.2014.56.8253. Epub 2014 Oct 20.

160 Elisei R, Viola D, Torregrossa L, Giannini R, Romei C et al. The BRAF(V600E) mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma: single-institution results from a large cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;97(12):4390-8. doi: 10.1210/jc.2012-1775. Epub 2012 Oct 12.

161 Barollo S, Pennelli G, Vianello F, Watutantrige Fernando S, Negro I et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131)I and 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. *Eur J Endocrinol.* 2010 Oct;163(4):659-63. doi: 10.1530/EJE-10-0290. Epub 2010 Jul 20.

162 Galuppini F, Pennelli G, Vianello F, Censi S, Zambonin L et al. BRAF analysis before surgery for papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological

features and prognosis in a single-institution prospective experience. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Sep 1;54(9):1531-9. doi: 10.1515/cclm-2015-0218.

163 Damiani L, Lupo S, Rossi R, Bruni S, Bartolomei M et al. Evaluation of the Role of BRAFV600E Somatic Mutation on Papillary Thyroid Cancer Disease Persistence: A Prospective Study. *Eur Thyroid J.* 2018 Oct;7(5):251-257. doi: 10.1159/000490699. Epub 2018 Jul 13.

164 Vuong HG, Altibi AM, Duong UN, Ngo HT, Pham TQ et al. Role of molecular markers to predict distant metastasis in papillary thyroid carcinoma: Promising value of TERT promoter mutations and insignificant role of BRAF mutations-a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2017 Oct;39(10):1010428317713913. doi: 10.1177/1010428317713913

165. Pennelli G, Vianello F, Barollo S, Pezzani R, Merante Boschin I, Pelizzo MR, Mantero F, Rugge M, Mian C. BRAF(K601E) mutation in a patient with a follicular thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2011 Dec;21(12):1393-6. doi: 10.1089/thy.2011.0120.

166. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20.

167. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S, Bishop J. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol.* 2014 Sep 1;32(25):2718-26. doi: 10.1200/JCO.2014.55.5094.

168. Pani F, Macerola E, Basolo F, Boi F, Scartozzi M, Mariotti S. Aggressive differentiated thyroid cancer with multiple metastases and NRAS and TERT

promoter mutations: A case report. *Oncol Lett.* 2017 Aug;14(2):2186-2190. doi: 10.3892/ol.2017.6395. Epub 2017 Jun 16.

169. Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailem M, Al-Hindi H, Shi Y. Single Point Mutations in Pediatric Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2017 Feb;27(2):189-196. doi: 10.1089/thy.2016.0339. Epub 2016 Dec 20.