



**UNIVERSITÀ DI PISA**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Direttore Prof. Mario Petrini

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica  
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia  
Direttore Prof. Giulio Guido

---

## CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

“Ruolo delle mutazioni del gene BRAF nei tumori tiroidei a basso rischio di malignità”

RELATORE  
CHIAR.MO PROF. Fulvio Basolo

CANDIDATO  
SIG. Alessandro Brancatella

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

# Indice

Indice delle figure	Pag. 3
Indice delle tabelle	7
Elenco delle abbreviazioni	10
Sommario	12
Introduzione	13
Parte I- Sviluppo, anatomia e fisiologia della tiroide	17
• Sviluppo della tiroide	17
• Anatomia macroscopica	18
• Anatomia microscopica	19
• Sintesi, liberazione e metabolismo periferico degli ormoni tiroidei	20
Parte II- Inquadramento della patologia neoplastica tiroidea	24
• Gestione clinica del paziente con nodulo tiroideo	24
• Epidemiologia del carcinoma della tiroide	28
• Fattori di rischio del carcinoma tiroideo	30
• Caratteristiche cliniche del carcinoma tiroideo e sua gestione	32
• Prognosi del carcinoma della tiroide e stadiazione	36
Parte III- Caratteristiche citologiche ed istologiche delle neoplasie tiroidee	39
• L'importanza dell'agoaspirato tiroideo nella diagnosi di carcinoma	39
• Classificazione citologica delle lesioni tiroidee	40
✓ Categoria non diagnostica	45
✓ Categoria benigna	45
✓ Categoria indeterminata	46
✓ Categoria di sospetta malignità	46
✓ Categoria maligna	47
• Classificazione istologica delle neoplasie differenziate della tiroidea	47
✓ Adenoma follicolare	48
✓ Carcinoma follicolare	50

✓ Carcinoma papillare	Pag. 53
✓ Variante follicolare del carcinoma papillare	58
• Criticità nella valutazione prognostica e diagnostica del carcinoma differenziato della tiroide	60
Parte IV- Caratterizzazione molecolare dei carcinomi tiroidei e ruolo chiave di BRAF	61
• Marcatori genetici nel carcinoma tiroideo	61
✓ PAX8/PPAR $\gamma$	66
✓ PI3K	67
✓ RET/PTC	67
✓ RAS	68
• BRAF:caratteristiche molecolari	70
• Ruolo delle mutazioni di BRAF nel carcinoma papillare della tiroide	71
• Valore diagnostico delle mutazioni di BRAF nei carcinomi tiroidei	74
• Valore prognostico delle mutazioni di BRAF nel carcinoma papillare della tiroide	76
Parte V- Casistica, metodi e risultati	80
• Selezione dei pazienti e metodi	80
• Analisi delle mutazioni di BRAF	84
✓ Microdissezione ed estrazione del DNA	84
✓ Amplificazione, identificazione dei profili genici mutati e sequenziamento.	86
✓ Analisi statistica	88
• Risultati	88
✓ Casistica "generale"	88
✓ Casistica "low risk"	91
✓ Casistica "very low risk"	93
Discussione	96
Conclusioni, criticità, prospettive future	105
Figure e tabelle	108
Bibliografia	130
Ringraziamenti	135

## Indice delle figure

Figura 1: Rapporti e vascolarizzazione della tiroide.	<i>Pag.</i> 18
Figura 2: Microscopica della tiroide.	20
Figura 3: Algoritmo aggiornato sulla gestione del paziente con nodulo tiroideo.	27
Figura 4: Incidenza del carcinoma della tiroide nella popolazione mondiale.	28
Figura 5: Variazione nel tasso di incidenza del cancro della tiroide nel periodo 1975-2005 nelle varie fasce di età.	29
Figura 6: Adenoma follicolare in microscopica.	49
Figura 7: Carcinoma follicolare in microscopica.	52
Figura 8: Aspetto macroscopico tipico di un carcinoma papillare della tiroide.	54
Figura 9: Carcinoma papillare in microscopica.	56
Figura 10: Variante follicolare del carcinoma papillare in microscopica.	59
Figura 11: Schematizzazione delle principali molecole coinvolte nella trasmissione del segnale a livello tiroideo.	63
Figura 12: Modello semplificato della via di trasduzione del segnale mediata da RAS.	69
Figura 13: Rappresentazione grafica della distribuzione delle principali caratteristiche istologiche nel campione di 2864 casi preso in esame.	82
Figura 14: Distribuzione delle diverse varianti di PTC all'interno del campione di 2864 pazienti.	82

Figura 15: Rappresentazione grafica della distribuzione della casistica tra gli stadi pT del sistema classificativo TNM. Campione 2864 pazienti.	<i>Pag.</i> 83
Figura 16: Rappresentazione grafica della distribuzione dei carcinomi tra i vari stadi proposti dall'AJCC. Campione 2864 pazienti.	84
Figura 17 : Grafico ottenuto mediante HRMA della mutazione V600E del gene BRAF.	87
Figura 18: Rappresentazione grafica della frequenza percentuale della mutazione di BRAF. Campione 2864 pazienti.	108
Figura 19: Rappresentazione grafica della frequenza percentuale delle differenti mutazioni di BRAF. Campione 2864 pazienti.	108
Figura 20: Rappresentazione grafica della distribuzione delle mutazioni di BRAF nelle differenti varianti di carcinoma papillare. Campione 2864 pazienti.	109
Figura 21: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei due sessi. Campione 2864 pazienti.	110
Figura 22: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali. Campione 2864 pazienti.	111
Figura 23: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati. Campione 2864 pazienti.	112
Figura 24: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione extratiroidea. Campione 2864 pazienti.	113
Figura 25: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza metastasi linfonodali. Campione 2864 pazienti.	114

Figura 26: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei diversi stadi della stadiazione pTNM. Campione 2864 pazienti.	Pag. 115
Figura 27: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei diversi stadi della stadiazione AJCC. Campione 2864 pazienti.	116
Figura 28: Rappresentazione grafica e corrispettivo anatomopatologico dei vari livelli di invasione. Campione 1798 pazienti.	116
Figura 29: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF nella casistica "low-risk". Campione 1798 pazienti.	117
Figura 30: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati nel sottogruppo "low-risk". Campione di 1798 pazienti.	118
Figura 31: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale delle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti.	119
Figura 32: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nelle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti.	120
Figura 33: Rappresentazione grafica delle caratteristiche (unifocale/multifocale, capsulato/non capsulato, invasione capsula tiroidea/non invasione della capsula tiroidea) dei carcinomi "very low risk". Campione 499 pazienti.	121
Figura 34: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 preparati.	121
Figura 35: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei due sessi nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	122

Figura 36: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	<i>Pag. 123</i>
Figura 37: Rappresentazione grafica della distribuzione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	124
Figura 38: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF nei carcinomi con o senza invasione della capsula tiroidea nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	125
Figura 39: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi di dimensioni inferiori e superiori al centimetro nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	126
Figura 40: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF negli stadi pT1 e pT2 (TNM) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	127
Figura 41: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF negli stadi I e II (AJCC) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	128
Figura 42: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF in base alle diverse caratteristiche istologiche analizzate. Campione 2864 pazienti.	129

## Indice delle tabelle

Tabella 1: Stadiazione TNM del carcinoma della tiroide.	<i>Pag.</i> 37
Tabella 2: Classificazione in stadi del carcinoma tiroideo proposta dall'AJCC.	38
Tabella 3: Bethesda System: classificazione dei preparati citologici tiroidei.	42
Tabella 4: Percentuale di rischio di lesione maligna per ogni categoria citologica e approccio terapeutico standard.	43
Tabella 5: Nuova classificazione citologica dei preparati tiroidei sulla base del "consensus" italiano del 2014.	44
Tabella 6: Varianti del carcinoma papillare della tiroide in base alla classificazione proposta dal WHO.	57
Tabella 7: Frequenza delle principali mutazioni genetiche riscontrate nei diversi tipi istologici del carcinoma tiroideo.	65
Tabella 8: Frequenza di BRAF V600E nei carcinomi tiroidei sporadici (dati letteratura).	73
Tabella 9: Frequenza di BRAF V600E nelle principali varianti del carcinoma papillare della tiroide (dati letteratura).	74
Tabella 10: Correlazione tra BRAF V600E e caratteristiche patologiche e cliniche in 1047 sPTC (Basolo F. 2010).	78
Tabella 11: Correlazione tra BRAF V600E e gli aspetti patologici e clinici in 578 micro PTC (Basolo F. 2010).	79
Tabella 12: Frequenza della mutazione di BRAF nelle diverse varianti del carcinoma papillare. Campione 2864 pazienti.	109
Tabella 13: Distribuzione della mutazione di BRAF nei due sessi. Campione 2864 pazienti.	110



Tabella 14: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali. Campione 2864 pazienti.	<i>Pag.</i> 111
Tabella 15: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati. Campione 2864 pazienti.	112
Tabella 16: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione extratiroidea. Campione 2864 preparati.	113
Tabella 17: Frequenza della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza presenza di metastasi linfonodali. Campione di 2864 pazienti.	114
Tabella 18: Distribuzione della mutazione di BRAF nei differenti stadi della classificazione pTNM e AJCC. Campione 2864 pazienti.	115
Tabella 19: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati nel sottogruppo "low risk". Campione 1798 pazienti.	118
Tabella 20: Distribuzione della mutazione di BRAF nelle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti.	120
Tabella 21: Distribuzione della mutazione di BRAF nei due sessi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	122
Tabella 22: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	123
Tabella 23: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	124
Tabella 24: Distribuzione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione della capsula tiroidea del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	125
Tabella 25: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi di dimensioni inferiori e superiore al centimetro nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	126

Tabella 26: Distribuzione della mutazione di BRAF negli stadi pT1 e pT2 (TNM) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	<i>Pag. 127</i>
Tabella 27: Distribuzione della mutazione di BRAF negli stadi I e II (AJCC) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.	<i>128</i>
Tabella 28: Distribuzione della mutazione di BRAF secondo i vari aspetti istologici analizzati. Campione 2864 pazienti.	<i>129</i>

## Elenco delle abbreviazioni

**T4:** Tiroxina

**T3:** triiodotironina

**TTF1:** thyroid transcription factor 1

**TTF2:** thyroid transcription factor 2

**Tg:** tireoglobulina

**NIS:** Na/I symporter

**TSH-R:** recettore dell'ormone tireostimolante

**MIT:** monoiodotironina

**DIT:** diiodotironina

**TBG:** thyroxine binding globulin

**TTR:** transtiretina

**MCT:** monocarbossilato 8

**TR:** recettore degli ormoni tiroidei

**TSH:** ormone tireostimolante

**PTC:** carcinoma papillare della tiroide

**sPTC:** carcinoma papillare della tiroide small (< 20 mm)

**microPTC:** micro-carcinoma papillare della tiroide (< 10 mm)

**FTC:** carcinoma follicolare della tiroide

**MTC:** carcinoma midollare della tiroide

**AC:** carcinoma anaplastico

**FNAB:** fine needle aspiration biopsy

**GMN:** gozzo multinodulare

**MEN:** neoplasia endocrina multipla

**TC:** tomografia computerizzata

**Tx:** tiroidectomia totale

**RM:** risonanza magnetica

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinases

**PI3K:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

**AKT:** RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

**m-TOR:** mammalian target of rapamycin

**RAS:** "Rat sarcoma" protein

**BRAF:** B - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

**GTP:** guanosina trifosfato

**GDP:** guanosina difosfato

**RET:** rearranged during transfection

**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog

**PAX8:** Paired box gene 8

**PPAR $\gamma$ :** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

**PCR:** polymerase chain reaction

**HRMA:** High Resolution Melt analysis

**WBS:** whole body scintigraphy

## Sommario

I recenti studi di biologia molecolare hanno aperto nuovi orizzonti nello studio dei carcinomi tiroidei differenziati. In questo contesto la mutazione BRAF V600E rappresenta attualmente uno dei target principali delle ricerche nella cancerogenesi dei carcinomi papillari. Questa mutazione infatti risulta espressa unicamente in questi carcinomi tiroidei, con una frequenza stimata in letteratura intorno al 44%. Inoltre, da recenti studi condotti, sembrerebbe che la mutazione BRAF V600E conferisca caratteristiche particolarmente aggressive ai carcinomi tiroidei che la esprimono, nonostante questi rimangano tra le neoplasie maligne con la prognosi migliore. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la frequenza della mutazione di BRAF in una casistica molto ampia (2864 pazienti operati per carcinoma papillare della tiroide) e analizzare se questa mutazione effettivamente conferisca aspetti suggestivi di aggressività ai tumori che la esprimono. Nella seconda fase del nostro studio abbiamo concentrato le nostre energie nel valutare se la mutazione di BRAF rappresenti un possibile fattore prognostico anche in casistiche selezionate di pazienti, che secondo le linee guida internazionali si caratterizzano per un teorico basso rischio di recidiva e per un decorso particolarmente indolente della malattia. I risultati attualmente in nostro possesso confermano, nella casistica generale, la correlazione tra mutazione di BRAF e una serie di aspetti istologici suggestivi di aggressività (assenza di capsula tumorale, invasione della capsula tiroidea e dei tessuti circostanti, multifocalità e presenza di metastasi linfonodali). Inoltre anche nelle casistiche a basso e bassissimo rischio la mutazione di BRAF sembrerebbe conferire un comportamento più aggressivo alla neoplasia. Sulla base di questi dati potrebbe essere opportuno una rivalutazione delle casistiche a basso rischio mediante l'introduzione di parametri di biologia molecolare nella loro determinazione.

## Introduzione

Il carcinoma della tiroide rappresenta la più frequente neoplasia in ambito endocrinologico e la sua incidenza è andata aumentando negli ultimi decenni. Nel sesso femminile l'incidenza di queste neoplasie è di circa 9 casi ogni 100.000 abitanti rispetto ai 3 casi ogni 100.000 abitanti del sesso maschile. Questo incremento nell'incidenza va di pari passo con l'aumento delle diagnosi di noduli tiroidei, condizioni queste assai frequenti, potendo riguardare fino al 10% dell'intera popolazione. Addirittura è stato stimato che nella popolazione over 60, la prevalenza di noduli tiroidei visualizzabili all'ecografia possa essere prossima al 50-60%. (1)

Si intuisce pertanto che il principale obiettivo nella gestione di un paziente con nodulo tiroideo sia l'identificazione delle lesioni maligne. Sebbene questo obiettivo venga perseguito nella maggior parte dei casi con le procedure diagnostiche standard (ecografia e agoaspirato), tuttavia queste tecniche non riescono a fornire una diagnosi definitiva in alcuni casi. Anche l'agoaspirato, che rappresenta attualmente la metodica diagnostica pre-operatoria più efficace, non è in grado di chiarire sempre la natura di un nodulo e molte ricerche sono volte proprio ad identificare nuovi parametri citologici o molecolari che possano aiutare nella diagnosi di quei preparati classificati altrimenti come "indeterminati". (2)

Nell'ambito dei carcinomi delle tiroide, si descrivono generalmente una serie di tipi istologici. Questi includono:

- Carcinoma papillare della tiroide (PTC)
- Carcinoma follicolare della tiroide (FTC)
- Carcinoma della tiroide poco differenziato (PDC)
- Carcinoma anaplastico della tiroide (AC)
- Carcinoma midollare della tiroide (MTC)

Il carcinoma papillare della tiroide e il carcinoma follicolare della tiroide rappresentano i carcinomi differenziati e complessivamente sono oltre il 90% di tutti i carcinomi tiroidei. I carcinomi differenziati si caratterizzano per una crescita lenta e indolente e generalmente sono curabili, con una prognosi spesso ottima soprattutto se paragonata a quella media dei tumori maligni che interessano altri distretti anatomici. Il carcinoma anaplastico della tiroide è molto raro ma è gravato da una prognosi infausta, mentre il carcinoma della tiroide poco differenziato si caratterizza per un decorso intermedio tra quello dei carcinomi differenziati e il carcinoma anaplastico. Infine il carcinoma midollare della tiroide origina dalle cellule parafollicolari della tiroide e ha un comportamento piuttosto aggressivo (3)

Il trattamento tipico dei carcinomi tiroidei è rappresentato dalla tiroidectomia totale seguita in molte occasioni da terapia radiometabolica. Attualmente le principali cause di morte correlate ai carcinomi tiroidei sono rappresentate dai tipi istologici anaplastico e poco differenziato oppure da carcinomi tiroidei differenziati che non rispondono alle terapie radiometaboliche o risultano inoperabili. Inoltre, occorre dire che, se i carcinomi differenziati sono da un lato gravati da una bassa mortalità, dall'altro presentano una certa tendenza alla recidiva, che alcuni autori hanno stimato prossima addirittura al 20%. È pertanto fondamentale riuscire a comprendere bene la classe di rischio del singolo paziente e sulla base di questa scegliere il trattamento migliore valutando benefici e rischi delle varie terapie. (4)

Nell'ambito del carcinoma papillare della tiroide, su cui si concentrerà il nostro studio, attualmente si classificano come "*low-risk*" quei carcinomi che presentano una serie di caratteristiche ben precise. Esse comprendono:

- Nessuna metastasi né locale né a distanza;
- Margini di escissione chirurgica della neoplasia indenni;
- Nessun segno di invasione locale;

- Nessuna istologia aggressiva (es. cellule alte o colonnari) o segni di invasione vascolare;
- Nessun segno di captazione di radioiodio al di fuori del letto tiroideo alla prima scintigrafia total-body (WBS) eseguita dopo l'intervento.

Le dimensioni tumorali svolgono un ruolo importante seppur controverso nella valutazione del rischio tanto che generalmente si definiscono microPTC quei carcinomi papillari della tiroide di dimensioni pari o inferiori ai 10 mm mentre si parla di small PTC (sPTC) per indicare quei carcinomi papillari di dimensioni uguali o inferiori ai 20 mm. Se per i microPTC è stato raggiunto un consenso piuttosto unanime sulla modalità di gestione e trattamento, ben diverso è il discorso per i sPTC. Fino a poco tempo fa queste lesioni venivano classificate, secondo la stadiazione TNM, come pT2 mentre attualmente secondo il più aggiornato TNM rientrano nell'ambito del pT1 se non invadono strutture extratiroidee o nel pT3 se presentano un'estensione anche minima extraghiandolare. Da un punto di vista terapeutico i sPTC che non presentano né metastasi linfonodali né invasione extratiroidea, vengono generalmente considerati a basso rischio e trattati efficacemente con la sola tiroidectomia mentre per i sPTC con estensione extraghiandolare si adottano terapie più aggressive. (5)

È nell'ambito di tutte queste difficoltà diagnostiche, stadiative, prognostiche e cliniche che oggi si stanno sviluppando numerosi studi volti all'analisi dei fattori molecolari coinvolti nello sviluppo dei carcinomi differenziati della tiroide. Molti progressi sono stati fatti negli ultimi 10 anni nei quali si è compreso che due sono le vie principalmente coinvolte nella cancerogenesi a livello tiroideo: la via delle MAP chinasi (MAPK) e la via di PI3KCA/AKT. (6)

Un ruolo chiave nella cancerogenesi dei PTC è svolta dal gene BRAF. Esso appartiene alla famiglia dei geni RAF che codificano per proteine fondamentali nella trasduzione del segnale nella via RAS-RAF-MAPK. Una mutazione



attivante localizzata sull'esone 15 del gene di BRAF determina una sostituzione aminoacidica (glutammato al posto di valina) in un sito fondamentale della proteina. Ne deriva un fattore BRAF costitutivamente attivato (BRAF V600E) con conseguente iperattivazione della via e stimolo proliferativo continuo.

Fin dalla sua scoperta nei carcinomi tiroidei, la mutazione di BRAF V600E è stata identificata esclusivamente nei carcinomi papillari della tiroide con una prevalenza stimata intorno al 45%. Questo ha fatto ipotizzare un ruolo primariamente diagnostico di BRAF V600E. Se tuttavia nei successivi studi il ruolo diagnostico di BRAF è stato ridimensionato soprattutto per la scarsa sensibilità di questo marcatore nei preparati citologici indeterminati, dall'altro è emerso sempre più chiaro un suo significato prognostico. In particolar modo la mutazione BRAF V600E sembrerebbe conferire un comportamento aggressivo ai carcinomi papillari che la esprimono, con una maggiore tendenza all'invasione capsulare, alla metastatizzazione linfonodale, all'invasione dei tessuti extratiroidei. Inoltre la mutazione di BRAF avrebbe la tendenza a rendere questi carcinomi scarsamente responsivi alle tradizionali terapie. (7)

Obiettivo del presente studio è quello di indagare ulteriormente il significato prognostico di BRAF V600E valutando la correlazione tra la sua espressione nei carcinomi tiroidei e aspetti anatomopatologici suggestivi di invasività.

Al fine di un corretto inquadramento dello studio, procederò innanzitutto a descrivere in modo dettagliato gli aspetti principali delle neoplasie maligne della tiroide.

## Parte I- Sviluppo, anatomia e fisiologia della tiroide.

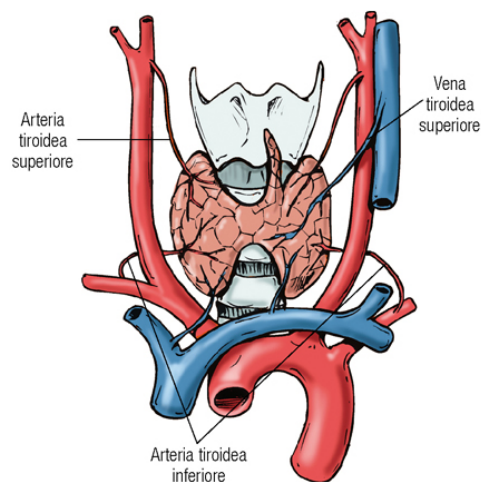
### Sviluppo della tiroide

La tiroide ( dal greco *thyreos*, scudo, ed *eidos*, forma) origina da un'estroflessione mediana dell'endoderma tra il corpo e la radice della lingua. A partire dalla terza settimana di gestazione, migra in basso verso la cavità toracica. In questa fase sono riconoscibili due parti nella ghiandola: una superiore, allungata e cava, il *dotto tireoglosso* e una inferiore a forma di H, la *tiroide* propriamente detta. Con quest'ultima si fondono due abbozzi laterali, derivati dalla quarta tasca branchiale, da cui origineranno le *cellule parafollicolari*, responsabili della secrezione di calcitonina. Il dotto tireoglosso va incontro a completa regressione entro il quarto mese di gravidanza, anche se talvolta possono rimanere dei residui che danno origine ad aree di tessuto ectopico (*tiroide linguale*). L'organizzazione in follicoli avviene verso la decima settimana; nelle due settimane successive, le cellule tiroidee acquisiscono la capacità di organizzazione dello iodio e di secernere gli ormoni tiroidei, la tiroxina (T4) e la triiodotironina (T3).

Lo sviluppo della tiroide è regolato dall'attività di un pattern genetico piuttosto complesso. Il fattore di trascrizione tiroideo 1 (*thyroid transcription factor*, TTF-1), il TTF-2 e il paired homeobox-8 (PAX-8) sono espressi selettivamente, ma non esclusivamente, nella ghiandola tiroidea. Questi geni sono indispensabili per la successiva espressione di quei fattori fondamentali per l'attività della ghiandola come ad esempio il gene della tireoglobulina (Tg), la tireoperossidasi (TPO), il trasportatore sodio ioduro (*Na/I symporter*, NIS) e il recettore dell'ormone tireostimolante (TSH-R). Mutazioni a carico dei fattori trascrizionali o dei geni bersaglio possono essere cause rare di agenesia tiroidea o di disormogenesi, sebbene le cause nella maggior parte dei casi di ipotiroidismo congenito rimangano assolutamente sconosciute. (8)

## Anatomia macroscopica

La tiroide è localizzata nel collo, anteriormente alla trachea, tra la cartilagine cricoidea e l'incisura soprasternale. È formata da due lobi, destro e sinistro, piriformi con apici in alto che a livello del I o II anello tracheale sono riuniti da una parte trasversale, detta istmo. Con una certa frequenza (dal 30 al 50% dei casi) dal margine superiore dell'istmo si diparte un prolungamento parenchimale, generalmente spostato verso sinistra, il *lobo piramidale* o *piramide di Morgagni*, in direzione della radice della lingua, ripetendo il decorso del dotto tireoglossa, di cui rappresenta il residuo. Normalmente pesa da 12 a 20 grammi, ha colorito rosso bruno, superficie liscia, consistenza molle. La tiroide presenta una larghezza di circa 7 cm, un'altezza di 3 cm e uno spessore variabile tra 0,5 e 2 cm passando dall'istmo ai lobi. È una ghiandola riccamente vascolarizzata. Le arterie tiroidee superiori sono rami della carotide esterna, quelle inferiori della succlavia. In un 10% dei casi è presente l'arteria tiroidea *ima* di solito staccata dall'arco aortico. (Figura 1)



**Figura 1: Rapporti e vascolarizzazione della tiroide (2)**

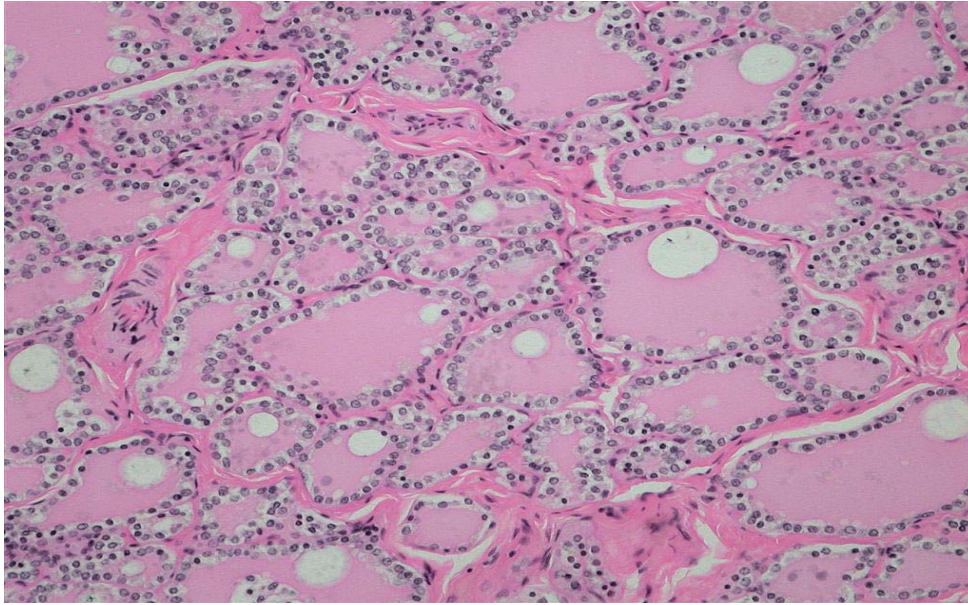
La vena tiroidea superiore drena il sangue refluo nella giugulare interna, la vena tiroidea inferiore nella succlavia. Il drenaggio linfatico è molto ricco: una

prima zona di drenaggio è rappresentata dai linfonodi situati lungo la linea mediana al di sopra dell'istmo e dai linfonodi mediastinici superiori; una zona di drenaggio successiva è costituita dai linfonodi laterali del collo situati lungo le vene giugulari interne. (9)

## Anatomia microscopica

La tiroide è avvolta da una propria capsula fibrosa da cui si emanano sepimenti connettivali che, distribuendosi in maniera irregolare all'interno dell'organo, suddividono il parenchima in aree di forma e dimensioni diverse, impropriamente definiti lobuli. I sepimenti più fini continuano con il delicato stroma che circonda i singoli follicoli tiroidei ed in cui è contenuta una ricca trama vascolare.

La tiroide è una ghiandola endocrina di tipo follicolare; il suo parenchima è costituito da un insieme di formazioni vescicolari, i follicoli, di diversa dimensione, di forma grossolanamente sferica e con la parete formata da un unico strato di cellule, costituente l'epitelio follicolare. All'interno dei follicoli è contenuta una sostanza amorfa, detta colloide, di natura glicoproteica. La dimensione dei follicoli è strettamente legata all'attività del follicolo stesso. I follicoli di grandi dimensioni, macrofollicoli, sono generalmente ipofunzionanti e l'epitelio appare parecchio appiattito, quasi endoteliforme. I microfollicoli hanno invece la parete formata da epitelio cubico e contengono quantità variabili di colloide. Essi rappresentano follicoli intensamente attivi, nei quali le cellule follicolari producono ormoni tiroidei. (Figura 2)



**Figura 2: Microscopica della tiroide.** Si evidenzia la struttura follicolare con micro e macrofollicoli (9)

Le cellule follicolari (*tireociti*) hanno caratteristiche morfologiche piuttosto variabili. Al microscopio ottico, oltre alle variazioni di altezza presentano, in rapporto allo stato funzionale, un diverso sviluppo dell'apparato di Golgi, un grado variabile di basofilia citoplasmatica, più evidente in fase di attività secretoria e numerose goccioline PAS-positive, che si accumulano nella regione apicale. All'esame ultrastrutturale i tireociti dei follicoli attivi presentano numerose microvillosità; nel loro citoplasma si rivela inoltre un reticolo endoplasmatico granulare molto sviluppato, le cui vescicole possono presentarsi dilatate; l'apparato di Golgi si trova al di sopra del nucleo e sono presenti mitocondri, ribosomi liberi e numerosi lisosomi.(8) (9)

### Sintesi, liberazione e metabolismo periferico degli ormoni tiroidei

La sintesi degli ormoni tiroidei è un processo assai complicato che si realizza attraverso una serie di fasi ben precise nell'attività cellulare dei tireociti. La captazione dello iodio costituisce un passaggio critico nella sintesi degli ormoni.

Lo iodio ingerito con la dieta (150-300  $\mu\text{g}/\text{die}$ ) viene infatti legato dalle proteine sieriche, in particolar modo dall'albumina. La parte non legata viene invece escreta con le urine. La tiroide preleva lo iodio dal sangue in modo molto efficiente. Questo si osserva molto bene quando nell'organismo viene introdotto un tracciante radioattivo, come lo  $^{123}\text{I}$  che nell'arco delle 24 ore viene assorbito dalla ghiandola tiroidea in quantità elevata (10-25%). La captazione dello iodio è mediata dal trasportatore NIS, espresso selettivamente sulla superficie basolaterale della cellula tiroidea. L'espressione di NIS è strettamente legata alla concentrazione di iodio nel sangue. Bassi livelli di iodio inducono una maggiore espressione del trasportatore, elevati livelli una sua soppressione. Questa espressione selettiva, quasi unica del NIS a livello tiroideo, offre grandi vantaggi da un punto di vista diagnostico e terapeutico. La scintigrafia tiroidea o anche il trattamento di certe forme di cancro con radioisotopi dello iodio sono possibili proprio per la presenza di questo efficiente trasportatore, senza arrecare particolari danni agli altri tessuti.

Dopo che lo iodio è entrato nella cellula, viene trasportato verso il versante apicale del tireocita, dove è ossidato a ioduro ( $\text{I}^-$ ) mediante una complessa reazione che coinvolge la TPO e il perossido di idrogeno. Lo iodio organificato viene legato a specifici residui di tirosina della Tg, una voluminosa proteina dimerica costituita da 2769 amminoacidi e del peso complessivo di 660 kDa che forma la colloide presente al centro del follicolo. Questi residui sono le monoiodotironine e le diiodotironine (MIT e DIT) a seconda del numero di atomi di iodio che hanno legato. Queste iodotirosine della Tg vengono successivamente unite per mezzo di un legame estere in una reazione catalizzata sempre dalla TPO. Da questa reazione si possono costituire gli ormoni tiroidei T3 e T4 che vengono successivamente "liberati" dalla Tg, dopo che questa è stata riassorbita e processata all'interno dei lisosomi. Le MIT e DIT che non vengono accoppiate per formare ormoni tiroidei sono processate

dall'enzima deiodogenasi che libera gli atomi di I<sup>-</sup> permettendone un successivo riutilizzo.

Gli ormoni tiroidei così prodotti vengono immessi nel circolo ematico. Il T4 viene secreto dalla tiroide in quantità circa 20 volte superiore a quella del T3. Entrambi gli ormoni circolano legati a proteine plasmatiche tra cui la proteina legante la tiroxina (*thyroxine binding globulin*, TBG), la transtiretina (TTR) e l'albumina. Quando gli effetti delle varie proteine di legame sono combinati circa il 99,98% di T4 e il 99,7% di T3 risultano legati e poiché il T3 è legato meno strettamente rispetto al T4, la quota di T3 non legato è maggiore di quella di T4, nonostante complessivamente il T4 sia molto maggiore. Le concentrazioni degli ormoni liberi sono circa di  $2 \times 10^{-12}$  M per il T4 e di  $6 \times 10^{-12}$  per il T3. L'ormone libero è considerato la forma biologicamente attiva e disponibile a livello del tessuto bersaglio tanto che i meccanismi omeostatici che regolano l'asse tiroideo (vedi dopo) sono diretti al mantenimento di normali livelli circolanti di ormoni liberi.

A livello dei tessuti bersaglio periferici avvengono delle reazioni estremamente importanti per il metabolismo degli ormoni tiroidei. La presenza delle deiodinasi garantisce la trasformazione del T4 in T3 mediante rimozione di un atomo di iodio. A seconda dell'atomo di iodio rimosso si può formare il T3 attivo o la forma "reverse" (rT3) inattivo. Questo fa sì che a livello periferico si possa realizzare una regolazione estremamente fine dell'attività degli ormoni tiroidei che in questo modo possono variare la loro attività in base alle richieste metaboliche dell'organismo nel suo complesso. Esula dalla nostra trattazione descrivere le differenti isoforme di deiodinasi e le differenti cinetiche di attivazione, ma i principi riassunti nelle righe precedenti trovano il loro corrispettivo biologico in una regolazione chimica estremamente complessa e articolata.

Gli ormoni tiroidei penetrano quindi all'interno delle cellule bersaglio per diffusione semplice essendo molecole sostanzialmente lipofile e attraverso il trasportatore monocarbossilato 8 (MCT 8). I recettori degli ormoni tiroidei sono localizzati principalmente a livello nucleare (*thyroid hormone receptors, TR*) e si identificano due famiglie di recettori: alfa e beta. Tanto il TR $\alpha$  che il TR $\beta$  sono espressi nella maggior parte dei tessuti sebbene in modo diverso nei vari organi. TR $\alpha$  è particolarmente espresso nel cervello, nel rene, nelle gonadi, nel muscolo cardiaco, mentre TR $\beta$  è relativamente elevato a livello dell'ipofisi e del fegato. Un ruolo cruciale è svolto dall'isoforma TR $\beta$  2, che essendo espressa a livello ipotalamico e ipofisario, contribuisce alla regolazione del *feed back* e quindi del controllo dell'intero asse ipotalamo-ipofisi-tiroide-tessuti periferici. I recettori, una volta che hanno legato l'ormone tiroideo, subiscono delle modificazioni strutturali che permettono loro il legame anche con il DNA sul quale favoriscono l'induzione e l'inibizione di moltissimi geni. Il T3 presenta un'affinità per i recettori da 10 a 15 volte superiore rispetto al T4 e per tale motivo quasi tutti i recettori sono occupati dal T3; per queste ragioni viene considerato l'ormone attivo nonostante la secrezione di T4 sia di gran lunga superiore. (10)

Passando rapidamente agli effetti degli ormoni tiroidei, essi svolgono un'attività fondamentale per il corretto sviluppo dei tessuti, in particolare del sistema nervoso, nonché svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della corretta attività metabolica dell'organismo. È impossibile vivere senza ormoni tiroidei come è impossibile vivere in una costante esposizione a livelli eccessivi di questi ormoni. In condizioni fisiologiche gli ormoni tiroidei stimolano i processi anabolici, vale a dire di crescita, sviluppo e movimento dell'organismo. Inoltre, aumentano il processo di ossidazione delle cellule controllando gli enzimi che presiedono al metabolismo energetico. Essi agiscono aumentando la funzione renale, la gittata cardiaca e la ventilazione respiratoria, la



mobilizzazione di lipidi, carboidrati e proteine e agiscono anche sulla termoregolazione. (2) (9) (10)

## Parte II -Inquadramento della patologia neoplastica tiroidea

### Gestione clinica del paziente con nodulo tiroideo

Prima di descrivere in modo compiuto la patologia neoplastica tiroidea occorre tuttavia aver presente il quadro generale entro il quale il medico di medicina generale prima e lo specialista poi deve muoversi quando identifica un paziente con una sospetta proliferazione a livello tiroideo, ovvero in presenza di un nodulo.

Noduli tiroidei palpabili si riscontrano in circa il 5% degli adulti anche se la prevalenza tende a variare in modo significativo nelle diverse aree geografiche.(1)

Dinnanzi a un nodulo tiroideo, l'obiettivo principale è quello di riuscire ad individuare , tenendo anche conto del rapporto costo/benefici, il piccolo sottogruppo di pazienti con lesioni maligne. Il medico può iniziare ad orientarsi tenendo presente alcune indicazioni, estremamente generali, basate su dati epidemiologici. Alcuni elementi anamnestici e obiettivi possono far sospettare la natura maligna di un nodulo. Essi includono:

- Una pregressa irradiazione esterna della regione del collo;
- L'età giovanile (< 20 anni) o avanzata (> 60 anni);
- Una storia familiare di carcinoma midollare della tiroide;
- Una rapida crescita del nodulo soprattutto se il paziente ha già iniziato una terapia soppressiva con L-tiroxina;
- La consistenza dura e la superficie irregolare;
- L'adesione ai tessuti superficiali e profondi;

- La presenza di linfadenomegalia in sede latero-cervicale;
- La comparsa di sintomi quali disfagia e disfonia che potrebbero essere espressione di un'infiltrazione dell'esofago e del nervo ricorrente.

In questi soggetti è in genere opportuno eseguire un dosaggio del TSH, che potrebbe essere soppresso da uno o più noduli iperfunzionanti. Se il TSH è soppresso, è indicata l'esecuzione di una scintigrafia tiroidea per determinare se il nodulo è "caldo", dal momento che le lesioni con aumentata iodocaptazione non sono praticamente mai maligne e la citologia può non essere necessaria. In caso contrario, l'esame citologico con ago sottile dovrebbe essere il primo passo nella valutazione del nodulo tiroideo. La citologia ha una buona sensibilità e specificità quando eseguita da specialisti esperti e quando i risultati sono interpretati da citopatologi con altrettanta esperienza. Tuttavia, va precisato, la distinzione tra lesioni follicolari benigne e maligne è spesso molto difficoltosa. Generalmente si ottengono risultati compatibili con benignità in circa il 70% dei casi, reperti indicativi di malignità certa o presunta in circa il 10% e risultati indeterminati o non diagnostici nel 20% dei casi. In caso di sospetta malignità si impone l'intervento chirurgico. (2) (11)

Una citologia non diagnostica può essere dovuta a vari fattori, tra questi troviamo una reazione fibrosa con poche cellule disponibili all'aspirazione o una lesione cistica nella quale le cellule sono confinate alla periferia della formazione oppure un nodulo troppo piccolo per essere "centrato" in modo corretto. In genere si invita a ripetere l'agoaspirazione con l'ausilio della guida ecografica, anche se sempre più l'ecografia viene utilizzata già nella prima puntura. Essa infatti non solo aumenta le possibilità di successo dell'agoaspirato ma può fornire alcune utili informazioni nella valutazione "prediagnostica" del nodulo. Caratteristiche ecografiche di malignità includono la presenza di microcalcificazioni all'interno del nodulo, aumentata vascolarizzazione e ipoecogenicità all'interno della struttura.

Come riassunto nell'algoritmo sottostante l'inquadramento e l'iter terapeutico di un paziente con nodulo tiroideo è estremamente complesso. Occorre ricordare che spesso la fase di valutazione espone a un notevole stress il paziente per la preoccupazione di essere affetti da una neoplasia maligna. Occorre pertanto scegliere sempre l'approccio migliore cercando di non sottoporre il paziente a stress inutili e allo stesso tempo di avere tutte le basi necessarie per una corretta valutazione del nodulo riscontrato. (Figura 3) (11)

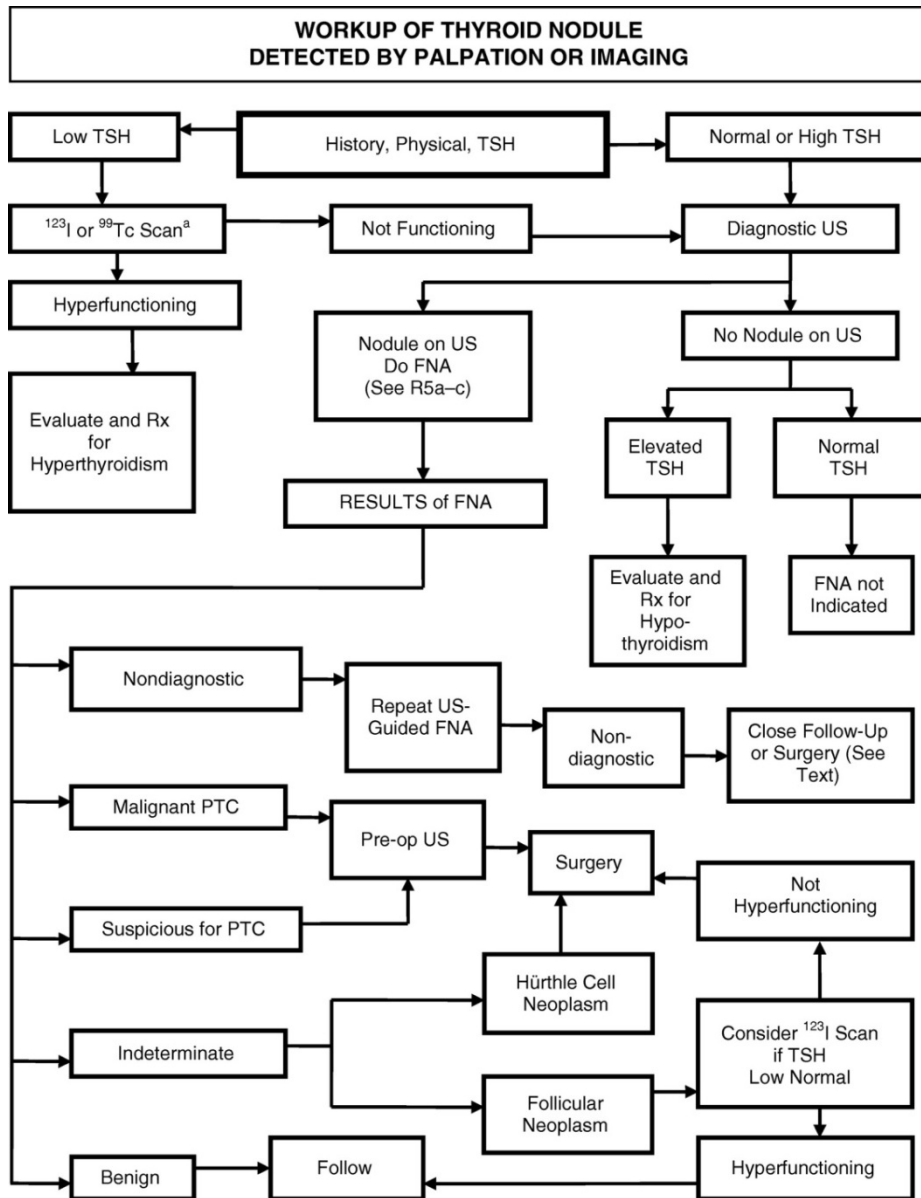


Figura 3: Algoritmo aggiornato sulla gestione del paziente con nodulo tiroideo (11)

## Epidemiologia del carcinoma della tiroide

La patologia neoplastica maligna della tiroide rappresenta l'ambito di interesse specifico di questa trattazione. Cercando di inquadrare la dimensione del problema, il carcinoma della tiroide è una neoplasia non troppo frequente rappresentando circa il 2% di tutte le neoplasie maligne. Il tasso di incidenza stimato varia sostanzialmente a seconda delle aree geografiche considerate e nei due sessi, con una netta prevalenza in quello femminile. I dati più aggiornati stimano in 1,20-2,60 su 100.000 abitanti l'incidenza nel sesso maschile e in 2,00-3,80 nel sesso femminile. (1)

I paesi industrializzati sono quelli dove si rivelano i tassi di incidenza più elevati mentre nel "sud del Mondo" i casi registrati sono assai inferiori. La penisola coreana è la regione dove si toccano i valori più alti con oltre 30 casi per 100.000 abitanti. (Figura. 4) (12)

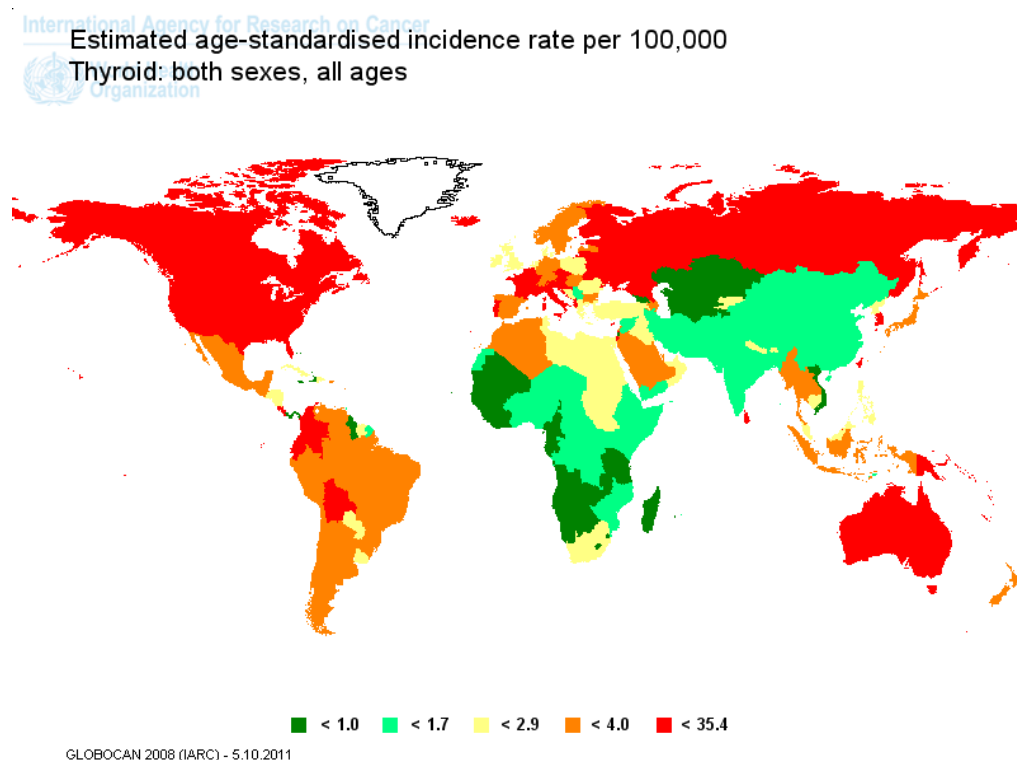


Figura 4: Incidenza del carcinoma della tiroide nella popolazione mondiale (Globocan)

Se osserviamo l'età di esordio della malattia possiamo vedere come questa neoplasia tenda a comparire nella seconda metà della vita. In particolar modo negli uomini l'incidenza maggiore si registra nella sesta decade, nelle donne in coincidenza della conclusione dell'età riproduttiva. Nei bambini il cancro della tiroide è assai raro e, sebbene negli ultimi trenta anni si sia registrato un incremento dell'incidenza della malattia in tutte le fasce di età, la fascia pediatrica (< 20 anni) è stata l'unica a non essere toccata da questo incremento. (Figura 5) (13)

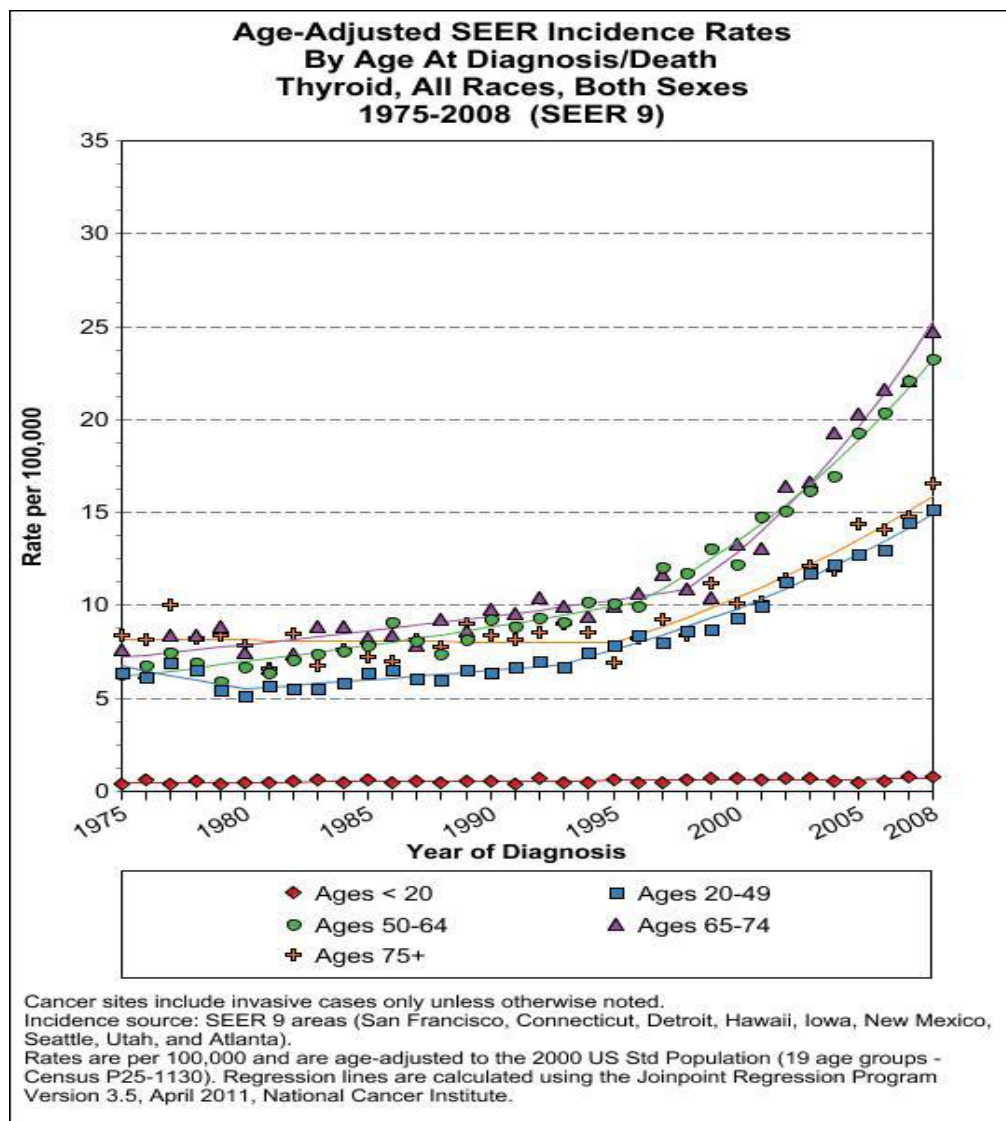


Figura 5: Variazione nel tasso di incidenza del cancro della tiroide nel periodo 1975-2008 nelle diverse fasce di età (SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008)

Se andiamo ad analizzare l'incidenza dei vari istotipi del carcinoma della tiroide è possibile osservare come non vi siano particolari differenze nelle diverse fasce d'età. Il carcinoma papillare tiroideo (PTC) rappresenta circa il 70-80% di tutti i tumori, il carcinoma follicolare tiroideo (FTC) circa il 15-20%, il carcinoma midollare tiroideo (MTC) circa il 5-10% mentre il carcinoma anaplastico (AC) meno del 2%.

Analizzando i dati epidemiologici del nostro paese, l'Italia rientra tra le nazioni con il più alto tasso di incidenza di tumore maligno della tiroide e negli ultimi dieci anni l'incidenza della patologia è quasi raddoppiata rispetto agli anni precedenti. Nel periodo 2001-2005 si è registrata un'incidenza di 18 casi ogni 100.000 abitanti nel sesso femminile rispetto agli 8 casi per 100.000 abitanti del periodo 1991-1995. Analogo incremento si registra anche nel sesso maschile dove si è passati da 3 a 6 casi per 100.000 abitanti nei periodi considerati. L'incremento dell'incidenza è legato principalmente allo sviluppo di indagini diagnostiche in grado di identificare lesioni neoplastiche di dimensioni inferiori anche ai 20 mm, soprattutto del carcinoma papillare. In particolar modo lo sviluppo e il potenziamento delle indagini ecografiche e della citologia mediante agoaspirato (FNAB: *fine needle aspiration biopsy*) hanno permesso di identificare tumori molto più precocemente che in passato. (1)(14) Nonostante il miglioramento delle procedure diagnostiche abbia un ruolo chiave nello spiegare l'aumentato tasso di incidenza registrato negli ultimi vent'anni, un incremento nell'incidenza di questa neoplasia é effettivamente reale.(13) (15)

## Fattori di rischio del carcinoma tiroideo

Per il cancro della tiroide, come per la maggior parte delle malattie neoplastiche, l'eziologia è sconosciuta. Se non è possibile quindi parlare di

cause del carcinoma della tiroide, è possibile identificare una serie di fattori di rischio, ovvero di fattori la cui presenza aumentano in modo significativo la possibilità di sviluppare la neoplasia. Questi fattori, come si può vedere dall'elenco sottostante, sono legati a particolari predisposizioni genetiche nonché all'esposizione a determinati agenti ambientali:

- **esposizione a radiazioni ionizzanti:** questo discorso vale sia per le esposizioni accidentali che per quelle iatrogene necessarie per la diagnostica o il trattamento di specifiche patologie;
- **alcune patologie tiroidee non neoplastiche:** alcune patologie come ad esempio il gozzo multinodulare (GMN), la tiroidite linfocitaria, la malattia di Graves sono correlate con un maggiore rischio di sviluppare il cancro della tiroide;
- **assunzione di iodio:** sia stati carenziali che un'esposizione ad elevati livelli di iodio possono favorire l'insorgenza di neoplasie tiroidee;
- **assunzione di alcuni farmaci:** in particolare farmaci usati nel trattamento di patologie neuro-psichiatriche, come il fenobarbital e il litio;
- **fattori ormonali:** questo spiegherebbe come mai la neoplasia è assai più frequente nel sesso femminile rispetto a quello maschile;
- **fattori genetici:** sui fattori genetici occorre precisare che le conoscenze maggiori riguardano il carcinoma midollare, che come abbiamo visto nell'epidemiologia è una delle forme più rare. Il 25% dei carcinomi midollari si ritrova nel contesto di sindromi familiari caratterizzate da neoplasie endocrine multiple quali la MEN 2A, la MEN 2B e la variante unifocale della neoplasia midollare familiare. Esistono anche altre sindromi a carattere ereditario nel cui contesto ritroviamo una notevole incidenza di neoplasie tiroidee. La poliposi adenomatosa familiare, conosciuta anche come sindrome di Gardner, patologia che interessa principalmente l'intestino, si associa a un rischio aumentato di



sviluppare neoplasie follicolari della tiroide. Altra malattia ereditaria degna di nota è la malattia di Cowden che si caratterizza per lo sviluppo di amartomi multipli. In questo contesto si assiste a un aumento dell'incidenza di neoplasie follicolari sia benigne che maligne della tiroide. In queste come anche in altre malattie ereditarie, i carcinomi tiroidei rappresentano soltanto una possibile manifestazione della malattia e complessivamente le neoplasie legate a malattie ereditarie sono una percentuale esigua ( $< 1\%$ ) di tutti i tumori tiroidei. Lo studio di queste casistiche, seppure limitate, ha tuttavia un ruolo cruciale nella comprensione dei meccanismi patogenetici che possono essere alla base anche delle forme sporadiche di carcinoma. (16) (17)

## Caratteristiche cliniche del carcinoma tiroideo e sua gestione

Al momento della diagnosi generalmente il tumore maligno della tiroide è asintomatico. La diagnosi è quasi sempre occasionale da parte del paziente o del medico curante che si accorge di un ingrossamento sospetto nel collo. Più raramente possono comparire sintomi legati alla compressione locale delle strutture adiacenti la tiroide: disfonia, disfagia, difficoltà respiratorie. Ancora più rari sono all'esordio i sintomi legati a metastasi a distanza della neoplasia come coinvolgimento polmonare, linfonodale od osseo. Generalmente la sintesi degli ormoni tiroidei è conservata, se presente ipotiroidismo questo è legato ad un'altra patologia tiroidea concomitante. In rarissimi casi si può avere un carcinoma secernente con ipertiroidismo. Al fine della diagnosi gli strumenti più efficaci di cui disponiamo sono rappresentati dalla FNAB, dall'ecografia tiroidea, e dalle tecniche di medicina nucleare (iodocaptazione e scintigrafia tiroidea). L'agoaspirato con citologia offre sicuramente il risultato migliore da un punto di vista diagnostico con una possibilità di diagnosi differenziale tra lesione benigna e maligna che si aggira intorno all'80%. Questa tecnica

raggiunge il massimo della sua efficacia se la sua esecuzione viene eseguita sotto guida ecografica. (18)

L'ecografia inoltre sebbene non diagnostica può aiutare ad individuare alcune caratteristiche che possono indirizzare nella diagnosi, come il rapporto tra strutture solide e liquide, la presenza di calcificazioni, l'organizzazione più o meno omogenea del nodulo. Le tecniche di medicina nucleare hanno anche esse la loro utilità: generalmente vengono usati il Tc-99m, lo  $^{123}\text{I}$  e lo  $^{131}\text{I}$  poiché si è osservato che tutte le lesioni maligne sono ipocaptanti, "fredde". Occorre tuttavia dire che solo il 5% delle lesioni "fredde" sono maligne. Anche per il tumore della tiroide la corretta diagnosi è possibile solo grazie all'integrazione di conoscenze differenti e alla corretta interpretazione di più dati raccolti in modo diverso. In caso di lesione maligna è opportuno valutare se sia presente anche un coinvolgimento linfonodale o altre lesioni metastatiche. In tal caso le tecniche di maggiore sensibilità sono rappresentate dalla tomografia computerizzata (TC) e dalla risonanza magnetica (RM). (11) (19)

Una volta che è stato diagnosticato, il trattamento chirurgico è l'approccio d'elezione. Generalmente si procede alla tiroidectomia totale (Tx). Si preferisce attuare il trattamento radicale rispetto ad interventi più conservativi (tiroidectomia subtotale) sulla base di una serie di evidenze.

- Innanzitutto l'intervento radicale, oggi eseguibile spesso con tecniche mini invasive, è gravato da un minor rischio operatorio rispetto ad interventi in cui si vada a sezionare il parenchima tiroideo.
- Spesso i tumori tiroidei sono multifocali e possono svilupparsi nel lobo controlaterale.
- Oggi disponiamo di adeguate terapie sostitutive che permettono un'ottima gestione dei corretti livelli di ormone tiroideo circolante a costi sostenuti e con facilità di gestione.

- La tiroidectomia totale garantisce anche un razionale uso della scintigrafia tiroidea e del dosaggio della tireoglobulina nel follow-up permettendo una precoce identificazione della ripresa di malattia o di metastasi a distanza.

Oltre alla tiroidectomia si può rivelare necessario a seconda dello stadio in cui il tumore è stato diagnosticato anche lo svuotamento linfonodale del compartimento centrale ed eventualmente di quello laterocervicale. Nei carcinomi midollari, data la loro notevole aggressività lo svuotamento centrale viene sempre eseguito. (2)

Dopo l'esecuzione della tiroidectomia totale (e dell'eventuale linfadenectomia) generalmente si "radicalizza" l'intervento con terapia radiometabolica. A distanza di circa 30-45 giorni dall'intervento chirurgico viene somministrata a pazienti selezionati una dose ablativa di iodio radioattivo  $I^{131}$ (30-100mCi), preceduta generalmente da una scintigrafia Whole Body Scintigraphy (WBS) necessaria per ottimizzare il trattamento. Il razionale di questa procedura ha lo scopo di provocare la distruzione di eventuali cellule tumorali rimaste nell'organismo e sfrutta la notevole differenziazione del tessuto tiroideo neoplastico che in modo del tutto analogo al tessuto sano capta lo iodio con alta affinità. Attualmente, secondo le linee guida Europee non c'è unanime consenso su quali pazienti siano candidati a terapia radiometabolica. Vengono identificate tre classi di rischio:

- "Very low risk": che comprende microcarcinomi unifocali che non invadono la capsula tiroidea e non presentano metastasi linfonodali per i quali la terapia radiometabolica non apporta alcun beneficio.
- "High risk": comprende i carcinomi che presentano segni di persistenza della malattia o un elevato rischio di persistenza e recidiva. In questo gruppo la terapia radiometabolica è assolutamente indicata.

- “Low risk”: comprende la maggior parte dei pazienti, con caratteristiche intermedie rispetto alle precedenti e sui quali non c’è consenso unanime circa il tipo di trattamento post-chirurgico. (4)

Ovviamente nel caso di carcinoma midollare o anaplastico questa procedura è del tutto inutile. Talora può anche essere eseguita una radioterapia locale. terminate queste procedure il paziente entra nei programmi di follow-up che prevedono l’esecuzione periodica di ecografie del collo e delle stazioni linfonodali, il dosaggio degli ormoni tiroidei e del TSH, il dosaggio della tireoglobulina, che rappresenta un ottimo marker tumorale di ripresa della malattia, e l’esecuzione di scintigrafie tiroidee. Nel caso di carcinomi midollari sarà fondamentale eseguire dosaggi periodici di calcitonina basale e sotto stimolo. (2) (11) (19)

## Prognosi del carcinoma della tiroide e stadiazione

La mortalità per tumore della tiroide è fortunatamente bassa e, nonostante l'incremento dell'incidenza di questa patologia, è rimasta sostanzialmente invariata negli ultimi 30 anni. Negli Stati Uniti è stata stimata una mortalità annuale per cancro della tiroide pari a 0,50 per 100.000 individui e l'età media di decesso nei soggetti affetti da questo tumore intorno ai 74 anni. Tra i fattori che influenzano principalmente la mortalità sembra giocare un ruolo cruciale l'età a cui la malattia viene diagnosticata. Prima di 65 anni la mortalità media è di circa 0,20/100.000, sopra i 65 anni si assiste ad un incremento superiore a dieci volte di questo tasso con un valore di 2,70/100.000. (12)

Anche per il carcinoma della tiroide sono stati proposti nel tempo vari modelli di stadiazione al fine di suddividere i pazienti in classi di rischio omogenee. Il sistema di stadiazione TNM (tumor-node-metastasis) approvato dall'AJCC considera nel suo modello stadiativo i differenti fattori di rischio conosciuti per ciascun tumore, l'età alla diagnosi, le dimensioni del tumore, il coinvolgimento di strutture al di fuori della tiroide, l'interessamento linfonodale e la presenza di metastasi a distanza. I carcinomi papillari e follicolari vengono stadiati nello stesso modo ma diversamente rispetto ai carcinomi midollari e anaplastici (vedi tabella 1). (20)

Oltre a questo il sistema TNM provvede anche a stadiare in due gruppi separati i pazienti con carcinoma follicolare e papillare in base all'età individuando un gruppo con meno di 45 anni e uno con più di 45 anni. ( Tabella 2 )

Recentemente sono stati sviluppati altri sistemi di stadiazione alternativi al TNM. Il principale obiettivo di questi protocolli è quello di riuscire a stratificare meglio i pazienti affetti da cancro della tiroide ben differenziato cercando di individuare le classi con maggior rischio di recidiva e mortalità. Questi modelli combinano differenti fattori di rischio quale sesso, età, caratteristiche

istologiche, estensione extratiroidea della patologia, dimensioni della massa primitiva ed eventuali metastasi a distanza. (21)

<p><b>Primary tumor (T)</b></p> <p>TX: Primary tumor cannot be assessed</p> <p>T0: No evidence of primary tumor</p> <p>T1: Tumor 2 cm or less in greatest dimension, limited to the thyroid</p> <p>✓T1a tumor 1 cm or less in greatest dimension, limited to the thyroid</p> <p>✓T1b tumor more than 1 cm but not more than 2 cm in greatest dimension, limited to the thyroid</p> <p>T2: Tumor larger than 2 cm but 4 cm or smaller in greatest dimension, limited to the thyroid</p> <p>T3: Tumor larger than 4 cm in greatest dimension limited to the thyroid or any tumor with minimal extrathyroid extension (e.g., extension to sternothyroid muscle or perithyroid soft tissues)</p> <p>T4a: Tumor of any size extending beyond the thyroid capsule to invade subcutaneous soft tissues, larynx, trachea, esophagus, or recurrent laryngeal nerve</p> <p>T4b: Tumor invades prevertebral fascia or encases carotid artery or mediastinal vessels</p> <p>All anaplastic carcinomas are considered T4 tumors.</p> <p>T4a: Intrathyroidal anaplastic carcinoma—surgically resectable</p> <p>T4b: Extrathyroidal anaplastic carcinoma—surgically unresectable</p> <p><b>Regional lymph nodes (N)</b></p> <p>Regional lymph nodes are the central compartment, lateral cervical, and upper mediastinal lymph nodes.</p> <p>NX: Regional lymph nodes cannot be assessed</p> <p>N0: No regional lymph node metastasis</p> <p>N1: Regional lymph node metastasis</p> <p>✓N1a: Metastasis to level VI (pretracheal, paratracheal, and prelaryngeal/Delphian lymph nodes)</p> <p>✓N1b: Metastasis to unilateral or bilateral cervical or superior mediastinal lymph nodes</p> <p><b>Distant metastasis (M)</b></p> <p>MX: distant metastasis cannot be assessed</p> <p>M0: no distant metastasis</p> <p>M1: distant metastasis</p>
--

Tabella 1 : Stadiazione TNM del carcinoma della tiroide (15)

<b>Papillary or Follicular Carcinoma (Age under 45 years)</b>			
Stage I	Any T	Any N	M0
Stage II	Any T	Any N	M1
<b>Papillary or Follicular Carcinoma (Age 45 years and older)</b>			
Stage I	T1a, T1b	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1a	M0
Stage IVA	T1, T2, T3	N1b	M0
	T4a	N0, N1	M0
Stage IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1
<b>Medullary Carcinoma</b>			
Stage I	T1a, T1b	N0	M0
Stage II	T2, T3	N0	M0
Stage III	T1, T2, T3	N1a	M0
Stage IVA	T1, T2, T3	N1b	M0
	T4a	Any N	M0
Stage IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1
<b>Anaplastic Carcinoma</b>			
Stage IVA	T4a	Any N	M0
Stage IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1

Tabella 2: Classificazione in stadi del carcinoma tiroideo proposta dall'AJCC. (15)

## Parte III – Caratteristiche citologiche ed istologiche delle neoplasie tiroidee

### L'importanza dell'agoaspirato tiroideo (FNAB) nella diagnosi di carcinoma

Come è già stato accennato, l'agoaspirato tiroideo è diventato un momento imprescindibile nell'inquadramento della patologia nodulare tiroidea e nella diagnosi di carcinoma. Visto che oltre il 90% dei noduli sono benigni, si rivela fondamentale disporre di un test in grado di individuare con pochissimo margine di errore le lesioni maligne evitando alla maggior parte dei soggetti portatori di noduli terapie importanti e del tutto inutili. Per la sua accuratezza, il suo rapporto costi-benefici, la sua sostanziale sicurezza, il FNAB è entrato nella pratica clinica del nodulo tiroideo ed è stato accettato da tutte le più importanti associazioni mondiali di endocrinologia. L'uso massivo del FNAB ha infatti permesso di ridurre drasticamente gli interventi di tiroidectomia di oltre il 50%, ha aumentato l'efficacia dell'intervento di quasi tre volte nei casi di lesioni maligne e ha determinato complessivamente una riduzione dei costi di gestione del nodulo tiroideo di oltre il 25%. Di tutti gli esami possibili, solo l'analisi istologica del pezzo operatorio mostra una sensibilità e una specificità maggiore. L'accuratezza del FNAB è infatti prossima al 95%, con un valore predittivo positivo superiore al 90% e un valore predittivo negativo prossimo al 99%. Una certa variabilità nei risultati è comunque legata alla preparazione del personale che esegue l'esame e all'abilità di chi è chiamato ad interpretare il materiale prelevato. (18)

La corretta esecuzione del FNAB passa attraverso una serie di fasi ben precise e codificate. Innanzitutto è fondamentale un accurato esame fisico della regione del collo al fine di valutare le caratteristiche della tiroide e del nodulo di interesse. Se l'analisi fisica incontra particolari difficoltà per le caratteristiche del



nodulo, magari particolarmente piccolo, un esame ecografico può rivelarsi necessario. È importante ricordare che il solo esame ecografico non fornisce generalmente informazioni sufficienti per valutare le caratteristiche di malignità di una lesione. Il corretto campionamento della lesione è un momento fondamentale nell'esecuzione del FNAB e per questo si consiglia di eseguire almeno tre prelievi per ogni singolo nodulo, prestando particolare attenzione ai noduli a contenuto cistico e a quelli di dimensioni maggiori dove il campione potrebbe essere diluito da un travaso ematico.

Il materiale prelevato viene strisciato sul vetrino, quindi fissato con alcol o seccato all'aria e colorato con la colorazione di Papanicolau o di Diff-Quick. La colorazione di Papanicolau è preferita per la caratterizzazione dei nuclei mentre quella di Diff-Quick permette una migliore visualizzazione della colloide ed un'esecuzione più rapida del test. Altra possibilità è rappresentata dalla citologia a strato sottile che offre sicuramente alcuni vantaggi, limitando ad esempio alcuni artefatti legati alla presenza di sangue che potrebbero rendere l'interpretazione del preparato particolarmente complessa. (18)

## Classificazione citologica delle lesioni tiroidee

Uno degli aspetti più controversi dell'aspirato tiroideo è rappresentato dalla mancanza di uniformità nella classificazione citologica dei preparati. Le diverse associazioni di endocrinologia hanno proposto negli anni modelli classificativi differenti. Al fine di superare questa problematica e standardizzare quanto più possibile la procedura, nel 2007 è stato introdotto il "*Bethesda system*" per la classificazione delle lesioni tiroidee che rappresenta tutt'ora il sistema maggiormente utilizzato. Questo sistema classificativo si basa su un'opera di analisi estremamente ampia e complessa della letteratura riguardante le

possibili lesioni tiroidee e può essere pertanto considerata a tutti gli effetti *“evidence based”*. (22)

Le sei categorie proposte da questo modello sono riassunte nella tabella sottostante: (Tabella 3)

## Six-tiered Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology.

### **I. Non-diagnostic or unsatisfactory**

Cyst fluid only  
Virtually acellular specimen  
Other (obscuring blood, clotting artefact, etc)

### **II. Benign**

Consistent with a benign follicular nodule (includes adenomatoid nodule, colloid nodule, etc)  
Consistent with lymphocytic (Hashimoto) thyroiditis  
Consistent with granulomatous (subacute) thyroiditis  
Other

### **III. Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance**

### **IV. Follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm** Specify if Hürthle cell (oncocyctic) type

### **V. Suspicious for malignancy**

Suspicious for papillary carcinoma  
Suspicious for medullary carcinoma  
Suspicious for metastatic carcinoma  
Suspicious for lymphoma  
Other

### **VI. Malignant**

Papillary thyroid carcinoma  
Poorly differentiated carcinoma  
Medullary thyroid carcinoma  
Undifferentiated (anaplastic) carcinoma  
Squamous cell carcinoma  
Carcinoma with mixed features (specify)  
Metastatic carcinoma  
Non-Hodgkin lymphoma  
Other

**Tabella 3: Bethesda System.** Classificazione dei preparati citologici tiroidei (17)

L'aspetto forse più importante di questa classificazione è quello di aver stimato per ogni gruppo il rischio di lesione maligna. Come si vede dalla tabella sottostante si passa dall'1-3 % della categoria "benigna" al 97-99% della categoria maligna. Ad ogni categoria inoltre è possibile associare anche un approccio diagnostico/terapeutico standardizzato. (Tabella 4)

<b>Categoria diagnostica</b>	<b>Rischio di malignità (%)</b>	<b>Approccio clinico</b>
Non diagnostico o insoddisfacente	1-4	Ripetere FNAB con guida ecografica
Benigno	0-3	Follow-up
Atipia di significato indeterminato o lesione follicolare di significato indeterminato	5-15	Ripetere FNAB
Neoplasia follicolare o sospetto per una neoplasia follicolare	15-30	Lobectomia chirurgica
Sospetto di malignità	60-75	Tiroidectomia
Maligno	97-99	Tiroidectomia

**Tabella 4: Percentuale di rischio di lesione maligna per ogni categoria citologica e approccio terapeutico standard.**  
(22)

In Italia tuttavia, nonostante molti endocrinologi siano favorevoli all'adozione del "bethesda system" si adotta dal 2007 il modello classificativo britannico che suddivide le possibili citologie tiroidee in cinque differenti categorie. A partire da quest'anno in Italia è stato sviluppato un nuovo modello classificativo articolato sempre in cinque categorie principali e in alcune sottocategorie, nel

tentativo di superare le principale difficoltà diagnostiche soprattutto nell'interpretazione dei preparati indeterminati. (Tabella 5) (23)

Sulla base di quest'ultima classificazione procederò ad analizzare successivamente le varie possibilità citologiche cercando di evidenziare le specifiche caratteristiche e problematiche.

Code	Diagnostic category	Expected risk of malignancy (%)	Suggested actions
TIR1	Non-diagnostic	Not defined	Repeat US-guided FNA after at least 1 month
TIR1C	Non-diagnostic-cystic	Low (variable on the basis of clinical findings)	Evaluate the clinical setting and/or repeat FNA
TIR2	Non-malignant/benign	<3	Follow-up
TIR3A	Low-risk indeterminate lesion (LRIL)	<10 <sup>a</sup>	Repeat FNA/clinical follow-up
TIR3B	High-risk indeterminate lesion (HRIL)	15–30 <sup>a</sup>	Surgery
TIR4	Suspicious of malignancy	60–80	Surgery (consider frozen section)
TIR5	Malignant	>95	Surgery

<sup>a</sup> Expected rate of malignancy for the TIR3 subcategories is mainly found on clinical experience and is only partially based on the evidence of the published data

Tabella 5: Nuova classificazione citologica dei preparati tiroidei sulla base del "consensus" italiano del 2014.(23)

### **Categoria non diagnostica**

In più del 20% dei casi può capitare di prelevare materiale non diagnostico. La percentuale di non diagnostici non dovrebbe tuttavia eccedere il 10%. Generalmente la guida ecografica permette una migliore riuscita della procedura e complessivamente una citologia non diagnostica può essere maligna nel 1-4% dei casi. Generalmente un preparato non diagnostico presenta una cellularità troppo scarsa per l'analisi; talvolta invece il preparato non è interpretabile a causa della presenza di artefatti dovuti alle procedure di fissazione oppure per la presenza di eccessiva quantità di sangue, materiale necrotico, o contenuto cistico. In questi casi si può procedere a un secondo campionamento mediante guida ecografica anche se in alcuni casi, sulla base di un sospetto clinico o di altre indagini radiologiche, può essere necessario un prelievo chirurgico. Al fine di ridurre il numero di preparati non diagnostici sono stati sviluppati diversi metodi per avere una valutazione estemporanea della qualità dell'aspirato. (24)

### **Categoria benigna**

Nell'ambito delle categoria benigna troviamo numerose lesioni di natura infiammatoria, iperplastica, colloidale e le neoplasie benigne. Oltre il 70% dei FNAB danno questo risultato e il rischio di errore, ovvero di catalogare come benigna una lesione maligna è generalmente inferiore al 3%. In caso di citologia benigna si raccomanda un follow-up ecografico da eseguire per un periodo variabile compreso tra i 6 e 18 mesi. (19) (23)

### **Categoria indeterminata**

Sicuramente rappresenta il gruppo di lesioni su cui si concentrano le maggiori controversie ed è soggetta a nuove definizioni e caratterizzazioni. Può interessare fino al 30% di prelievi correttamente eseguiti e il rischio di una lesione maligna si aggira intorno al 15-20% anche se i dati sono assai contrastanti tra i vari centri di riferimento. I pazienti con diagnosi "indeterminata" spesso si sottopongono a chirurgia per lesioni benigne e, quando maligne, l'istologia più frequente è rappresentata dalla variante follicolare del carcinoma papillare o dal carcinoma follicolare. Nel contesto di queste difficoltà il "consensus Italiano" ha proposto l'introduzione di due sottocategorie a basso ed alto rischio. I pazienti con una citologia indeterminata a basso rischio vengono generalmente monitorati nel tempo mediante l'esecuzione di altri FNAB, quelli ad alto rischio vengono avviati a terapie più radicali quali ad esempio quella chirurgica.

È opportuno ricordare che i criteri fondamentali per distinguere una lesione follicolare maligna da una benigna (adenoma follicolare) sono l'invasione vascolare e capsulare, aspetti che non possono essere valutati in un esame citologico eseguito con agoaspirazione. (23) (24) (25)

### **Categoria di sospetta malignità**

In questo gruppo rientrano quelle lesioni che presentano caratteristiche citologiche di malignità ma non sono così evidenti per rientrare nella categoria di malignità. Queste lesioni sono maligne in oltre il 60% dei casi con punte anche del 75% secondo alcuni autori. Dato l'elevato rischio i pazienti con questo responso sono candidati alla tiroidectomia totale od eventualmente a una lobectomia e ad analisi intraoperatoria della lesione. Se in questa circostanza

viene confermata la malignità della lesione, si procede alla tiroidectomia totale.  
(24)

### **Categoria maligna**

Rappresenta meno del 10% dei FNAB eseguiti sulla tiroide. Il rischio di malignità in questo gruppo è prossimo al 100%. In particolar modo il carcinoma papillare, per le sue tipiche alterazioni nucleari, è facilmente diagnosticabile in FNAB. È importante ricordare che nessun aspetto citologico isolato è sufficiente a porre diagnosi di carcinoma papillare ma sono necessarie varie combinazioni di alterazioni riscontrabili. (24)

### **Classificazione istologica delle neoplasie tiroidee**

In base alle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), le neoplasie della tiroide possono essere classificate da un punto di vista istologico in lesioni primitive o secondarie (metastatiche). La maggior parte dei tumori primitivi della tiroide originano dalle cellule epiteliali della ghiandola, ovvero dalle cellule dei follicoli tiroidei. Esse includono neoplasie benigne (adenoma follicolare) e neoplasie maligne (carcinoma follicolare e carcinoma papillare nelle loro molteplici varianti).

Si ritiene che anche il carcinoma anaplastico, che ricordiamo è gravato da una prognosi infausta, derivi dall'epitelio follicolare a seguito di processi di dedifferenziazione e diverse evidenze raccolte in recenti studi considerano questa neoplasia come una possibile evoluzione, seppur rara, di tumori precedentemente ben differenziati. Infine come ultimo gruppo di carcinomi troviamo quelli midollari che originano dalle cellule parafollicolari della tiroide,



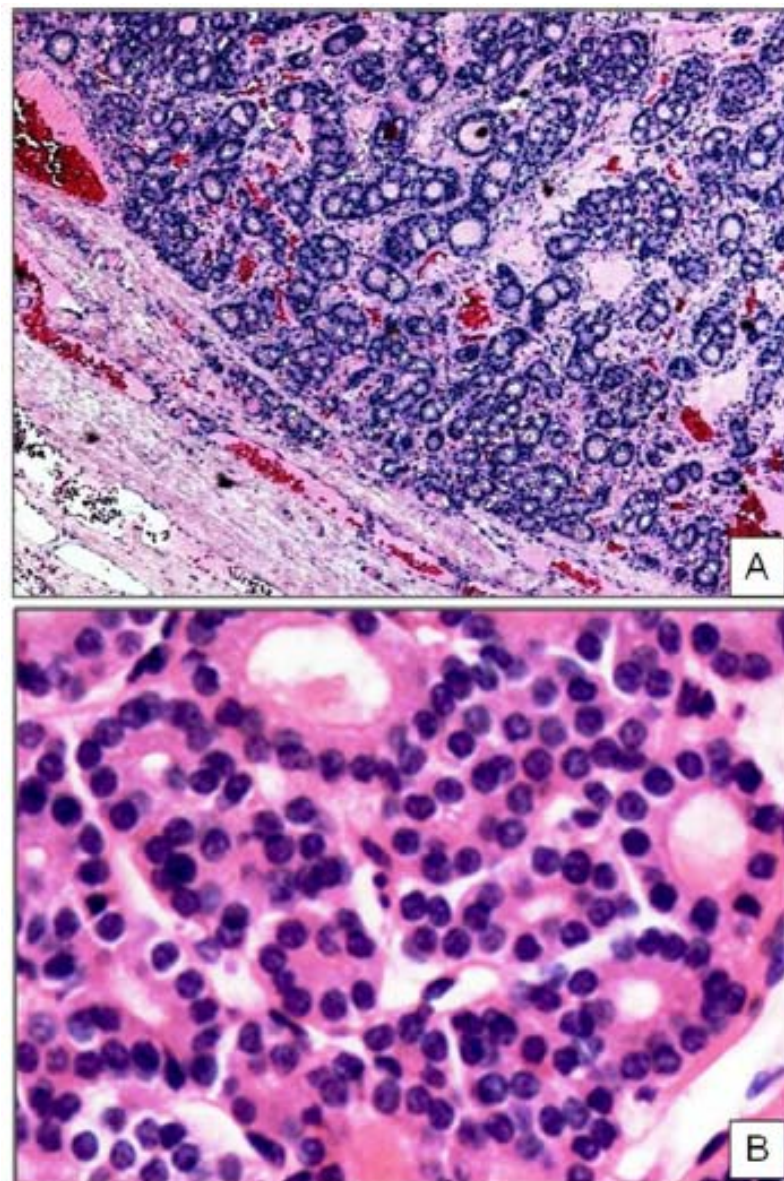
cellule che come abbiamo già detto hanno un'origine e una funzione totalmente diversa rispetto all'epitelio tiroideo. (11) (13)

Nei paragrafi che seguono mi soffermerò sulle caratteristiche istologiche principali dei tumori differenziati che rappresentano il nucleo centrale dello studio proposto nella seconda parte di questa trattazione.

### **Adenoma Follicolare**

L'adenoma follicolare è una lesione benigna, capsulata e non invasiva che origina dalle cellule epiteliali. L'adenoma follicolare colpisce prevalentemente le donne con un'incidenza di circa 5 volte superiore rispetto agli uomini. La quinta e la sesta decade di vita risultano quelle maggiormente colpite da questa lesione anche se generalmente si osserva una distribuzione piuttosto omogenea in tutte le fasce d'età. Macroscopicamente l'adenoma follicolare si presenta come una massa nodulare ben demarcata rispetto al parenchima circostante grazie a una capsula fibrosa generalmente ben evidente. Le dimensioni possono essere assai variabili ma comprese tra 1 e 4 cm. Nel suo contesto possono svilupparsi nel tempo emorragie, necrosi tissutale, calcificazioni e degenerazioni cistiche sia spontaneamente sia a seguito di un'agoaspirazione (FNAB). È sempre importante valutare, anche da un punto di vista macroscopico, l'integrità della capsula e l'eventuale presenza di alterazioni o di infiltrazione dei tessuti circostanti. Ovviamente sarà poi l'analisi microscopica, possibilmente dell'intera capsula a confermare l'eventuale presenza di invasione da parte della neoplasia. Spostandoci quindi sull'analisi microscopica, l'adenoma follicolare si presenta come una lesione capsulata dalle caratteristiche istologiche e citologiche distinte rispetto al tessuto tiroideo circostante. La capsula generalmente si presenta integra e piuttosto sottile. Non è infrequente osservare dei piccoli aggregati di cellule follicolari intrappolati nel contesto della capsula che possono essere erroneamente interpretati come

indice di invasione. L'architettura cellulare degli adenomi follicolari è assai varia potendo assumere aspetto solido, trabecolare, macrofollicolare etc. Da un punto di vista strettamente citologico le cellule che compongono l'adenoma follicolare sono generalmente cuboidali e poligonali, con citoplasma abbondante, membrane ben delimitate, nuclei alla base. Questi ultimi sono generalmente di piccole dimensioni, arrotondanti, senza atipie talora ipercromatici. (Figura 6) (26)



**Figura 6: Adenoma Follicolare in microscopica:** si evidenzia l'aspetto micro follicolare della lesione e la presenza di una sottile capsula di separazione dal tessuto sano. (26)

## **Carcinoma follicolare**

Il carcinoma follicolare è una neoplasia maligna ben differenziata che origina dall'epitelio tiroideo. Rappresenta la seconda neoplasia più frequente dopo il carcinoma papillare. Negli ultimi 20 anni la sua incidenza sembrerebbe essere diminuita passando dal 15 al 10% di tutte le neoplasie tiroidee. I motivi di questo decremento sono diversi. Questa diminuzione così significativa può essere spiegata sia in termini relativi che assoluti tenendo presente alcune evidenze. Le principali sono:

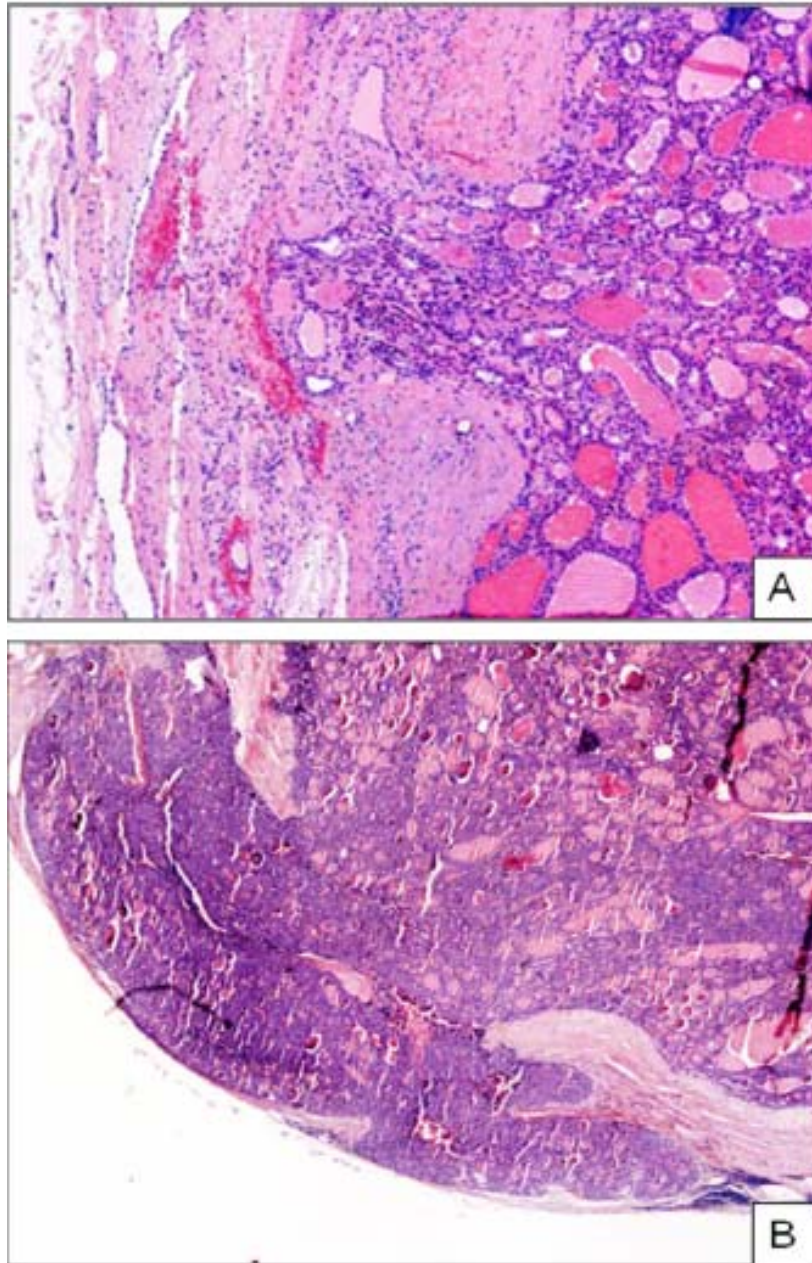
- In certe aree geografiche, come ad esempio negli Stati Uniti, si è assistito a un incremento notevole del carcinoma papillare con diminuzione relativa dell'incidenza di quello follicolare.
- Il carcinoma follicolare è particolarmente frequente nelle aree iodio-carenti. Grazie alla diffusione negli ultimi decenni del sale iodato, l'incidenza di questa neoplasia è sensibilmente diminuita insieme a tutte le patologie tiroidee associate alla carenza iodica.
- Nell'ultimo decennio si sono sviluppati criteri citologici e molecolari migliori per l'identificazione della variante follicolare del carcinoma papillare. Molte lesioni che prima erano classificate come carcinomi follicolari adesso rientrano nel gruppo dei carcinomi papillari.

Le donne sono maggiormente colpite rispetto agli uomini e l'incidenza di carcinoma follicolare aumenta con l'età, risultando particolarmente raro nei bambini. (27)

Macroscopicamente il carcinoma follicolare appare come una lesione capsulata di forma ovalare e di dimensioni generalmente comprese tra i 2 e i 4 cm anche se non è raro trovare neoplasie di dimensioni maggiori. Si presentano generalmente come masse solide e carnose, di colore biancastro. Una spessa capsula si ritrova spesso a delimitarli e, a differenza di quanto si possa pensare, maggiore è lo spessore della capsula più è alto l'indice di malignità, nonostante

sia assai difficile osservare macroscopicamente segni di invasione. Da un punto di vista istologico non si differenziano molto dall'adenoma follicolare presentando generalmente un'architettura solida e trabecolare o più raramente macrofollicolare. Anche citologicamente le differenze sono minime rispetto all'adenoma. Le cellule sono cuboidali, il citoplasma abbondante, i nuclei generalmente piccoli con margini lisci e cromatina piuttosto addensata. Figure mitotiche si rivelano in numero di 1-3 per campo ad alto ingrandimento. (Figura 7 A) Come si può intuire quindi, il pattern di crescita non è in grado di distinguere le lesioni benigne da quelle maligne e gli unici criteri che permettono tale distinzione sono rappresentati dall'invasione della capsula o dall'invasione vascolare. L'invasione capsulare si realizza nel momento in cui le cellule tumorali penetrano a tutto spessore all'interno della spessa capsula che delimita la lesione. ( Figura 7 B) In forme particolarmente avanzate le cellule tumorali si estendono oltre la capsula invadendo il tessuto circostante con formazioni di aspetto fungoide o talora uncinato. L'invasione vascolare si presenta come l'adesione delle cellule tumorali alle strutture vascolari presenti all'interno della capsula o nelle sue immediate vicinanze. (3)

Le cellule che invadono i lumi vascolari sono del tutto identiche a quelle tumorali. Gli emboli neoplastici possono risultare endotelizzati, ovvero rivestiti da endotelio e questo aspetto distingue il vero embolo neoplastico da un artefatto tecnico. Non a caso il carcinoma follicolare tende a metastatizzare a distanza per via ematica e spesso (10-15%) sono presenti metastasi già al momento della diagnosi. Le sedi più frequentemente interessate sono le ossa e i polmoni. Le metastasi linfonodali sono generalmente rare e la maggior parte delle lesioni un tempo classificate come carcinoma follicolare localizzato in sede linfonodale sono in realtà varianti follicolari del carcinoma papillare. (28)



**Figura 7: Carcinoma follicolare in microscopica:** si apprezza l'aspetto istologico e citologico di queste lesioni e l'invasione della capsula fibrosa con aspetto fungoide (28)

## **Carcinoma Papillare**

Il carcinoma papillare è una neoplasia maligna della tiroide di tipo ben differenziato che origina dall'epitelio follicolare. Presenta fondamentali caratteristiche nell'aspetto nucleare tanto che l'architettura papillare può non essere fondamentale ai fini della diagnosi. Il carcinoma papillare è di gran lunga la forma più frequente di neoplasia maligna tiroidea con un'incidenza notevolmente aumentata negli ultimi anni sia in termini assoluti che relativi, passando da circa il 70% delle neoplasie tiroidee ad inizi anni '70 ad oltre l'83% nel 2003. Le donne sono colpite tre volte più frequentemente degli uomini ed è anche di gran lunga la neoplasia tiroidea più frequente nell'età pediatrica. Il massimo dell'incidenza di questa neoplasia si registra nella quinta sesta decade di vita in entrambi i sessi. (13)

Macroscopicamente il carcinoma papillare si presenta come un nodulo di dimensioni variabili più frequentemente compreso tra 1 e 3 cm con bordi irregolari, non del tutto definiti. Superficialmente si presenta generalmente di colore piuttosto chiaro, grigio tendente al marrone, di consistenza dura e solida anche se talvolta può presentare un aspetto cistico e una consistenza relativamente friabile. (Figura 8) (3)



**Figura 8: Aspetto macroscopico tipico di un carcinoma papillare della tiroide (15)**

Microscopicamente i carcinomi papillari mostrano un pattern di crescita generalmente infiltrativo ben evidente ai confini delle neoplasia. La capsula può essere presente come no; più frequentemente si riscontra nella variante follicolare del carcinoma papillare, a volte anche nella variante classica. Talora possono presentare dei bordi ben demarcati. Nonostante nel carcinoma papillare si possano descrivere diversi aspetti istopatologici (pattern di crescita, corpi psammomatosi, aree di fibrosi) sono unicamente gli aspetti nucleari che permettono di porre diagnosi. L'architettura tissutale si presenta spesso organizzata in strutture papillari frammentate a forme follicolari. Le cellule presentano generalmente un aspetto cuboidale, più raramente colonnare con nuclei ben caratteristici. (Figura 9) (15) (3)

Se vogliamo schematizzare le caratteristiche nucleari che devono essere osservate al fine della diagnosi troviamo:

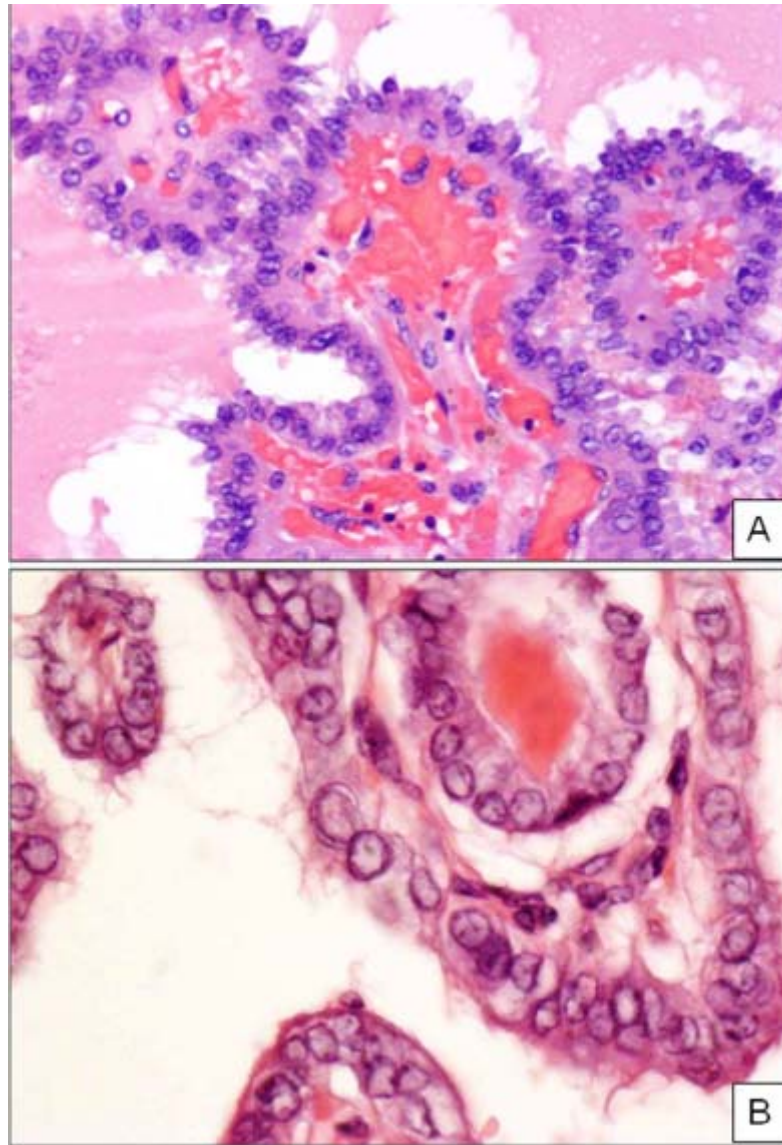
- ingrandimento nucleare;
- nucleo con aspetto a vetro smerigliato a causa della rarefazione della cromatina;
- affollamento nucleare;
- irregolarità della membrana nucleare, con presenza di “grooves” (incisure a chicco di caffè);
- presenza di pseudo inclusioni e pseudo nucleoli che rappresentano invaginazioni citoplasmatiche che sul piano morfologico bidimensionale ricordano i nucleoli.

I carcinomi papillari si presentano spesso come lesioni multifocali nel 20-30% dei casi e questo è uno dei motivi principali per cui si eseguono in genere interventi radicali di tiroidectomia totale. A differenza del carcinoma follicolare l'invasione vascolare è rara e generalmente molto tardiva nella storia clinica del tumore. Molto più frequente è l'invasione linfatica e quella locale che si realizza quando il tumore sconfina dalla capsula tiroidea e invade i tessuti fibroadiposi o muscolari vicini alla ghiandola. (26)

Attualmente sono state identificate molteplici varianti del carcinoma papillare come illustrato nella tabella sottostante. (Tabella 6)

Di queste sicuramente quella che merita un approfondimento maggiore per l'estrema difficoltà nella classificazione e riconoscimento è rappresentata dalla variante follicolare.





**Figura 9: Carcinoma papillare in microscopica:** si evidenziano sia le caratteristiche architettoniche che cellulari della neoplasia con particolare riferimento all'aspetto nucleare (3)

Microscopic variants of papillary carcinoma.

Variant	Diagnostic Criteria	Prevalence
<b>Papillary microcarcinoma</b>	size 1 cm or less incidental finding	30-40%
<b>Follicular variant</b>	> 50% follicular growth pattern no well-formed papillae	15-20%
<b>Tall cell variant</b>	>50% tall cells with height 3 times their width	5-10%
<b>Solid variant</b>	>50% solid, trabecular or insular growth	1-3%
<b>Diffuse sclerosing variant</b>	diffuse tumor growth within gland abundant fibrosis extensive lymphocytic infiltration numerous psammoma bodies squamous metaplasia	1-2%
<b>Columnar cell variant</b>	columnar cells with nuclear stratification	<1%
<b>Oncocytic variant</b>	>50% cells with oncocytic cytoplasm	<1%
<b>Warthin-like variant</b>	dense lymphocytic infiltration in papillary stalks cells with oncocytic cytoplasm	<1%
<b>Clear cell variant</b>	>50% cells with clear cytoplasm	<1%
<b>Cribriform-morular variant</b>	cribriform growth pattern morules	<1%
<b>Papillary carcinoma with fasciitis-like stroma</b>	abundant cellular stroma resembling nodular fasciitis	<1%

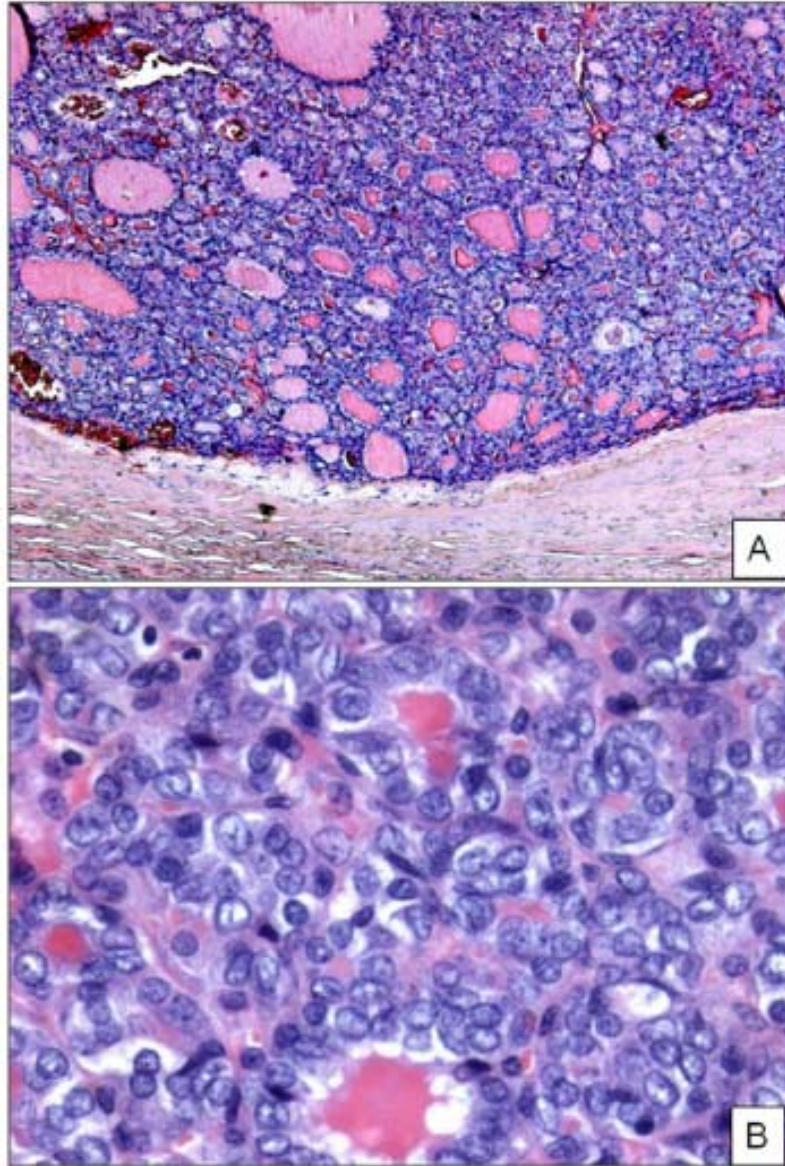
Tabella 6: Varianti del carcinoma papillare della tiroide in base alla classificazione proposta dal WHO.

### **Variante follicolare del carcinoma papillare**

La variante follicolare del carcinoma papillare della tiroide rappresenta circa il 20% delle forme istologiche di questa neoplasia. Si caratterizza per l'architettura follicolare, in assenza di papille ben formate, e per le caratteristiche nucleari tipiche del carcinoma papillare della tiroide. La lesione può presentarsi sia capsulata sia con un atteggiamento infiltrante nei confronti del tessuto sano circostante. L'identificazione e la corretta classificazione di queste lesioni è sicuramente una delle difficoltà maggiori nell'analisi anatomopatologica dei preparati tiroidei e rappresenta anche l'ambito in cui si registrano le maggiori controversie. (29)

Fino agli anni '60 questa variante era assolutamente sconosciuta e questi profili venivano fatti rientrare nell'ambito del carcinoma follicolare. Microscopicamente il tumore appare organizzato in follicoli di dimensioni assai variabili. I nuclei, come detto, presentano le caratteristiche peculiari del carcinoma papillare anche se alcune caratteristiche, come ad esempio le pseudoinclusioni, risultano meno evidenti. (Figura 10)

Risulta molto difficile valutare l'effettiva diffusione di questa variante in quanto, se le alterazioni nucleari non sono particolarmente evidenti, c'è il rischio di classificare la lesione come una forma benigna adenomatosa nella forma capsulata o altresì considerarla un carcinoma follicolare. Diversi autori hanno recentemente proposto di istituire una categoria a sé stante per quelle lesioni in cui non si riesca a capire l'effettivo pattern cellulare e l'eventuale invasione di strutture capsulari, vascolari e linfatiche. È stata proposta la definizione di *"lesioni a potenziale maligno non definito"*. (3) (27) (29)



**Figura 10: Variante follicolare del carcinoma papillare in microscopica: si nota la struttura follicolare e le caratteristiche nucleari tipiche del carcinoma papillare.(29)**

Criticità nella valutazione diagnostica e prognostica del carcinoma tiroideo.

Come è stato illustrato in precedenza, l'esecuzione del FNAB rappresenta attualmente il metodo preoperatorio più affidabile per giungere a diagnosi nella maggior parte dei pazienti che presentano uno o più noduli tiroidei. Nei casi dubbi saranno le caratteristiche cliniche, il profilo ormonale o in ultima analisi la valutazione istologica mediante prelievo chirurgico o tiroidectomia a fugare eventuali dubbi sulla malignità di una lesione e sulle sue caratteristiche istologiche. Le principali difficoltà si riscontrano nell'individuazione e classificazione delle lesioni di aspetto follicolare. Come detto, l'aspetto dirimente tra un carcinoma follicolare e l'adenoma follicolare risiede nell'osservazione dell'invasione capsulare e/o dell'invasione vascolare. Purtroppo il FNAB non è in grado di operare questa discriminazione. Altre problematiche risiedono nella difficoltà di distinguere tra un carcinoma follicolare e una variante follicolare di un carcinoma papillare, anche perché le caratteristiche nucleari necessarie alla diagnosi di PTC non sempre sono di facile visualizzazione e non trovano ancora l'accordo unanime di tutti i patologi. Tuttavia, riuscire a distinguere in modo chiaro le varie lesioni follicolari è fondamentale anche in un'ottica di gestione e prognosi del paziente. Classificare come maligna una lesione che in realtà non lo è, espone il paziente a una serie di terapie aggressive quali la tiroidectomia e la radioablazione e alle loro possibili complicanze come altresì una mancata diagnosi di malignità espone il paziente a una crescita invasiva del carcinoma tiroideo con rischio di lesioni multifocali e di metastasi a distanza.

Un altro aspetto assai controverso riguarda le modalità di trattamento di quei carcinomi tiroidei papillari che presentano dimensioni inferiori ai 20 mm e che comunemente vengono definitivi "small PTC" (sPTC). All'interno di questo gruppo che comprende quasi il 90% dei carcinomi papillari della tiroide al

momento della diagnosi rientrano anche i cosiddetti “micro PTC”, ovvero tumori delle dimensioni inferiori ai 10mm, per i quali sono stati proposti protocolli di trattamento particolari (4). Generalmente gli sPTC hanno un decorso clinico particolarmente benigno anche se i fattori prognostici non sono stati ancora del tutto chiariti. Inoltre rimane del tutto da chiarire quale sia l’approccio migliore per quelle neoplasie papillari con dimensioni comprese tra i 10 e i 20mm.

Nel contesto di queste difficoltà diagnostiche e prognostiche, si sono sviluppati negli ultimi anni numerosi studi di biologia molecolare volti all’identificazione di specifiche mutazioni dei principali oncogeni coinvolti nella patologia neoplastica tiroidea. Attualmente, nonostante non si sia ancora giunti a conclusioni univoche e definitive, sembra questa la strada più promettente per disporre in un futuro non troppo lontano di metodiche diagnostiche e staditative ancora più accurate. Passeremo quindi in rassegna le principali conoscenze sui marcatori genetici soffermandoci in particolar modo sul BRAF su cui verterà lo studio proposto.

## Parte IV- Caratterizzazione molecolare dei carcinomi tiroidei e ruolo chiave di BRAF

### Marcatori genetici nel carcinoma tiroideo

Sulla base delle attuali conoscenze la maggior parte delle mutazioni correlate con lo sviluppo dei carcinomi tiroidei riguarda geni che codificano per proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale attivate da fattori di crescita. In condizioni fisiologiche queste vie favoriscono la proliferazione e l’accrescimento cellulare in risposta a specifici segnali mediante fini processi regolatori. In termini molto semplificativi, il sistema viene descritto a cascata ed

è costituito da numerosi fattori che interagendo gli uni con gli altri determinano la progressione ed amplificazione del segnale fino all'attivazione di proteine endonucleari in grado di influenzare direttamente l'espressione di specifici geni coinvolti nella proliferazione cellulare. (30)

Se tuttavia, a causa di una o più mutazioni, vengono persi i meccanismi regolatori e si viene a creare un'iperattivazione di queste vie ne consegue un'anomala proliferazione cellulare che può sfociare nello sviluppo di una neoplasia. Le principali molecole coinvolte sono riassunte nello schema sottostante. A livello tiroideo, sono principalmente due le vie attivate dall'interazione dei ligandi con i recettori tirosin-chinasici presenti sulla membrana cellulare (RTK). Una è la via delle MAP chinasi (MAPK), l'altra quella del sistema PI3K-AKT-m-TOR; entrambe queste vie possono essere attivate da RAS, uno dei fattori chiave nella proliferazione cellulare. (Figura 11)

(30) (6)

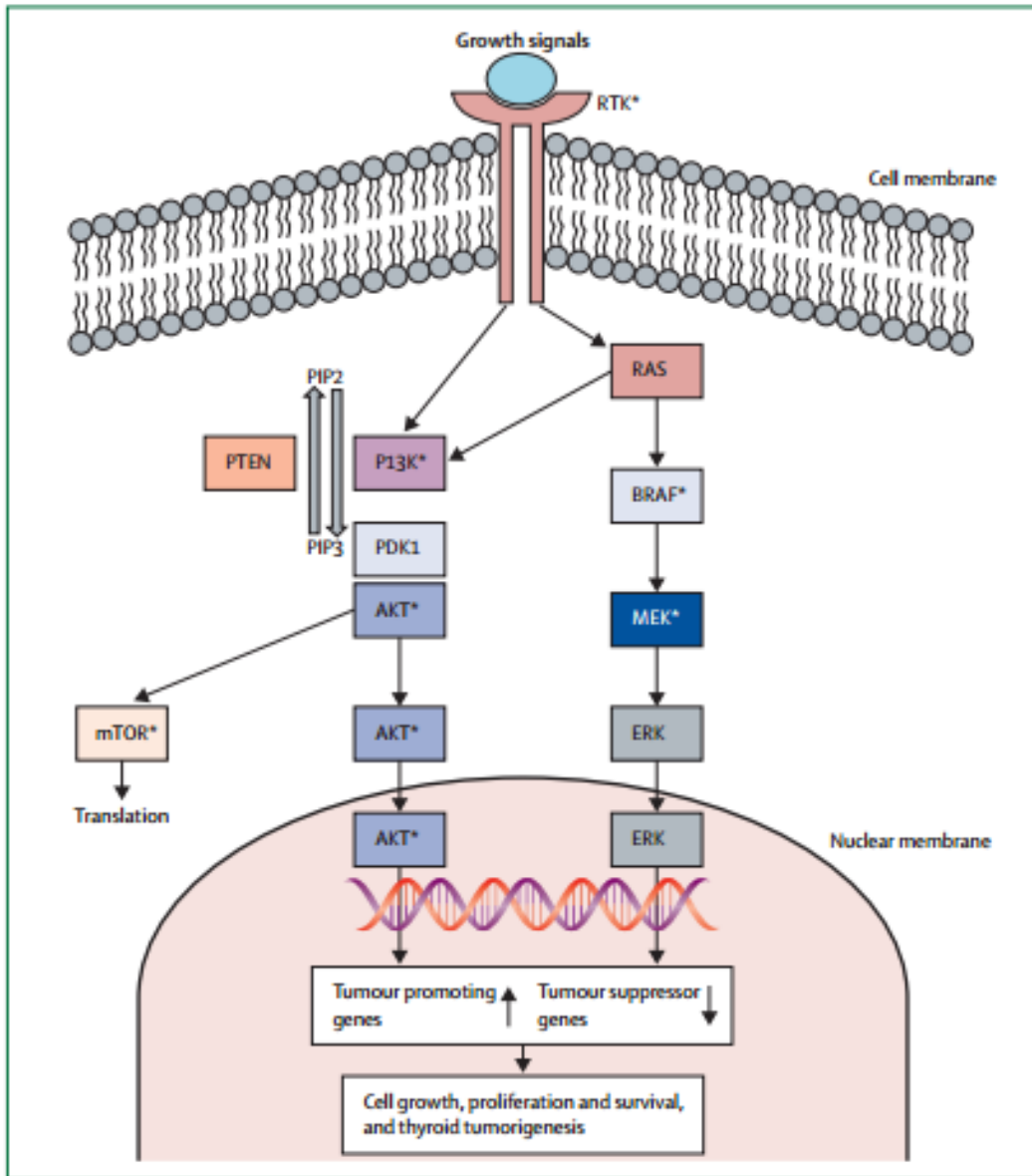


Figura 11: Schematizzazione delle principali molecole coinvolte nella trasmissione del segnale a livello tiroideo. Da osservare come la proteina RAS rappresenti il *trait d'union* tra la via di BRAF-MAPK e quella di PI3K-AKT-mTOR (6)



Negli ultimi decenni sono state identificate numerosissime mutazioni coinvolte nella tumorigenesi tiroidea, riassunte nella tabella sottostante. Si fa riferimento al carcinoma papillare, al carcinoma follicolare, al carcinoma poco differenziato e a quello anaplastico. (Tabella 7)

Il carcinoma papillare presenta frequenti mutazioni puntiformi dei geni BRAF e RAS come anche riarrangiamenti di RET/PTC. Tutte queste mutazioni si caratterizzano per la capacità di iperattivare il sistema delle MAP chinasi (MAPK). Queste mutazioni si riscontrano fin nel 70% dei carcinomi papillari della tiroide. Nei carcinomi follicolari si riscontrano sia mutazioni di RAS che riarrangiamenti di PAX8/PPAR $\gamma$  potendo riguardare fino al 70-75% di questi carcinomi. Le alterazioni genetiche del PI3K/AKT risultano invece particolarmente rare, seppur talora presenti, nelle forme ben differenziate di carcinoma tiroideo. La loro frequenza aumenta invece in modo significativo nelle neoplasie scarsamente differenziate. Mutazioni dell'oncosoppressore p53 e delle  $\beta$ -catenine si riscontrano assai frequentemente nei carcinomi poco differenziati o anaplastici.(3) (30)

Caratteristica istologica	Prevalenza %
<b>Carcinoma papillare</b>	
• BRAF	40-45
• RET/PTC	10-20
• RAS	10-20
<b>Carcinoma follicolare</b>	
• RAS	40-50
• PAX8/PPAR $\gamma$	30-35
• PIK3CA	10
<b>Carcinoma poco differenziato</b>	
• RAS	25-30
• $\beta$ - catenina	10-20
• p53	20-30
• BRAF	10-15
<b>Carcinoma anaplastico</b>	
• p53	70-80
• $\beta$ - catenina	60-70
• RAS	40-50
• BRAF	20-30

**Tabella 7: Frequenza delle principali mutazioni riscontrate nelle analisi molecolari dei diversi tipi istologici del carcinoma tiroideo.**

Lo sviluppo di test genetici per la diagnosi e la prognosi del carcinoma tiroideo sembra rappresentare la più moderna prospettiva in questo ambito. Guardando l'aspetto diagnostico, sarebbe auspicabile l'identificazione di mutazioni in grado di caratterizzare in modo univoco le diverse tipologie neoplastiche o addirittura le specifiche varianti. Se con le mutazioni di BRAF e il riarrangiamento di RET/PTC disponiamo sicuramente di importanti marcatori del carcinoma papillare, occorre dire che al momento non sono state identificate mutazioni altrettanto caratterizzanti la variante follicolare sul quale sussistono, come visto, le principali difficoltà diagnostiche.

Passerò ora in rassegna i principali marker molecolari studiati nei differenti carcinomi tiroidei. Al fine di questa trattazione e dello studio proposto, mi soffermerò particolarmente sulle caratteristiche di BRAF e sul suo possibile significato diagnostico e prognostico.

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

Grandi speranze sono state riposte a fine anni '90 su una proteina PAX8/PPAR $\gamma$  derivante da un'anomala traslocazione nucleare. Inizialmente questa mutazione sembrava essere presente unicamente nei carcinomi follicolari, tanto che alcuni autori la proposero come marcatore genetico da utilizzare nella diagnosi differenziale tra adenoma follicolare e carcinoma follicolare, anche in fase preoperatoria. Successivamente in altri studi si è osservato che questa mutazione ricorre talora anche negli adenomi follicolari e questo ha fatto pensare che tale mutazione potrebbe favorire l'evoluzione di un adenoma follicolare in un carcinoma follicolare. Inoltre va aggiunto che rispetto ai primi dati, la prevalenza di PAX8/PPAR $\gamma$  è risultata essere di gran lunga inferiore con una media del 40%. Essendo dunque il PAX8/PPAR $\gamma$  negativo in molti carcinomi follicolari e anche in un'alta percentuale di lesioni successivamente

classificate come variante follicolare del carcinoma papillare, appare molto difficile poter utilizzare questo fattore in una fase pre-operatoria a scopo diagnostico. (27) (31)

### **PI3K**

Queste chinasi sono una famiglia di enzimi coinvolti in complessi meccanismi cellulari come la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la sopravvivenza intracellulare; le PI3K trasducono i segnali intracellulari mediante la fosforilazione dell'idrossile in posizione 3 presente sull'anello inositico del fosfatidilinositolo (PtdIns). La fosfatasi PTEN svolge un ruolo chiave nei meccanismi regolatori di questa via, rimuovendo i gruppi fosfati e inibendo quindi la trasduzione del segnale.

Recentemente mutazioni nella cascata della fosfatidilinositol3-chinasi (PI3K) sono state indagate per il loro ruolo nello sviluppo del carcinoma follicolare. Studi successivi hanno dimostrato tuttavia la scarsa attendibilità di questi marcatori e attualmente il possibile impiego di questi marker sembra del tutto impraticabile. (30)(32)

### **RET/PTC**

La proteina RET è un recettore per il fattore neurotrofico di derivazione gliale e per proteine simili che promuovono la sopravvivenza cellulare durante lo sviluppo. Mutazioni ereditarie di questo gene sono alla base dello sviluppo di neoplasie endocrine multiple, in particolare della MEN-2 nelle quali si assiste, fra l'altro, alla formazione di carcinomi midollari della tiroide particolarmente aggressivi. (3)

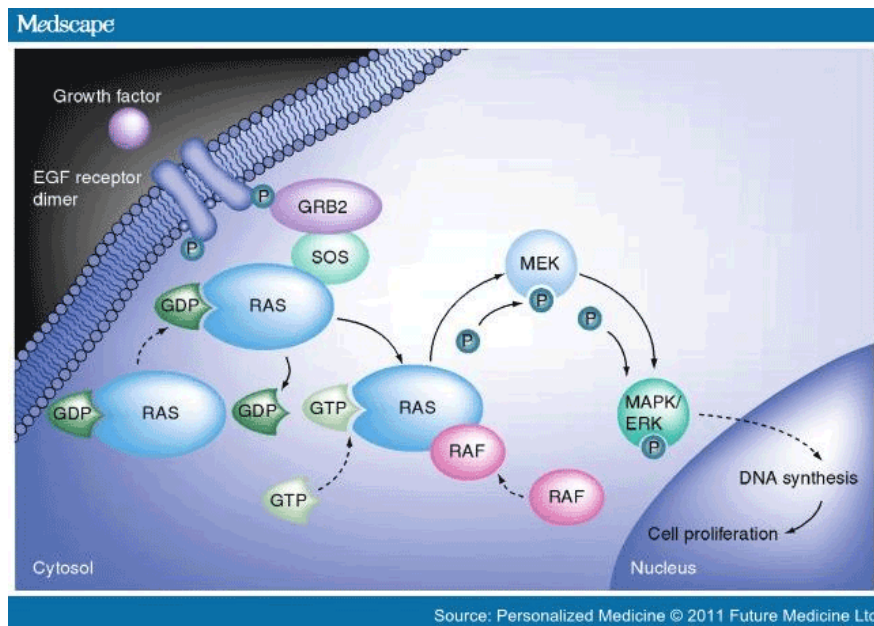
Questo gene inoltre nella forma mutata Ret/ptc è correlato all'insorgenza di alcune neoplasie. Ret/ptc altro non è che un gene in cui Ret si fonde con altri geni; questa fusione genera una proteina chimerica sempre attiva. I due principali geni Ret/ptc sono Ret/ptc 1 e Ret/ptc 3. Ret/ptc 1 viene generato da un'inversione paracentrica sul cromosoma 10, che accosta due geni normalmente lontani tra loro, ossia H4 e Ret. Quest'ultima forma è correlata al carcinoma papillare della tiroide. Diversi dati epidemiologici hanno fatto ritenere l'esposizione alle radiazioni come la principale causa di questa mutazione; una forma più aggressiva di questo tumore è stata rilevata nelle popolazioni esposte alle radiazioni dopo il disastro nucleare di Chernobyl. (33)

Riarrangiamenti di RET/PTC sono stati inizialmente considerati come marcatori esclusivi dei carcinomi papillari ma successivamente sono stati identificati anche in lesioni benigne; anzi, utilizzando metodiche altamente sensibili quali ad esempio la FISH, si è visto che questi riarrangiamenti sono assai frequenti nelle neoplasie tiroidee benigne e pertanto anche RET/PTC non può essere considerato un marker assoluto di carcinoma papillare. (34)

## **RAS**

Le proteine RAS sono state scoperte come prodotti di oncogeni virali. Mutazioni puntiformi dei geni della famiglia RAS sono l'anomalia singola più comune di oncogeni trasmessi come caratteri autosomici dominanti nei tumori umani. Circa il 15- 20% dei tumori umani contengono mutazione dell'oncogene RAS. Molti studi indicano che RAS ha un ruolo nella mitogenesi indotta da fattori di crescita. Le proteine RAS normali sono situate sul lato interno della membrana citoplasmatica e passano in continuazione da uno stato attivato che trasmette il segnale a uno inattivo. Nello stato inattivo le proteine RAS legano la guanosina difosfato (GDP); quando le cellule sono stimulate da fattori di crescita, RAS si attiva promovendo la fosforilazione di GDP a GTP. RAS

attivato agisce sulla via delle MAP chinasi reclutando la proteina citosolica RAF. Le MAP chinasi, così attivate, promuovono l'espressione di numerosi geni coinvolti nei processi di proliferazione ed accrescimento cellulare. In condizioni normali la proteina RAS è transitoriamente attivata, in quanto possiede un'intrinseca attività GTPasica in grado di scindere il GTP a GDP, favorendo quindi l'inattivazione dell'intero sistema. L'attività GTPasica è notevolmente potenziata dalla presenza di alcune proteine, le GAP, che favoriscono una rapida idrolisi del GTP a GDP agendo quindi da "freni" sul sistema. Le proteine RAS mutate, pur legandosi ancora alle GAP, non subiscono da esse la normale azione inibitoria risultando così continuamente attivate. (Figura 12) (3)



**Figura 12: Modello semplificato della via di trasduzione del segnale mediata da RAS.**

Mutazioni attivanti l'oncogene RAS sono state identificate anche nei carcinomi tiroidei ben differenziati. In particolar modo mutazioni di RAS sono state associate alla patogenesi del carcinoma follicolare della tiroide ma il loro

significato è attualmente controverso visto che mutazioni di RAS sono state trovate anche in adenomi follicolari.(30) (35)

Alcuni studi recenti hanno valutato l'espressione di specifiche mutazioni di RAS nella variante follicolare del carcinoma papillare, la cui identificazione al FNAB risulta particolarmente complessa. Sulla base dei primi dati raccolti le mutazioni di RAS potrebbero offrire un supporto diagnostico nell'identificare i carcinomi papillari variante follicolare, anche se ulteriori studi sono necessari. (36)

### BRAF: caratteristiche molecolari

La scoperta di mutazioni attivanti il gene di BRAF ha fornito importanti contributi alla comprensione del ruolo cruciale delle MAP chinasi nei meccanismi di proliferazione e accrescimento cellulare. BRAF, con il suo gene espresso sul cromosoma 7, rappresenta il più potente attivatore della cascata delle MAP chinasi "a valle" di RAS. BRAF è una proteina di 766 aminoacidi della famiglia delle serine-treonine chinasi. Presenta tre domini caratteristici, tipici di tutte le proteine della famiglia RAS:

- **CR1:** svolge la sua funzione inducendo un'autoinibizione del dominio CR3, partecipando quindi all'autoregolazione della proteina.
- **CR2:** funge principalmente da *trait d'union* tra il CR1 e il CR3
- **CR3:** rappresenta il dominio enzimatico della proteina. Risulta costituito da due porzioni. La prima, sul versante N-terminale (residui 457-530) lega l'ATP, mentre la seconda, sul versante C-terminale (residui 535-717) lega i vari substrati proteici che verranno fosforilati ed attivati.

Oltre ai domini descritti BRAF presenta anche numerosi sottodomini che contribuiscono alle varie funzioni regolatrici e attivanti della proteina. Tra questi hanno un ruolo sicuramente primario:

- **P-loop:** contribuisce a stabilizzare i gruppi fosfato non trasferibili dell'ATP quando BRAF lega questa molecola.
- **Catalytic loop:** comprende i residui aminoacidi tra il 574 e il 581 e trasferisce il gruppo fosfato dall'ATP ai substrati proteici. In particolare D576 agisce da accettore di protoni determinando l'attivazione dei residui di treonina e serina e permettendo il trasferimento dei gruppi fosfato.
- **Activation loop:** i residui tra il 596 e il 600 legano in modo estremamente saldo il P-loop nella conformazione inattiva della proteina, bloccandola in questa configurazione fino a quando l'activation loop non viene fosforilato. La fosforilazione infatti determina con la sua carica negativa un quadro di instabilità inducendo quindi il distacco dell'activation loop dall'P-loop. Questo evento è alla base del passaggio della proteina dalla forma inattiva a quella attiva. (37)

## Ruolo delle mutazioni di BRAF nel carcinoma papillare della tiroide

Mutazioni puntiformi attivanti il gene BRAF sono state descritte principalmente negli esoni 11 e 15 e la transversione T1799A rende conto da sola di oltre il 90% delle mutazioni del gene BRAF. Questa mutazione è responsabile della sostituzione aminoacidica (da valina ad acido glutammico) V600E nella proteina corrispondente e della conseguente attivazione deregolata di questa proteina. Si ritiene che questa sostituzione sia in grado di simulare una fosforilazione nel dominio di attivazione della proteina BRAF mediante l'inserimento di una carica negativa nelle immediate vicinanze del sito di fosforilazione Ser-599. In questo modo la proteina BRAF si trova in una conformazione tale per cui il suo segmento attivante non è più in grado di interagire con l'ATP-binding P loop la cui funzione è quella di rendere BRAF inattiva. Il ruolo oncogenico di BRAF V600E è stato ampiamente dimostrato



non soltanto nelle neoplasie tiroidee, risultando estremamente frequente soprattutto nei melanomi e nei nevi benigni. (15) (34)

Numerosi studi hanno dimostrato un'altissima prevalenza di BRAF V600E nel carcinoma tiroideo (29-83%). Altre mutazioni riscontrate nei carcinomi tiroidei sono la K601E, mentre mutazioni dell'esone 11 sono state riscontrate in tumori non tiroidei. Un'altra possibile alterazione del gene di BRAF sembra essere legata all'inversione paracentrica del braccio lungo del cromosoma 7, in grado di determinare la fusione tra il gene di BRAF e quello di AKAP9. Ne risulta così la nascita di un oncogene AKAP9-BRAF particolarmente frequente nei carcinomi papillari della tiroide conseguenti all'esposizione ad alte dosi di radiazioni. (37)

Come detto in precedenza, BRAF V600E rappresenta la proteina mutata più frequentemente riscontrata nei carcinomi tiroidei. Diversi studi hanno mostrato come questa mutazione sia presente quasi esclusivamente nel carcinoma papillare e nel carcinoma anaplastico. Nei 29 studi presi in considerazione da Xing nessun carcinoma follicolare, nessun carcinoma midollare e nessuna neoplasia benigna della tiroide sembrerebbe presentare questa mutazione. La prevalenza media di BRAF V600E nei carcinomi papillari è circa il 44% (810/1856) mentre negli anaplastici è del 24% (23/94). ( Tabella 8) (38)

L'elevata frequenza di questa mutazione nei carcinomi papillari della tiroide ha fatto supporre un ruolo chiave nella cancerogenesi di queste neoplasie. Inoltre, la sua presenza nei carcinomi anaplastici sembra fornire una prima prova molecolare circa l'origine di queste neoplasie tanto rare quanto aggressive. Esse infatti potrebbero originare da carcinomi papillari a seguito di processi di differenziazione. Chiaramente i meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo di un carcinoma anaplastico sono più complessi e coinvolgono anche molti altri geni (p53,  $\beta$ -catenine etc). Inoltre va ricordato che circa il 60-70% dei carcinomi anaplastici non presenta mutazioni di BRAF tanto che alcuni autori

hanno supposto che in questi casi il carcinoma anaplastico potrebbe derivare da aree di carcinoma follicolare, che non esprime generalmente mutazioni di BRAF. (39)

Report	Frequency (mutation/total (%))					Reference
	PTC	FTC	ATC	MTC	Benign neoplasm	
1	28/78 (36)	0/10 (0)	-	-	0/26 (0)	Kimura <i>et al.</i> 2003
2	24/35 (69)	0/16 (0)	-	0/3 (0)	0/20 (0)	Cohen <i>et al.</i> 2003
3	21/56 (38)	-	-	-	0/24 (0)	Xu <i>et al.</i> 2003
4	23/50 (46)	0/18 (0)	-	-	0/72 (0)	Soares <i>et al.</i> 2003
5	40/76 (53)	0/8 (0)	0/7 (0)	0/9 (0)	-	Fukushima <i>et al.</i> 2003
6	49/170 (29)	0/11 (0)	2/6 (33)	-	0/20 (0)	Namba <i>et al.</i> 2003
7	45/119 (38)	0/32 (0)	3/29 (10)	0/13 (0)	0/111 (0)	Nikiforova <i>et al.</i> 2003
8	18/30 (60)	0/12 (0)	-	-	0/9 (0)	Xing <i>et al.</i> 2004a
9	14/28 (50)	0/14 (0)	2/10 (20)	0/14 (0)	0/54 (0)	Xing <i>et al.</i> 2004b
10	8/16 (0)	0/6	-	-	0/21 (0)	Xing <i>et al.</i> 2004c
11	45/124 (36)	-	-	-	-	Trovisco <i>et al.</i> 2004
12	-	-	8/16 (50)	-	-	Begum <i>et al.</i> 2004
13	58/70 (83)	-	-	-	-	Kim <i>et al.</i> 2004
14	30/82 (37)	-	-	-	-	Nikiforova <i>et al.</i> 2004
15	36/95 (38)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/1 (0)	0/32 (0)	Cohen <i>et al.</i> 2004
16	19/60 (32)	-	-	-	-	Frattoni <i>et al.</i> 2004
17	18/56 (32)	0/5 (0)	0/4 (0)	-	0/1 (0)	Fugazzola <i>et al.</i> 2004
18	24/60 (40)	0/5 (0)	0/1 (0)	-	0/6 (0)	Puxeddu <i>et al.</i> 2004
19	-	-	6/17 (35)	-	-	Soares <i>et al.</i> 2004
20	97/232 (42)	-	-	-	-	Penko <i>et al.</i> 2004
21	26/69 (38)	-	-	-	0/27 (0)	Salvatore <i>et al.</i> 2004
22	13/46 (28)	-	-	-	-	Sedliarou <i>et al.</i> 2004
23	55/91 (60)	0/3 (0)	-	-	0/24 (0)	Vasil'ev <i>et al.</i> 2004
24	-	-	-	-	0/40 (0)	Krohn <i>et al.</i> 2004
25	-	-	-	-	0/10 (0)	Kimura <i>et al.</i> 2004
26	7/15 (47)	0/7 (0)	-	0/24 (0)	-	Perren <i>et al.</i> 2004
27	37/72 (51)	0/8 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/45 (0)	Hayashida <i>et al.</i> 2004
28	38/61 (62)	0/8 (0)	-	-	-	Porra <i>et al.</i> 2005
29	37/65 (57)	-	-	-	-	M Xing <i>et al.</i> unpublished results
Overall	810/1856 (44)	0/165 (0)	23/94 (24)	0/65 (0)	0/542 (0)	

Tabella 8: Frequenza di BRAF V600E nei carcinomi tiroidei sporadici dell'adulto (38).

Un'altra prova a supporto del ruolo chiave della proteina BRAF V600E nello sviluppo del carcinoma papillare della tiroide è venuta dagli studi condotti sugli animali. Topi transgenici in cui viene indotta l'espressione di BRAF V600E a livello tiroideo sviluppano carcinomi tiroidei di tipo papillare. (40)

Come illustrato in precedenza, il carcinoma papillare della tiroide presenta numerose varianti. Se andiamo a vedere come BRAF V600E si distribuisce tra le principali varianti (variante classica, variante follicolare, variante a cellule alte) si osserva che la massima prevalenza è nella variante a cellule alte, 77%. Nella variante classica è del 60% mentre nella variante follicolare è del 12%. (Tabella 9)

Le altre varianti istologiche del carcinoma papillare sono molto rare. Tra queste si è osservata una prevalenza di BRAF V600E nel 40% delle varianti oncocitiche (6/15) e nel 75% della variante Whartin-like (6/8).

Report	Frequency (mutation/total (%))			Reference
	Conventional PTC	Follicular-variant PTC	Tall-cell PTC	
1	28/53 (53)	2/30 (7)	6/6 (100)	Nikiforova <i>et al.</i> 2003
2	28/42 (67)	6/51 (12)	-	Cohen <i>et al.</i> 2004
3	58/70 (83)	-	-	Kim <i>et al.</i> 2004
4	28/53 (53)	0/32 (0)	1/3 (33)	Trovisco <i>et al.</i> 2004
5	-	-	11/14 (79)	Frattini <i>et al.</i> 2004
6	18/47 (38)	0/6 (0)	-	Fugazzola <i>et al.</i> 2004
7	19/35 (54)	-	-	Puxeddu <i>et al.</i> 2004
8	16/35 (45)	3/22 (14)	5/9 (55)	Salvatore <i>et al.</i> 2004
9	36/52 (69)	2/9 (22)	-	Porra <i>et al.</i> 2005
10	15/24 (63)	8/25 (32)	14/16 (88)	M Xing <i>et al.</i> unpublished results
Overall	246/411 (60)	21/175 (12)	37/48 (77)	

Tabella 9: Frequenza della mutazione BRAF V600E nelle principali varianti del carcinoma papillare della tiroide (38).

Sulla base di questi dati, BRAF V600E sembra svolgere un ruolo maggiore nella cancerogenesi della variante a cellule alte e in quella classica. Questo potrebbe spiegare alcune delle caratteristiche peculiari di questi sottotipi. Le varianti classica e ancor di più quella a cellule alte si caratterizzano per un'aggressività maggiore rispetto alla variante follicolare. Attualmente, sulla base di questi e altri dati, si pensa che la mutazione di BRAF potrebbe rappresentare anche un marker di aggressività della neoplasia come verrà approfondito successivamente.

Valore diagnostico delle mutazioni di BRAF nei carcinomi tiroidei.

Diversi studi si sono incentrati sulla valutazione del valore diagnostico di BRAF nell'analisi dei preparati ottenuti mediante FNAB. Molti di questi studi sono retrospettivi e i primi risultati sono stati particolarmente incoraggianti. Circa i metodi utilizzati sull'identificazione delle mutazioni, questi studi hanno dimostrato l'utilizzo di metodiche altamente sensibili e specifiche, con valori

prossimi al 100%. I risultati ottenuti hanno mostrato una frequenza di circa il 44% della mutazione di BRAF V600E nei carcinomi papillari, in linea con i dati ottenuti sui preparati istologici. BRAF V600E non è stato mai identificato invece né in lesioni benigne né in carcinomi follicolari o midollari. Questo ha fatto pensare che la mutazione di BRAF potesse essere un valido strumento diagnostico. (38)

Tuttavia il quadro diventa assai più complesso nel momento in cui analizziamo l'espressione di BRAF in quei preparati di agoaspirazione classificati come indeterminati, sui quali prevalgono i principali dubbi diagnostici. In questi pazienti la mutazione di BRAF è espressa soltanto nell' 8%. Questi dati si spiegano tenendo presente che generalmente solo il 15% dei preparati indeterminati sono rappresentati da carcinomi papillari e che tra questi, come detto in precedenza, l'espressione media di BRAF V600E è del 44%. Inoltre è fondamentale ricordare che la maggior parte dei carcinomi a citologia indeterminata sono rappresentati da varianti follicolari del carcinoma papillare o da carcinomi follicolari dove BRAF V600E è pochissimo espresso o del tutto assente. Si intuisce pertanto che se la presenza di BRAF V600E ha un valore predittivo positivo altissimo nella determinazione dei carcinomi papillari, tuttavia l'assenza di questa mutazione non esclude che una determinata lesione sia un carcinoma papillare.(30) (38)

Nonostante questi dati abbiano in parte ridimensionato il ruolo diagnostico di BRAF, occorre tuttavia far notare che disporre comunque di un marcatore attendibile anche solo nell'8% dei preparati indeterminati significa poter riconoscere come carcinomi papillari della tiroide circa 7000 preparati ogni anno che precedentemente non avrebbero ricevuto una diagnosi, facendo sì che 7000 pazienti possano ricevere il miglior trattamento in relazione a questa diagnosi (dati americani). (38)

D'altro canto, sembra al momento impossibile poter utilizzare il BRAF come marcatore diagnostico unico in test di screening su preparati che non siano stati precedentemente selezionati sulla base di altre caratteristiche citologiche e immunoistochimiche. Diversi autori hanno ad esempio proposto di ricercare la mutazione di BRAF su quei preparati indeterminati per i quali la scelta di una terapia conservativa e un susseguente attento follow-up (wait and watch) sia clinicamente dubbia.

Per cercare di aumentare il potere diagnostico di BRAF altri autori hanno provato a realizzare test volti a ricercare la combinazione di BRAF V600E con altri marcatori caratteristici dei carcinomi papillari. Questi studi non hanno condotto al momento ai risultati sperati in quanto sia RET/PTC che RAS mutato ricorrono con una certa frequenza sia in altri carcinomi tiroidei che in lesioni assolutamente benigne. (34)

Altre prospettive sul ruolo diagnostico di BRAF sono rappresentate dalla ricerca di mutazioni del gene nel plasma sanguigno dove le cellule tumorali possono finire nel loro processo di accrescimento e metastatizzazione. Queste tecniche hanno offerto risultati incoraggianti negli adenocarcinomi del colon e in alcune neoplasie maligne delle vie biliari ma attualmente non disponiamo ancora di risultati soddisfacenti per quanto concerne i carcinomi tiroidei. (41)

Valore prognostico delle mutazioni di BRAF nel carcinoma papillare della tiroide.

I risultati di numerosi studi multicentrici hanno mostrato una stretta associazione tra la mutazione di BRAF e l'invasione delle strutture linfonodali, l'estensione extratiroidea della neoplasia primitiva e la recidiva di malattia. Nello studio condotto da Nikiforova su 104 casi di carcinoma papillare della

tiroide 38 presentavano una mutazione del gene BRAF e tra questi 16 presentavano un'invasione extratiroidea (42%). L'invasione extratiroidea riguardava invece solo il 20% dei carcinomi papillari BRAF negativi. In un altro studio coreano l'associazione tra mutazione di BRAF e metastasi linfonodali è stato riscontrato nel 67% dei casi (39/58) rispetto al 33% dei carcinomi che non presentavano mutazioni di BRAF (4/12). Nonostante alcuni studi abbiano inizialmente messo in dubbio il ruolo di BRAF nell'aggressività del carcinoma papillare, attualmente, sulla base di ulteriori analisi su campioni sempre più ampi sono state avvalorate le ipotesi iniziali. Associazioni simili sono state riscontrate anche nei carcinomi papillari tradizionalmente classificati come "low-risk".

Un altro studio condotto nel contesto dell'Università di Pisa ha analizzato 1060 casi di "small PTC" (< 20 mm). Su 1060 ben 473 esprimevano mutazioni di BRAF, in particolar modo V600E. Di questi 473 carcinomi è stata valutata la correlazione tra mutazione di BRAF e una serie di indicatori di aggressività, quali ad esempio le dimensioni tumorali, la multifocalità, la presenza o meno di una capsula, la presenza di metastasi linfonodali, l'estensione extratiroidea. Come si ricava dalla tabella sottostante la mutazione di BRAF correla in modo piuttosto evidente con tutti i principali indici di invasività. (tabella 10) (5)

Clinical-pathological features	BRAF V600E positive, n (%)	P value	OR (95% CI)	Statistical power (1- $\beta$ )
Age at diagnosis <sup>a</sup>				
Patients <45 yr (n = 544)	269 (49.4)	0.006	0.71 (0.55 to 0.90)	>0.95
Patients $\geq$ 45 yr (n = 497)	203 (40.8)			
Gender				
Male (n = 252)	121 (48.0)	>0.05	1.16 (0.88 to 1.54)	<0.7
Female (n = 795)	352 (44.3)			
Tumor size				
$\leq$ 10 mm (n = 578)	229 (39.6)	0.0001	1.65 (1.29 to 2.11)	0.99
11–20 mm (n = 469)	244 (52.0)			
Multifocality <sup>b</sup>				
Yes (n = 400)	210 (52.5)	<0.0001	1.61 (1.26 to 2.07)	0.99
No (n = 647)	263 (40.6)			
Presence of tumor capsule				
Yes (n = 324)	94 (29.0)	<0.0001	2.70 (2.04 to 3.57)	0.99
No (n = 723)	379 (52.4)			
Extrathyroidal extension/pT				
Yes/pT3 (n = 311)	210 (67.5)	<0.0001	3.74 (2.82 to 4.95)	0.99
No/pT1 (n = 736)	263 (40.6)			
Lymph node metastasis				
Yes (n = 186)	127 (68.3)	<0.0001	3.20 (2.29 to 4.49)	0.99
No (n = 861)	346 (40.2)			
AJCC stages <sup>a</sup>				
I (n = 905)	376 (41.5)	<0.0001	3.38 (2.28 to 5.00)	0.99
III/IV (n = 142)	96 (67.6)			

CI, Confidence interval.

<sup>a</sup> In six cases, age at diagnosis was unknown.

<sup>b</sup> The neoplasm with the greatest size or the highest pT status has always been analyzed in the presence of multifocality.

**Tabella 10: Correlazione tra BRAF V600E e caratteristiche patologiche e cliniche in 1047 PTCs. (5)**

Gli stessi autori hanno provveduto ad analizzare la correlazione tra BRAF mutato e un'ulteriore sottocategoria di PTCs, ovvero quei carcinomi papillari di dimensioni inferiori ai 10mm che vengono definitivi comunemente microPTC. Anche in questa casistica l'associazione tra mutazioni di BRAF e "pattern aggressivo" risulta sicuramente interessante. (Tabella 11)

Clinical-pathological features	BRAF V600E positive, n (%)	P value	OR (95% CI)	Statistical power
Age at diagnosis <sup>a</sup>				
Patients <45 yr (n = 277)	127 (45.8)	0.00527	1.63 (1.16–1.28)	0.8
Patients ≥45 yr (n = 299)	102 (34.1)			
Gender				
Male (n = 143)	58 (40.5)	0.8678	1.05 (0.71–1.54)	0.1
Female (n = 435)	171 (39.3)			
Multifocality <sup>b</sup>				
Yes (n = 196)	81 (41.3)	0.6092	1.11 (0.78–1.58)	0.1
No (n = 382)	148 (38.7)			
Presence of tumor capsule				
Yes (n = 170)	47 (27.6)	0.00021	0.47 (0.32–0.69)	0.97
No (n = 408)	182 (44.6)			
Extrathyroidal extension/pT				
Yes/pT3 (n = 98)	64 (65.3)	<0.0001	3.59 (2.27–5.67)	0.99
No/pT1 (n = 480)	165 (34.4)			
Lymph node metastasis				
Yes (n = 34)	20 (58.8)	0.02932	2.29 (1.13–4.63)	0.65
No (n = 544)	209 (38.4)			
AJCC stages <sup>a</sup>				
I (n = 523)	191 (36.5)	<0.0001	0.23 (0.12–0.42)	0.99
III/IV (n = 53)	38 (71.7)			

CI, Confidence interval.

<sup>a</sup> In two cases, age at diagnosis was unknown.

<sup>b</sup> The neoplasm with the greatest size or the highest pT status has always been analyzed in the presence of multifocality.

**Tabella 11: Correlazione tra BRAF V600E e gli aspetti patologici e clinici in 578 micro PTC (5)**

Nessuna associazione certa è stata invece trovata tra il BRAF mutato e le dimensioni tumorali e questo ha fatto ritenere che queste mutazioni conferiscano aggressività favorendo una maggiore infiltrazione locale e capacità di metastatizzare a distanza piuttosto che favorire un maggior accrescimento della neoplasia primitiva.

Altri studi hanno dimostrato come la presenza di BRAF mutato correli spesso con carcinomi papillari recidivanti e con una scarsa captazione dello iodio radioattivo, che riduce sensibilmente le possibilità terapeutiche per queste neoplasie. Uno studio volto a valutare la morbilità e la mortalità dei carcinomi papillari della tiroide esprime il BRAF ha messo in luce come queste neoplasie presentino sul medio lungo periodo una gestione clinica notevolmente più complessa rispetto ai pazienti BRAF negativi. (43) (44)

Questi carcinomi tendono infatti a ridurre sensibilmente fino anche a non esprimere numerosi geni coinvolti nella captazione e organificazione dello iodio quali NIS, TSHR, SLC26A4, TPO, e TG. Diversi studi in vitro e su topi mutanti hanno offerto conferme circa la capacità di BRAF mutato di indurre da un lato



una minore espressione di geni che favoriscono la differenziazione cellulare e dall'altro una maggiore espressione di fattori coinvolti nella crescita e proliferazione, quali VEGF e MET. Sempre studi condotti su topi avrebbero messo in luce come mutazioni di BRAF potrebbero portare all'insorgenza di carcinomi papillari della tiroide con la tendenza all'evoluzione in forme anaplastiche. (7)

Sulla base di tutte queste evidenze si pensa che le mutazioni di BRAF conferiscano una particolare aggressività ai carcinomi papillari e una prognosi sensibilmente peggiore. Attualmente numerosi studi si stanno concentrando sull'identificazione del ruolo prognostico di BRAF nei carcinomi papillari tiroidei. Se infatti le conoscenze acquisite fossero ulteriormente confermate, si potrebbe iniziare a valutare l'utilizzo di test genetici per l'individuazione del BRAF mutato in fase prechirurgica, per una migliore ottimizzazione dell'intervento e dei successivi trattamenti. Per una più dettagliata disamina di questi aspetti si rimanda alle conclusioni di questo lavoro.

## Parte V- Casistica, metodi e risultati

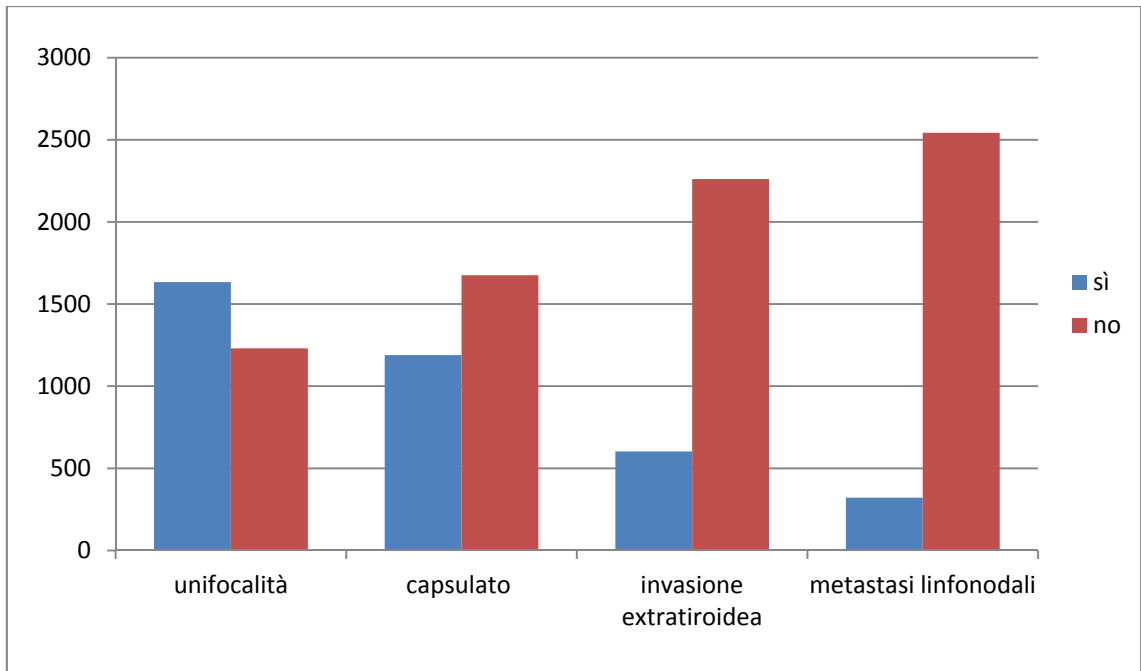
### Selezione dei pazienti e metodi

Dagli archivi dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica III Universitaria dell'Università di Pisa, è stata selezionata una coorte di 2864 pazienti (727 maschi e 2137 femmine; età media = 45 anni  $\pm$  14 anni d.s.) con diagnosi istologica di carcinoma papillare tiroideo sottoposti, nell'intervallo temporale compreso tra Gennaio 2006 e Dicembre 2013, a tiroidectomia totale presso il Dipartimento di Chirurgia della stessa università. Una linfadenectomia regionale del compartimento centrale e/o dei compartimenti latero-cervicali era stata eseguita in quei pazienti che presentavano linfonodi alterati nel loro

aspetto in sede chirurgica o in sede preoperatoria. L'analisi istopatologica è stata svolta presso il dipartimento di Anatomia Patologica III dell'Università di Pisa, secondo le più recenti linee guida del WHO nella classificazione delle neoplasie maligne della tiroide.

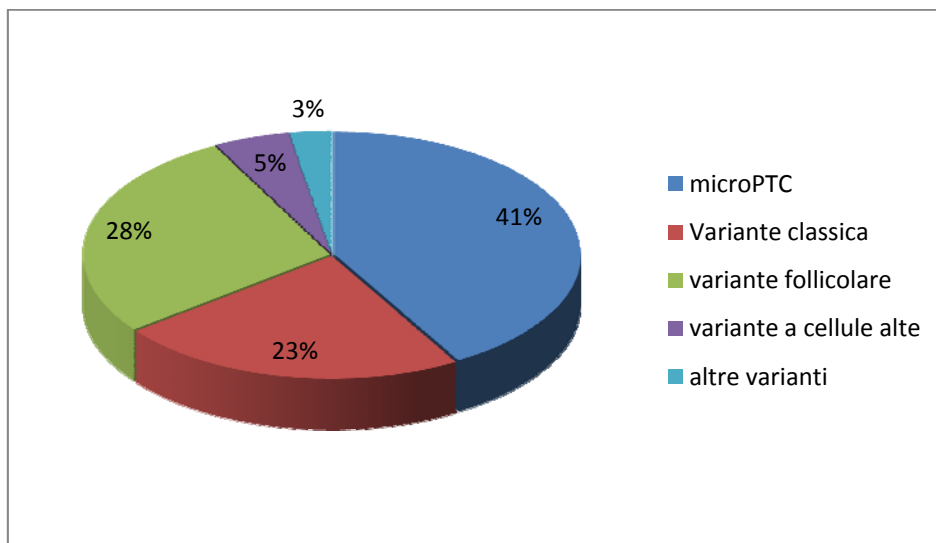
I preparati tiroidei dei pazienti selezionati, fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati riesaminati tenendo conto dei principali fattori di rischio noti per i carcinomi tiroidei quali le dimensioni tumorali, la multifocalità, la presenza di una capsula tumorale, l'invasione della capsula tiroidea, l'estensione extratiroidea della neoplasia e la presenza o meno di coinvolgimento linfonodale. Gli aspetti istologici sono stati valutati su campioni colorati con ematossilina ed eosina.

Le dimensioni medie del carcinoma sono risultate di  $16 \text{ mm} \pm 13 \text{ mm}$  d.s. Complessivamente 1634 (57%) casi si presentavano come lesioni singole mentre i restanti 1230 (43%) erano multifocali. Circa il grado di infiltrazione neoplastica 1189 (42%) si presentavano capsulati, mentre 1675 (58%) erano privi di una capsula ben evidente. 603 (21%) carcinomi presentavano segni di chiara invasione extratiroidea mentre 2261 (79%) erano confinati alla ghiandola tiroidea. 321 (11%) casi presentavano metastasi linfonodali mentre 2543 (89%) non avevano interessamento dei linfonodi. (Figura 13)



**Figura 13:** Rappresentazione schematica della distribuzione delle principali caratteristiche istologiche nel campione di 2864 casi preso in esame.

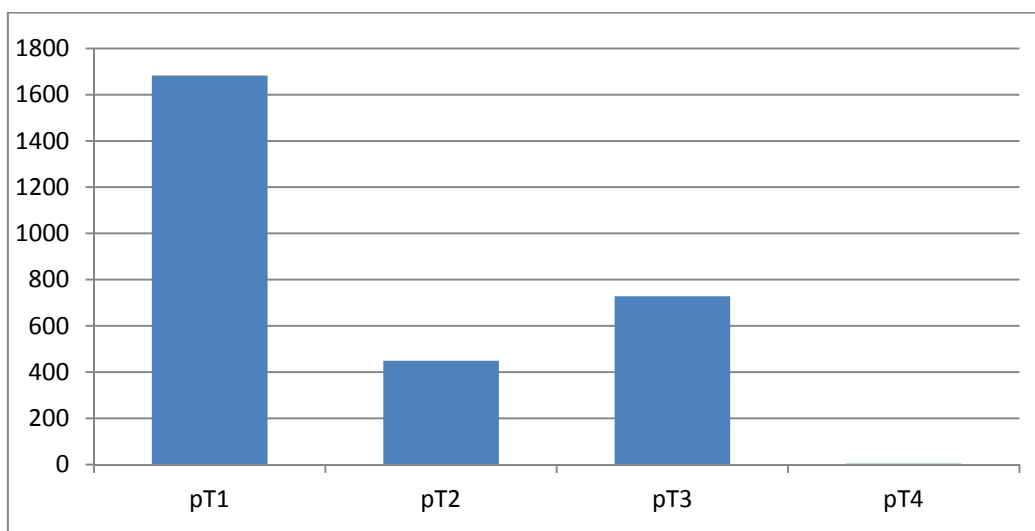
Valutando invece la frequenza delle differenti varianti del carcinoma papillare della tiroide 1191 (41%) erano microPTC, 657 (23%) variante classica, 795 (28%) variante follicolare, 142 (5%) variante a cellule alte, 79 (3%) altre varianti (es. variante solida, trabecolare, etc). (Figura 14)



**Figura 14:** Distribuzione delle diverse varianti di PTC all'interno del campione di 2864 pazienti.

I carcinomi sono inoltre stati stadiati secondo la più recente classificazione TNM [American Joint Commission on Cancer (AJCC)-Union Against Cancer (UICC)] . Sulla base del modello di stadiazione TNM, i 2864 carcinomi papillari sono così distribuiti: (Figura 15)

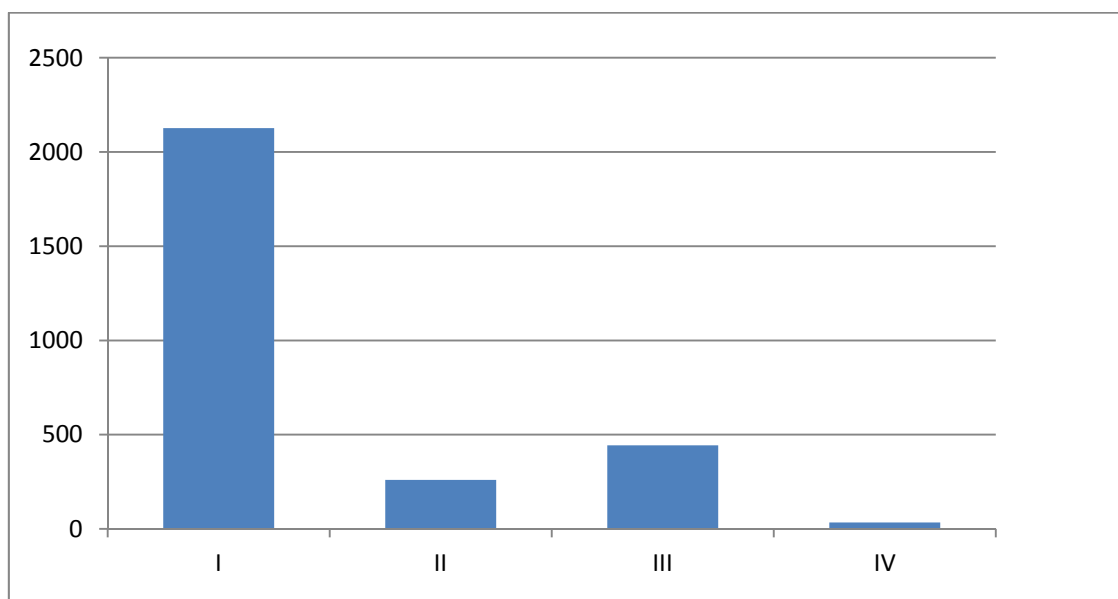
- 1683 pT1 (pT1a 976; pT1b 707) (59%)
- 449 pT2 (16%)
- 728 pT3 (25%)
- 4 pT4 (0,15%)



**Figura 15: Rappresentazione grafica della distribuzione della casistica tra gli stadi pT del sistema classificativo TNM. Campione 2864 pazienti.**

In base agli stadi proposti dall'AJCC troviamo: (Figura 16)

- 2127 Stadio I ( 75%)
- 260 Stadio II ( 9%)
- 443 Stadio III ( 15%)
- 34 Stadio IV ( 1%)



**Figura 16:** Rappresentazione grafica della distribuzione della casistica tra i vari stadi proposti dall'AJCC per la stadiazione del carcinoma tiroideo. Campione 2864 pazienti.

Tutti i pazienti inclusi nello studio hanno fornito il proprio consenso informato al trattamento dei dati personali per l'esecuzione dello stesso.

### Analisi delle mutazioni di BRAF

La ricerca delle mutazioni di BRAF è stata eseguita mediante l'esecuzione di PCR a singolo filamento e sequenziamento del DNA secondo le metodiche standard che provvederò a descrivere rapidamente.

### Microdissezione ed estrazione del DNA

Per prima cosa sono state eseguite una serie di dissezioni di 5 µm di spessore a partire dai preparati in formalina per l'analisi istologica su vetrino e per l'estrazione del DNA. Per procedere alle successive procedure è necessario rimuovere completamente la paraffina che include il tessuto attraverso un

processo che consiste nell'immersione dei vetrini in xilolo ("sparaffinatura"). Fatto ciò, occorre reidrattare il tessuto immergendolo in soluzioni di etanolo a concentrazione decrescente (99%, 95%, 70%, 50%) e infine in acqua.

Il tessuto privo di paraffina viene disseccato, cioè "grattato" con un ago sottile in modo da rimuovere dalla superficie del vetrino la regione di tessuto che contiene la maggior concentrazione di cellule tumorali, generalmente comprese tra 250 e 500. Questa regione viene appositamente identificata dagli anatomopatologi che, visualizzando al microscopio il corrispondente vetrino colorato (secondo la colorazione ematossilina-eosina), individuano la parte che deve essere raschiata.

I passaggi successivi prevedono l'impiego di un kit commerciale, il QIAamp DNA mini kit (QIAGEN). La sezione di tessuto ottenuta con la sopramenzionata tecnica di microdissezione manuale viene sottoposta a digestione a 56° C con proteinasi K, un enzima che digerisce le membrane delle cellule, compresa quella nucleare, e le proteine intracellulari. Il tempo di digestione minimo è di tre ore. Dopo la digestione con proteinasi K, viene aggiunto 200 µl di buffer specifico e il campione viene sottoposto alla digestione finale a 70° C per dieci minuti. Successivamente all'aggiunta di 200 µl di etanolo (100%) il campione viene trasferito in apposite colonnine fornite dal kit per essere sottoposto ad una serie di centrifugazioni e lavaggi con buffer specifici. In particolar modo vengono utilizzati 500 µl di buffer AW1 e 500 µl di buffer AW2 in alternanza a centrifugazioni della durata di 1-2 minuti a velocità di 8000-13000 rpm. Il passaggio finale prevede l'eluizione del DNA utilizzando 30-35 µl di buffer AE, l'incubazione per un minuto e la centrifugazione a 8000 rpm (45).

## **Amplificazione mediante PCR, identificazione dei profili genici mutati e sequenziamento**

Le mutazioni di BRAF sono state ricercate mediante l'amplificazione dell'esone 15 secondo una procedura PCR standard. Il DNA precedentemente isolato è stato usato come campione in un preparato per PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, 8 pmol of amplimers, and 1.25 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase).

I primers per l'esone 15 di BRAF sono i seguenti:

- **forward:** 5'-TCCTTTACTTACTACACCTCAGAT-3'
- **reverse:** 5'-AGTGGAAAATAGCCTCAAT-3'.

Sono stati quindi eseguiti una serie di cicli prestabiliti dalla metodica. Un primo ciclo iniziale di denaturazione (94 C, 5 min) quindi altri 35 cicli (denaturazione, 94 C per 40 secondi; *annealing*, 55 C per 40 sec; sintesi, 72 C per 40 sec), seguiti da una estensione finale della durata di 5 min a 72 C.

Una volta che il DNA del gene BRAF è stato amplificato con metodica PCR occorre valutare la presenza di eventuali mutazioni e quindi identificarle. Per fare ciò esistono numerose tecniche, quella attualmente più utilizzata e che offre i risultati migliori è rappresentata dalla "High Resolution Melting Analysis" (HRMA). Questa tecnica permette una visualizzazione in tempo reale dei vari "profili genici" permettendo un'analisi immediata rispetto al wild-type ovvero non-mutato. Non appena viene identificato un gene alterato si procede al sequenziamento secondo la classica tecnica di Sanger che permette di identificare il singolo nucleotide ( o più nucleotidi) mutato. (45)

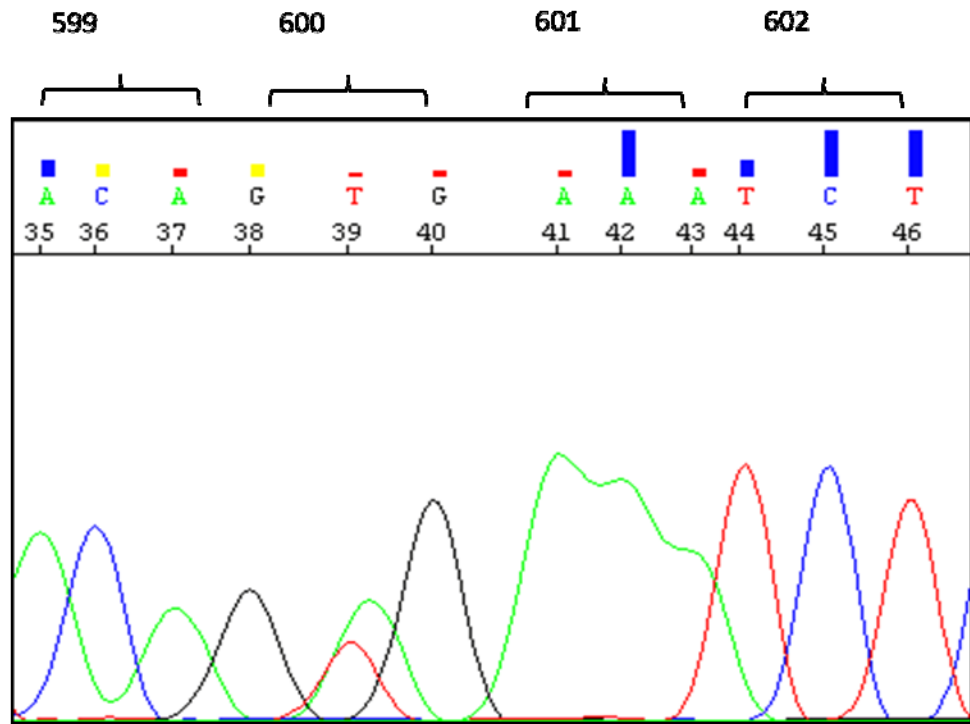


Figura 17 : Grafico ottenuto mediante HRMA della mutazione V600E del gene BRAF.



## **Analisi statistica**

Per le finalità del nostro studio abbiamo eseguito una serie di analisi statistiche sia univariate che multivariate. Innanzitutto abbiamo applicato un test del  $\chi^2$  per valutare le differenze tra le variabili nei diversi gruppi. Il P value è stato determinato con un intervallo di confidenza del 95% e i test sono stati svolti senza l'applicazione della correzione di Yates data l'elevata frequenza attesa. L'Odds ratio è stato eseguito per valutare l'associazione tra i differenti gruppi e per valutare se ci potesse essere un rapporto di causalità tra diverse variabili. Non escludiamo di affinare ulteriormente l'analisi statistica con analisi multivariate quando avremo i dati definitivi dello studio.

## **Risultati**

### **Casistica generale**

Nel nostro campione di 2864 pazienti, la mutazione di BRAF è stata ritrovata in 1155 (40%) casi. Nei restanti 1709 (60%) non si è riscontrata alcuna alterazione. (Figura 18) *Nota: tutte le figure e tabelle della sezione "risultati" sono raccolte dopo le conclusioni.*

Come atteso la mutazione più frequentemente trovata è stata la V600E, reperita in 1105 (96%) casi. La seconda mutazione più frequente è stata la K601E trovata in 40 (3%) casi. Altre mutazioni del gene BRAF sono state riscontrate in 10 (< 1%) pazienti. (Figura 19)

A questo punto abbiamo valutato la ricorrenza della mutazione di BRAF nelle differenti varianti del carcinoma papillare per vedere se ci fosse una qualche correlazione. Nel microPTC su un totale di 1191 casi 502 (42%) risultavano mutati, mentre 689 (58%) non lo erano. Dei 657 carcinomi a variante classica 416 (63%) erano mutati mentre 241 (37%) non lo erano. Nella variante follicolare

(totale 795) abbiamo riscontrato 113 (14%) mutati e 682 (86%) non mutati. Su un totale di 142 carcinomi a cellule alte 116 (82%) erano mutati mentre 26 (18%) non lo erano. Infine nei 79 carcinomi etichettati come "altri", 8 (10%) presentavano la mutazione mentre 71 (90%) non la presentavano. P value < 0,0001. ( Tabella 12. Figura 20)

Abbiamo iniziato quindi ad analizzare se ci fosse una correlazione tra la mutazione di BRAF e tutta una serie di aspetti, dapprima epidemiologici (sesso ed età) e quindi istopatologici.

Valutando la correlazione della mutazione di BRAF con il sesso, abbiamo trovato che su 727 casi nel sesso maschile 295 (40%) risultavano mutati e 432 (60%) non lo erano. Su un totale di 2137 casi nel sesso femminile 860 (40%) presentavano la mutazione di BRAF mentre 1277 (60%) non erano mutati. P value = 0,87. OR=1,01 (IC 0,85-2,20). (Tabella 13. Figura 21)

Valutando invece la correlazione tra mutazione di BRAF ed età di insorgenza del carcinoma, si è trovato che i carcinomi che esprimono la mutazione hanno un'età di insorgenza media di  $44,6 \pm 14$  mentre quelli che non la presentano un'età media di  $45,5 \pm 14$ . P value < 0,03.

Quanto invece alla correlazione tra BRAF mutato e le dimensioni del carcinoma abbiamo riscontrato che nelle forme mutate la dimensione media era di  $14,4 \text{ mm} \pm 9,8 \text{ mm}$  mentre nei non mutati era di  $17,3 \text{ mm} \pm 14,1 \text{ mm}$ . P value < 0,004.

Si è passati quindi a valutare la correlazione tra BRAF V600E e una serie di aspetti istopatologici. Innanzitutto abbiamo osservato che su 1634 carcinomi unifocali 604 (37%) presentavano la mutazione di BRAF mentre 1030 (63%) non erano mutati. Mentre tra i 1230 carcinomi multifocali 551 erano mutati (45%) mentre 679 (55%) non lo erano. P value < 0,0001. OR=1,38 (IC 1,19-1,61). (Tabella 14. Figura 22)

Per quanto riguarda invece la correlazione con la presenza o meno di capsula, si è trovato che su 1675 carcinomi non capsulati 871 (52%) esprimevano la mutazione di BRAF mentre 804 (48%) non la esprimevano. Tra 1189 carcinomi capsulati la mutazione di BRAF era presente in 284 (24%) mentre mancava in 905 (76%). P value < 0,001. OR=3,45 (IC 2,93-4,07). (Tabella 15. Figura 23)

Passando alla valutazione dell'invasione extratiroidea su 603 carcinomi che presentavano invasione 378 (63%) erano mutati mentre 225 (37%) non lo erano. Nei 2261 carcinomi confinati alla ghiandola invece 777 (34%) presentavano mutazione di BRAF mentre 1484 (66%) non la presentavano. P value < 0.001. OR=3,21 (IC 2,66-3,87). (Tabella 16. Figura 24)

Siamo andati quindi a valutare la correlazione tra la mutazione di BRAF e la presenza di metastasi linfonodali. Dei 321 carcinomi metastatici 193 (60%) esprimevano mutazioni di BRAF mentre 128 (40%) non erano mutati. Nei restanti 2543 carcinomi privi di metastasi linfonodali BRAF mutato ricorreva in 962 (38%) mentre in 1581 (62%) era assente. P value < 0.0001. OR = 2,48 (IC 1,95-3,14). (Tabella 17. Figura 25)

Dopo aver analizzato le correlazioni tra BRAF mutato e diverse caratteristiche istopatologiche abbiamo indagato se ci fossero correlazioni tra le mutazioni di BRAF e lo stadio in cui il carcinoma si presentava al momento della diagnosi.

In base alla classificazione TNM dei 2132 carcinomi diagnosticati in T1 e T2 754 (35%) esprimevano la mutazione di BRAF mentre 1378 (65%) non la esprimevano. Tra i 732 diagnosticati in T3 e T4 401 (55%) presentavano BRAF mutato mentre 331 (45%) no. P value < 0,0001. OR= 2,26 (IC 1,85-2,76).

In base alle linee guida dell'AJCC, dei 2387 carcinomi in stadio I e II la mutazione di BRAF ricorreva in 883 (37%), mentre non era presente nei restanti 1504 (63%) casi. Nei 477 casi stadiati in fase III o IV, 272 (57%) presentavano

BRAF mutato mentre 205 (43%) non lo esprimevano. P value < 0,0001; OR= 2,26 (IC 1,85-2,76). (Tabella 18. Figure 26 e 27)

### **Casistica “low-risk”**

È stato quindi selezionato all’interno della casistica totale un sottogruppo di pazienti che presentavano le caratteristiche anatomopatologiche necessarie per rientrare nella definizione di “low risk” secondo quelle che sono le linee guida internazionali. Come già detto, esse comprendono:

- Nessuna metastasi né locale né a distanza;
- Margini di escissione chirurgica della neoplasia indenni;
- Nessun segno di invasione locale;
- Nessuna istologia aggressiva (es. cellule alte o colonnari) o segni di invasione vascolare;

Oltre a questi criteri strettamente istopatologici le linee guida prevedono come criterio necessario per il “low risk” anche nessun segno di captazione di radioiodio al di fuori del letto tiroideo alla prima scintigrafia total-body (WBS) eseguita dopo l’intervento.

In questo sottogruppo abbiamo quindi incluso 1798 casi pari quindi al 63% del totale. Andando a valutare in modo più dettagliato le caratteristiche anatomopatologiche di questi carcinomi abbiamo trovato che 1024 (57%) presentavano una capsula ben evidente, 619 (34%) non erano capsulati mentre 155 (9%) presentavano segni di invasione della capsula tiroidea senza oltrepassarla. Il superamento della capsula tiroidea avrebbe ovviamente determinato l’esclusione del carcinoma dalla categoria low-risk. (Figura 28)

Abbiamo quindi valutato se ci fosse una correlazione tra queste caratteristiche e l'espressione di BRAF mutato. Nei 1798 casi la mutazione di BRAF V600E si riscontrava in 495 (28%) carcinomi. (Figura 29)

Nei 1024 carcinomi capsulati la mutazione di BRAF ricorreva in 192 (19%) casi mentre 832 (81%) non la presentavano; nei 619 carcinomi non capsulati BRAF mutato ricorreva in 211 (34%) mentre non era presente nei restanti 408 (66%); nei 155 carcinomi con invasione della capsula tiroidea la mutazione di BRAF ricorreva in 92 casi (59%) mentre era assente nei restanti 63 (41%) .  $P \text{ value} < 0,0001$ .  $OR = 2,79$  (IC 2,25-3,45). *Nota: Per rendere l'analisi statistica più semplice abbiamo calcolato il P value e l'OR suddividendo il campione in capsulati e non capsulati.* (Tabella 19. Figura 30)

A questo punto abbiamo analizzato quale fosse la distribuzione delle differenti varianti di carcinoma papillare nella sottocasistica valutando se ci fosse una correlazione con la mutazione di BRAF. Nei 1798 casi "low-risk" 820 (46%) erano microPTC, 633 (35%) variante follicolare, 299 (17%) variante classica mentre i restanti 46 (2%) casi erano inclusi nella categoria "altri". Da notare come in questa sottocasistica scompaia la variante a cellule alte. Essa infatti rappresenta una di quelle istologie aggressive che determinano l'esclusione dal gruppo "low-risk". (Figura 31)

Andando quindi a valutare la correlazione tra BRAF mutato e le differenti varianti abbiamo trovato che negli 820 microPTC la mutazione di BRAF ricorreva in 267 (32%) casi mentre non era presente nei restanti 553 (68%). Nei 633 carcinomi a variante follicolare BRAF mutato si riscontrava in 56 (9%) casi mentre era assente nei restanti 577 (91%); nei 299 carcinomi variante classica la mutazione di BRAF si riscontrava in 168 (56%) casi mentre era assente nei restanti 131 (44%). Infine nei 46 carcinomi etichettati come "altri" BRAF mutato era presente in 4 (9%) casi mentre era assente nei restanti 42 (91%).  $P \text{ value} < 0,001$ . (Tabella 20. Figura 32)

### **Casistica “very low risk”**

Il nostro interesse si è quindi rivolto a un gruppo ancora più selezionato di pazienti. Questi pazienti rientrano in quella categoria che possiamo definire a bassissimo rischio (“very low risk”) ovvero quei pazienti che oltre ad avere tutte le caratteristiche del “low risk” presentano una variante istologica di tipo follicolare. Ai 633 carcinomi “low risk” variante follicolare abbiamo aggiunto 339 carcinomi classificati inizialmente come microPTC ma che ad un’attenta analisi istologica presentavano caratteristiche evidenti ed inequivocabili di variante follicolare, per un totale complessivo di 972 casi. Siccome è nostro interesse valutare l’espressione di BRAF in una categoria selezionata di pazienti che rispondono a tutte le caratteristiche, anatomopatologiche e cliniche di “low-risk” al momento attuale disponiamo dei dati della WBS soltanto in 521 pazienti. Di questi 521 pazienti, 499 presentano una captazione di radioiodio unicamente nel letto tiroideo mentre i restanti 22 hanno captazioni anche in sedi differenti e pertanto vengono esclusi dal “low-risk” e dalla nostra successiva analisi.

Di questi 499 pazienti (359 femmine, 140 maschi; età 45 anni  $\pm 12,9$ ; dimensioni medie tumorali 13,3 mm  $\pm 9,7$ ) 286 (57%) presentavano un carcinoma unifocale mentre 213 (43%) un carcinoma multifocale. In 382 (76%) casi il carcinoma era capsulato mentre nei restanti 117 (24%) ne era privo. Quanto all’invasione della capsula tiroidea 14 (3%) presentavano invasione capsulare mentre 485 (97%) non la presentavano. (Figura 33)

A questo punto si è valutata la presenza di mutazioni di BRAF all’interno di questo gruppo analizzando se vi fossero correlazioni con una serie di aspetti epidemiologici ed istologici. Nei 499 casi selezionati 79 (16%) erano mutati mentre 420 (84%) non lo erano. (Figura 34)

Si è quindi iniziato a valutare se vi fosse una correlazione tra mutazione di BRAF e il sesso. Nei 359 pazienti di sesso femminile BRAF mutato era presente

in 54 (15%) casi mentre non era presente nei restanti 305 (85%). Nei 140 pazienti di sesso maschile BRAF mutato ricorreva in 25 (18%) casi mentre era assente nei restanti 115 (82%). P value = 0,4; OR=1,23 (IC 0,73-2,07) (Tabella 21. Figura 35)

Valutando invece l'eventuale correlazione tra la mutazione di BRAF e l'età alla diagnosi si è trovato che nei mutati l'età media è di  $44,9 \pm 12,9$  anni mentre tra i non mutati è di  $45 \pm 12,9$  anni. P= 0,9.

Spostandoci sugli aspetti più strettamente anatomopatologici abbiamo valutato inizialmente la correlazione tra BRAF mutato e la multifocalità del carcinoma. Su un totale di 286 carcinomi unifocali 42 (15%) erano mutati mentre 244 (85%) non lo erano. Tra i 213 carcinomi multifocali invece 37 (17%) presentavano la mutazione di BRAF mentre 176 (83%) non la esprimevano. P value = 0,4. OR= 1,22 (IC 0,75-1,98) (Tabella 22. Figura 36)

Andando ad analizzare la correlazione tra mutazione di BRAF e presenza di capsula tumorale abbiamo trovato che dei 382 carcinomi capsulati 49 (13%) erano mutati mentre 333 (87%) non lo erano. Dei 117 carcinomi non capsulati 30 (26%) presentavano la mutazione di BRAF mentre 87 (74%) non la esprimevano. P value < 0,001. OR=2,34 (IC 1,40-3,91) (Tabella 23. Figura 37)

Si è quindi valutata la correlazione tra BRAF mutato e presenza di invasione della capsula tiroidea. Su 14 carcinomi che invadevano la capsula tiroidea 5 (36%) presentavano la mutazione di BRAF mentre 9 (64%) non la presentavano. Su 485 carcinomi che non presentavano invasione della capsula tiroidea 74 (15%) esprimevano la mutazione di BRAF mentre 411 (85%) non la presentavano. P value < 0,007. OR=3,09 (IC 1,01-9,47). (Tabella 24. Figura 38)

Passando quindi alla correlazione tra mutazione di BRAF e dimensioni tumorali si è trovato che nei mutati la dimensione media è di  $14,2 \pm 8,1$  mm mentre nei non mutati di  $18 \pm 9,7$  mm. P < 0,001.

Al fine di una migliore analisi statistica abbiamo suddiviso i carcinomi in due sottogruppi a seconda se superavano o meno il centimetro. Dei 116 carcinomi sottocentimetrici la mutazione di BRAF ricorreva in 26 (22%) mentre era assente nei restanti 90 (78%). Nei 383 carcinomi sovracentimetrici BRAF V600E era presente in 53 (14%) mentre era assente nei restanti 330 (86%).  $P < 0,0026$ .  $OR=1,80$  (IC 1,07-3,04) (Tabella 25. Figura 39)

A questo punto abbiamo analizzato se ci fosse un'eventuale correlazione tra la mutazione di BRAF e lo stadio pT della stadiazione TNM. Ovviamente per essere "low-risk" il carcinoma tiroideo può appartenere unicamente al pT1 o al pT2. Dei 336 casi stadiati come pT1 la mutazione di BRAF ricorreva in 64 (19%) casi mentre non era presente nei restanti 272 (81%). Dei 163 casi stadiati invece come pT2, la mutazione di BRAF era presente in 15 (9%) casi mentre era assente nei restanti 148 (91%).  $P \text{ value} = 0,005$ .  $OR= 2,32$  (IC 1,28-4,22) (Tabella 26. Figura 40)

Infine abbiamo cercato se ci fosse una correlazione tra BRAF mutato e la stadiazione secondo le linee guida AJCC. Anche in questo caso per essere low-risk si prendono in considerazione unicamente lo stadio I e II della suddetta classificazione. Dei 402 carcinomi in stadio I, la mutazione di BRAF ricorreva in 70 (17%) mentre era assente nei restanti 332 (83%). Dei 97 carcinomi in stadio II presentavano la mutazione di BRAF 9 (9%), mentre era assente nei restanti 88 (91%).  $P \text{ value} = 0,049$ .  $OR=2,06$  (IC 0,99-4,29) (Tabella 27. Figura 41)



## Discussione

Il nostro studio si è concentrato innanzitutto sulla valutazione dell'espressione della mutazione di BRAF all'interno di una casistica molto ampia, composta da 2864 pazienti. I nostri risultati confermano sostanzialmente quanto già era stato dimostrato, ovvero una ricorrenza di BRAF mutato in circa il 40% dei PTC. Occorre dire che rispetto alla storica review di Xing sulla frequenza di BRAF, ormai datata 2005, i nostri valori sono leggermente inferiori di circa il 4%. (38) Ammettendo che questa differenza possa essere significativa, occorre notare come in quella review venissero presi in considerazione 29 differenti studi eseguiti in tutto il mondo e che complessivamente i carcinomi papillari valutati fossero 1856, circa un terzo in meno rispetto a quelli analizzati in questo studio. Tuttavia non è possibile escludere in modo assoluto che una certa variabilità della mutazione di BRAF possa essere influenzata da fattori ambientali.

In totale sintonia con le conoscenze pregresse è invece la frequenza della mutazione BRAF V600E. Anche nel nostro studio questa mutazione rende conto della quasi totalità delle mutazioni di BRAF (96%). (15)

Andando quindi ad analizzare la distribuzione della mutazione di BRAF nelle differenti varianti del carcinoma papillare si è osservato che questa mutazione interessa principalmente la variante classica (63%) e quella a cellule alte (82%) mentre è assai più rara nella variante follicolare (14%) (Figura 20).

Rispetto a recenti studi che hanno valutato la distribuzione di BRAF mutato nelle diverse varianti il nostro studio evidenzia un'incidenza leggermente maggiore nella variante classica e a cellule alte e una frequenza minore nella variante follicolare. (5) (38)

Le attuali conoscenze cliniche hanno messo in luce come la variante follicolare del carcinoma papillare sia caratterizzata da un decorso particolarmente indolente. Si può pertanto pensare che già questa distribuzione di BRAF possa

essere una prova a sostegno del comportamento aggressivo della mutazione. Molto interessante è notare come nella variante microPTC che rappresenta la manifestazione di gran lunga più frequente del PTC, l'incidenza di BRAF si attesti su valori intermedi tra le varianti più aggressive e la variante follicolare. Occorre ricordare che la variante microPTC non è una reale variante di carcinoma papillare; essa è figlia da un lato delle difficoltà di comprendere la reale istologia di lesioni inferiori ai 10mm e dall'altro del notevole miglioramento delle tecniche diagnostiche che permettono una diagnosi sempre più precoce dei noduli tiroidei. Attualmente tuttavia con il miglioramento delle indagini istologiche è spesso possibile identificare in modo certo la variante istologica anche in carcinomi di dimensioni inferiori ai 10 mm.

Anche i nostri dati confermano che non vi è alcun tipo di correlazione tra la mutazione di BRAF e il sesso. Nella nostra casistica la frequenza di BRAF mutato è pressoché identica nei due sessi. Altri studi hanno dimostrato come anche altri importanti oncogeni (RET/PTC, PI3K, etc) coinvolti nel carcinoma tiroideo non correlino con il sesso. L'incidenza notevolmente più elevata del carcinoma tiroideo nel sesso femminile non è pertanto spiegabile con una differente espressione di specifici oncogeni ma, come è stato già ampiamente ipotizzato, potrebbe essere legata a fattori ormonali.(15).

Nel nostro studio è stata invece trovata una correlazione significativa tra la mutazione di BRAF e l'età della diagnosi del carcinoma. I carcinomi mutati vengono diagnosticati in media un anno prima rispetto a quelli non mutati ( 44,6 versus 45,5). Questa differenza potrebbe anch'essa rappresentare un indicatore della maggiore aggressività dei carcinomi mutati rispetto a quelli non mutati. Probabilmente un carcinoma più aggressivo tende a presentare prima caratteristiche sospette che possono indirizzare a una valutazione più dettagliata e a una sua diagnosi. Sicuramente questa correlazione merita una

valutazione più approfondita, mediante magari l'integrazione con altri dati strettamente clinici.

Il punto cruciale della prima parte dello studio è stato la valutazione della correlazione tra BRAF mutato e una serie di caratteristiche anatomopatologiche indicative di aggressività. Si è pertanto cercato se vi fosse una correlazione tra BRAF mutato e la multifocalità della lesione, l'assenza di una capsula tumorale, l'invasione dei tessuti extratiroidi e la presenza di metastasi linfonodali. Su ciascuno di questi aspetti esiste un'ampia letteratura a sostegno della prognosi peggiore dei tumori con queste caratteristiche. (21)

Come riassunto nella tabella 27 e nella figura 41 la presenza della mutazione di BRAF correla significativamente con tutti gli aspetti indicativi di aggressività. BRAF mutato si ritrova nel 45% dei carcinomi multifocali, nel 52% dei carcinomi non capsulati, nel 63% dei carcinomi che invadono i tessuti circostanti e nel 60% dei carcinomi con metastasi linfonodali. Già nel 2010 presso lo stesso dipartimento era stato svolto uno studio che su una casistica di 1050 carcinomi papillari aveva valutato la correlazione tra BRAF e questi aspetti istopatologici. (5). Facendo un raffronto si osserva come i dati siano sostanzialmente sovrapponibili. Una certa variabilità è legata probabilmente al campione analizzato, circa tre volte superiore rispetto a quello del 2010.

Un aspetto sicuramente interessante da valutare è la correlazione statistica tra presenza di mutazione di BRAF e dimensioni tumorali. Sulla base dei nostri dati si è osservato che i carcinomi mutati presentano dimensioni inferiori rispetto a quelli non mutati al momento della diagnosi (14,4 mm vs 17,3 mm). Questo dato potrebbe sembrare in apparente contraddizione con quanto affermato in precedenza circa le correlazioni di BRAF mutato e i fenotipi aggressivi. In realtà analizzando dettagliatamente la letteratura sui fattori prognostici dei carcinomi differenziati della tiroide, le dimensioni tumorali sono sicuramente tra gli aspetti maggiormente discussi. Molti autori non

considerano le dimensioni tumorali come un fattore strettamente correlato all'aggressività. (6) (21) (38)

Inoltre, ampliando il ragionamento proposto in precedenza per la correlazione tra mutazione di BRAF ed età della diagnosi, si potrebbe anche pensare che un carcinoma aggressivo, diventando prima clinicamente manifesto, viene diagnosticato quando ancora è di dimensioni ridotte. Viceversa un carcinoma con un comportamento più indolente potrebbe accrescersi maggiormente prima di rendersi clinicamente manifesto.

Tutte le considerazioni fatte sulla correlazione di BRAF mutato e aggressività tumorale trovano un'ulteriore conferma nella valutazione della frequenza di BRAF nei vari stadi classificativi proposti dal sistema TNM e dell'AJCC. La maggior parte dei carcinomi differenziati tiroidei viene generalmente diagnosticata in una fase molto precoce (pT1 e pT2) dato il comportamento complessivamente indolente di questi carcinomi. Tuttavia è possibile osservare come la mutazione di BRAF aumenti in modo sensibile passando dal 35% nei carcinomi in pT1/pT2 ad oltre il 65% nei carcinomi in pT3 e pT4. Questo ovviamente non ci stupisce. La classificazione TNM classifica come pT3 un carcinoma differenziato della tiroide di dimensioni superiori ai 4 cm o di qualsiasi dimensione che presenta tuttavia un'invasione minima extratiroidea; mentre come pT4 qualsiasi carcinoma tiroideo con chiara invasione dei tessuti ed organi circostanti. L'invasione dei tessuti extratiroidei rappresenta uno dei parametri che abbiamo valutato in precedenza e per i quali abbiamo dimostrato un'elevata correlazione con il BRAF mutato.

Discorso analogo può essere fatto anche con la stadiazione AJCC. Lo stadio I e II sono caratterizzati da carcinomi di piccole dimensioni che non presentano né metastasi linfonodali né invasione extratiroidea. Gli stadi III e IV riguardano invece tumori di grosse dimensioni (> 4 cm), con segni di invasione extratiroidea o con metastasi linfonodali o a distanza. Andando a vedere come

correla la mutazione di BRAF in questo modello stadiativo osserviamo un notevole incremento della mutazione dagli stadi I e II dove è espressa nel 37% dei casi agli stadi III e IV dove è espressa nel 57%. Questa analisi sulla correlazione tra BRAF mutato e stadiazione dei carcinomi tiroidei permette anche di fare una considerazione aggiuntiva. Le stadiazioni nascono come sistemi per raggruppare i pazienti in classi di rischio quanto più possibili omogenee al fine di ottimizzare il trattamento e avere una stima della possibile prognosi, in termini di mortalità e morbilità. La stretta correlazione tra BRAF mutato e stadi avanzati del carcinoma tiroideo può anche essere letta come un aumentato rischio per quei pazienti che esprimono questa mutazione rispetto a quelli che non la esprimono. In letteratura sono già presenti alcuni studi che correlano direttamente la mutazione di BRAF con un incremento della mortalità e se questo fosse ulteriormente confermato potrebbe essere necessaria una rivalutazione delle terapie in questo gruppo di pazienti. (43)

Dopo aver terminato l'analisi di tutti questi aspetti legati alla mutazione di BRAF nel campione di 2864 carcinomi papillari, abbiamo deciso di valutare il comportamento e le eventuali correlazioni di BRAF in un gruppo selezionato di pazienti. La nostra attenzione si è rivolta verso il sottogruppo dei "low-risk" ovvero di quei carcinomi che rispondono ad una serie di criteri ben determinati e che si caratterizzano generalmente per un decorso particolarmente indolente e per una prognosi eccellente. Come già spiegato in precedenza i criteri del "low-risk" sono tutti criteri anatomopatologici fatta eccezione per il responso della WBS eseguita a un mese circa dall'intervento chirurgico. Sulla base dei dati istologici attualmente in nostro possesso abbiamo quindi selezionato un sottogruppo di 1798 pazienti sui quali abbiamo approfondito l'analisi anatomopatologica osservando se i carcinomi in questione fossero capsulati, presentassero un'invasione del tessuto tiroideo sano circostante o se vi fosse invasione, senza superamento, della capsula tiroidea. La maggioranza dei carcinomi "low risk" (57%) presenta una capsula ben determinata, il 34%

mostra segni di invasione del parenchima sano circostante e solo il 9% segni di invasione della capsula tiroidea. Se andiamo tuttavia a vedere la correlazione con il BRAF mutato, innanzitutto osserviamo che la prevalenza generale di BRAF V600E nel gruppo "low risk" è sensibilmente inferiore rispetto alla casistica generale. Si passa dal 40% al 28%. Questo dato rappresenta un'ulteriore prova a supporto dell'idea che la mutazione di BRAF conferisca aggressività ai carcinomi. Nel "low risk" infatti non troviamo i carcinomi con invasione extratiroidea, né i carcinomi con caratteristiche istologiche aggressive (es a cellule alte) né carcinomi con metastasi linfonodali, aspetti questi con cui correla strettamente BRAF mutato.

Anche nella casistica "low risk" si conferma la prevalenza di BRAF V600E principalmente nella variante classica (56%). La mutazione ricorre invece in una piccola percentuale sia dei carcinomi variante follicolare (9%) sia nella categoria etichettata come "altri" dalla quale adesso abbiamo escluso tutte le varianti istologiche aggressive. La variante microPTC mantiene sempre valori mediani rispetto alla variante follicolare e a quella classica (35%).

L'aspetto sicuramente più interessante da notare in questa casistica a basso rischio riguarda il progressivo incremento della frequenza di BRAF mutato nei carcinomi che presentano caratteristiche indicative di una maggiore aggressività. Si passa da una frequenza del 19% di BRAF mutato nei carcinomi totalmente capsulati, a una frequenza del 34% nei carcinomi con invasione del parenchima tiroideo circostante a una frequenza del 59% nei carcinomi che invadono la capsula tiroidea. (Tabella 19. Figura 30) Se questi dati fossero ulteriormente confermati in altri studi potrebbero essere sufficienti a una rivalutazione molto attenta della categoria del "low risk" in quanto la mutazione di BRAF sembrerebbe rappresentare uno dei fattori principali di progressione del carcinoma da uno stato di basso rischio a uno di rischio aumentato.

Per questo motivo abbiamo scelto di valutare in modo più dettagliato l'espressione di BRAF in una categoria ancora più selezionata di pazienti. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione su quello che possiamo definire il "very low risk", ovvero quei carcinomi che oltre ad avere tutte le caratteristiche del "low risk" appartengano alla variante follicolare che si caratterizza per un comportamento particolarmente indolente e "benigno" se paragonato alle altre varianti di PTC. (36)

In questo sottogruppo costituito da 972 carcinomi rientrano i 633 carcinomi variante follicolare più 339 microPTC che presentano inequivocabilmente caratteristiche di variante follicolare di PTC. Potrebbe sembrare contraddittorio focalizzarsi sulla variante follicolare nella quale, come abbiamo più volte ribadito, l'espressione di BRAF mutato è particolarmente rara. In realtà abbiamo deciso di partire da questo sottogruppo proprio per vedere se la mutazione di BRAF conferisca caratteristiche di aggressività anche a carcinomi con atteggiamento particolarmente indolente. Inoltre il nostro interesse per la variante follicolare è dettato anche dalle minori conoscenze che abbiamo su di essa e dalle notevoli difficoltà diagnostiche che esistono tutt'ora sul "pattern follicolare", nonché da un'assenza sostanziale di letteratura su casistiche con queste caratteristiche.

Al fine di realizzare uno studio secondo le linee guida internazionali sul "low-risk" abbiamo iniziato a raccogliere i dati relativi alla WBS. Nel momento in cui questo lavoro viene pubblicato abbiamo raccolto i dati WBS di 521 pazienti con caratteristiche "very low risk". Di questi solo 22 (2%) presentano una captazione del radioiodio al di fuori del letto tiroideo alla prima WBS e quindi non possono essere inclusi. Una captazione di radioiodio al di fuori del letto tiroideo in una percentuale così esigua rappresenta un'ulteriore prova di come in questo gruppo di pazienti il comportamento del carcinoma sia particolarmente indolente.

Il campione si riduce quindi a 499 casi. Andando a valutare le caratteristiche strettamente istologiche è possibile osservare come questi carcinomi presentino complessivamente caratteristiche indicative di scarsa aggressività, come una manifestazione unifocale nel 57% dei casi, una capsula ben delimitata nel 76% dei casi e l'assenza di invasione della capsula tiroidea nel 97% dei casi.

Abbiamo quindi valutato quale fosse la frequenza di mutazione di BRAF in questa casistica "very low risk" e come immaginato abbiamo riscontrato una frequenza nettamente inferiore (13%) sia alla casistica generale (40%), che a quella "low risk" (28%).

Come nella casistica iniziale non è stata trovata alcuna correlazione tra la mutazione di BRAF e il sesso; a differenza della casistica iniziale invece non è stata rinvenuta alcuna correlazione statisticamente significativa tra mutazione di BRAF ed età della diagnosi. Sulla base dei dati attualmente in nostro possesso, ancora parziali, risulta difficile fare delle ipotesi su questa differenza.

Spostandoci sugli aspetti anatomopatologici l'osservazione sicuramente più interessante è la stretta correlazione statisticamente significativa tra mutazione di BRAF ed assenza della capsula tumorale (26%) e tra la mutazione di BRAF e l'invasione della capsula tiroidea (36%). Inoltre come nella casistica generale anche in quella "very low risk" si è trovata una correlazione inversa tra la mutazione di BRAF e le dimensioni del carcinoma al momento della diagnosi. Questo si rispecchia anche nell'apparente paradosso per cui BRAF mutato è più frequentemente riscontrato nei carcinomi pT1 che nei carcinomi pT2 della classificazione TNM. In realtà basta ricordare che la differenza tra un pT2 e un pT1 risiede esclusivamente nelle differenti dimensioni del carcinoma.

Se il ragionamento proposto in precedenza fosse corretto, si potrebbe pensare che anche nei carcinomi particolarmente indolenti la mutazione di BRAF



determini un comportamento più aggressivo con una diagnosi posta anche più precocemente.

## Conclusioni, criticità, prospettive future.

Sulla base di quanto discusso in precedenza possiamo trarre alcune conclusioni:

1. La mutazione di BRAF conferisce un comportamento particolarmente aggressivo ai PTC che la esprimono. Questa aggressività si manifesta con una serie di caratteristiche istopatologiche ben definite quali l'assenza di una capsula, la presenza di invasione del parenchima circostante, l'estensione ai tessuti extratiroidici, la presenza di metastasi linfonodali e la presenza di lesioni multiple.
2. Quanto affermato al punto precedente è probabilmente vero anche in quelle casistiche considerate a basso rischio o a bassissimo rischio. La mutazione di BRAF conferisce anche a questi tumori un comportamento più aggressivo rispetto ai corrispettivi non mutati.

Queste conclusioni invitano sicuramente ad approfondire ulteriormente il ruolo prognostico di BRAF nei carcinomi papillari e ad un'attenta rivalutazione delle casistiche definite a basso rischio. Se questi dati venissero ulteriormente confermati potrebbe rivelarsi necessario un'integrazione della categoria "low-risk", magari con criteri di biologia molecolare.

Chiaramente queste ipotesi necessitano di ulteriori verifiche che possono derivare unicamente da una valutazione sul medio lungo periodo dei pazienti con espressione di BRAF mutato. È importante ricordare che complessivamente i carcinomi tiroidei godono di una prognosi ottima, se paragonata a quella di altre neoplasie maligne. I tempi di osservazione sono quindi molto lunghi. Se la sostanziale carenza di un riscontro clinico immediato è il principale limite a questo studio, allo stesso tempo rappresenta anche un'interessante prospettiva futura. Oltre a completare la valutazione della casistica "very low risk" sarebbe interessante valutare a 5 anni e poi a 10 anni la correlazione tra BRAF mutato e una serie di aspetti clinici quali la recidiva di malattia, la comparsa di metastasi

linfonodali, la comparsa di metastasi a distanza, la risposta alle terapie, lo sviluppo di complicanze legate ai trattamenti. Tutte queste informazioni potrebbero contribuire non solo a una conoscenza più dettagliata della biologia molecolare dei carcinomi tiroidei ma altresì fornire utilissimi strumenti per una stadiazione più accurata e una terapia mirata più efficace e risolutiva.

In ambito chirurgico ad esempio si sta valutando da tempo la possibilità di un trattamento diversificato tra i microPTC esprimenti BRAF e quelli non mutati. Alcuni autori hanno ipotizzato per esempio un intervento chirurgico conservativo per i microPTC non mutati per BRAF e una tiroidectomia totale per quelli mutati. Diversi studi avrebbero infatti dimostrato un notevole aumento del rischio di recidiva sul lobo tiroideo conservato nei microPTC esprimenti BRAF V600E. (46)

Le prospettive terapeutiche non sono soltanto legate alla terapia chirurgica. Gli studi di biologia molecolare potrebbero fornire ulteriori elementi per valutare il beneficio della terapia radiometabolica successiva all'intervento. Come spiegato in precedenza, attualmente la maggior parte dei carcinomi tiroidei rientrano in una classe di rischio per la quale non si dispone di un consenso unanime circa l'effettiva utilità di terapia con radioiodio.

Oltre a questi aspetti è interessante ricordare che lo sviluppo di farmaci cosiddetti "biologici", diretti su target molecolari ben precisi rappresenta uno dei principali campi di ricerca e investimento della farmacologia contemporanea. Attualmente esistono già diverse molecole in grado di inibire l'attivazione incontrollata di BRAF mutato. Studi di fase 3 starebbero dimostrando un netto miglioramento della prognosi in pazienti con carcinomi tiroidei avanzati e refrattari alla terapia convenzionale trattati con sorafenib, molecola fino ad ora usata nel trattamento dei carcinomi renali ed epatici. Altre molecole sono in fase di sperimentazione. (47)

Queste terapie potrebbero rappresentare la prospettiva terapeutica più importante nel trattamento di quei carcinomi particolarmente aggressivi esprimenti BRAF V600E, aprendo così una nuova era nel trattamento dei carcinomi tiroidei.

## Figure e tabelle

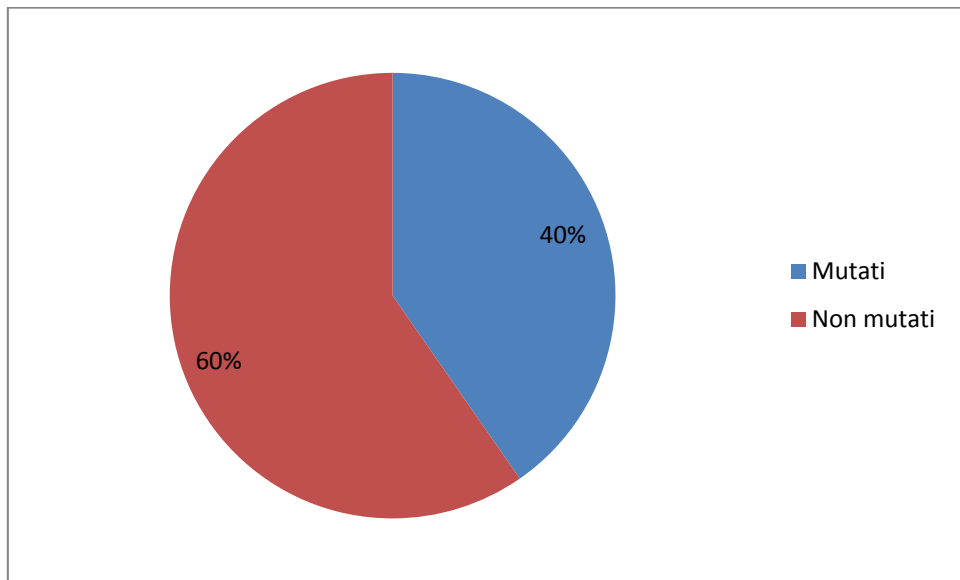


Figura 18: Rappresentazione grafica della frequenza percentuale della mutazione di BRAF. Campione 2864 pazienti.

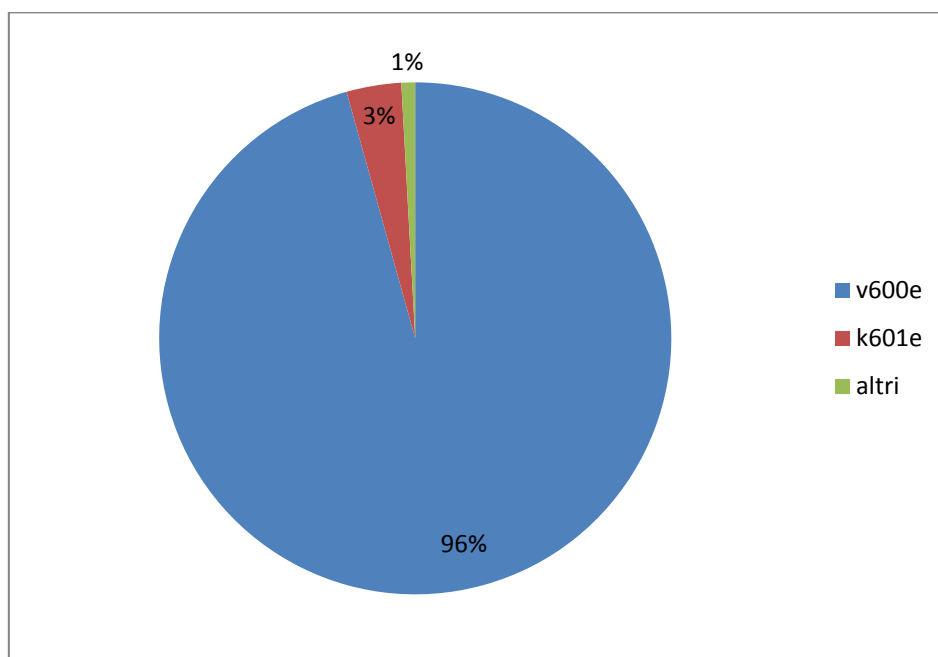
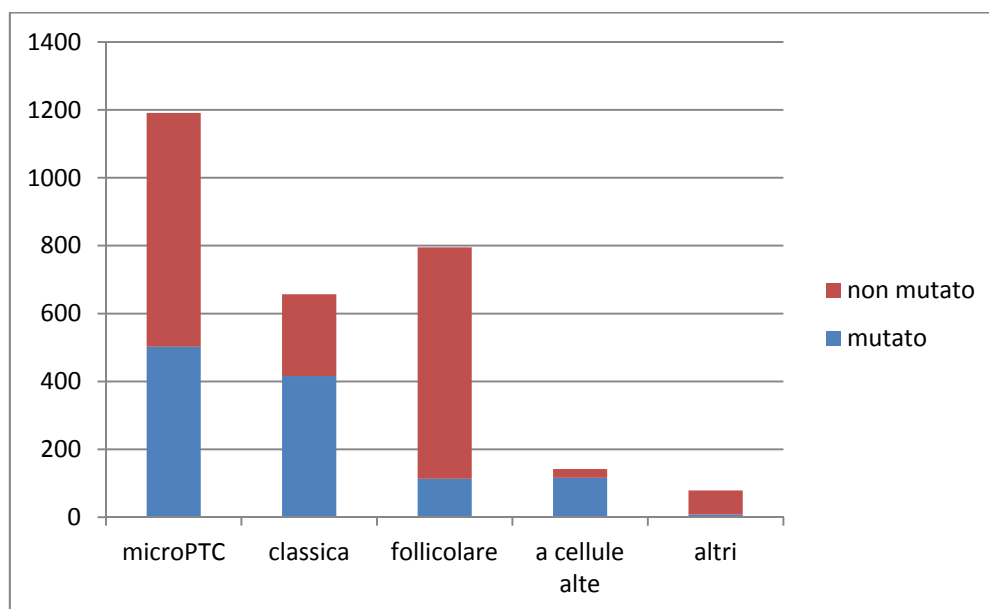


Figura 19: Rappresentazione grafica della frequenza percentuale delle differenti mutazioni di BRAF. Campione 2864 pazienti.

Variante	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>microPTC</b> (1191)	502 (42)	689 (58)
<b>Classica</b> (657)	416 (63)	241 (37)
<b>Follicolare</b> (795)	113 (14)	682 (86)
<b>Cellule alte</b> (142)	116 (82)	26 (18)
<b>Altre</b> (79)	8 (10)	71 (90)

**Tabella 12: Frequenza della mutazione di BRAF nelle diverse varianti del carcinoma papillare nel campione di 2864 pazienti presi in esame. P<0.0001**



**Figura 20: Rappresentazione grafica della distribuzione delle mutazioni di BRAF nelle differenti varianti di carcinoma papillare. Campione 2864 pazienti. P< 0.0001**

Sesso	Mutato (%)	Non mutato (%)
Maschile (727)	295 (40)	432 (60)
Femminile (2137)	860 (40)	1277 (60)

Tabella 13: Distribuzione della mutazione di BRAF nei due sessi. Campione 2864 pazienti. P=0,87; OR=1,01 (0,85-1,20)

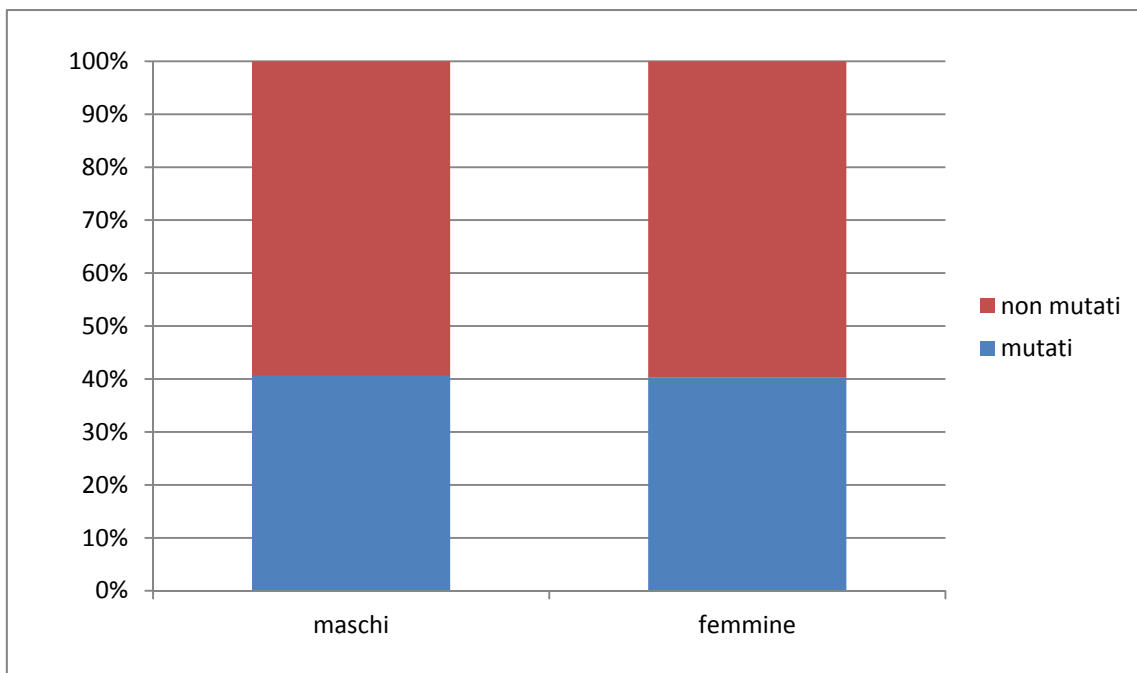


Figura 21: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei due sessi. Campione 2864 pazienti. P=0,87; OR=1,01 (0,85-1,20)

Focalità	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Multifocale</b> <b>(1230)</b>	551 (45)	679 (55)
<b>Unifocale</b> <b>(1634)</b>	604 (37)	1030 (63)

Tabella 14: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali. Campione di 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ ; OR= 1,38 (1,19-1,61)

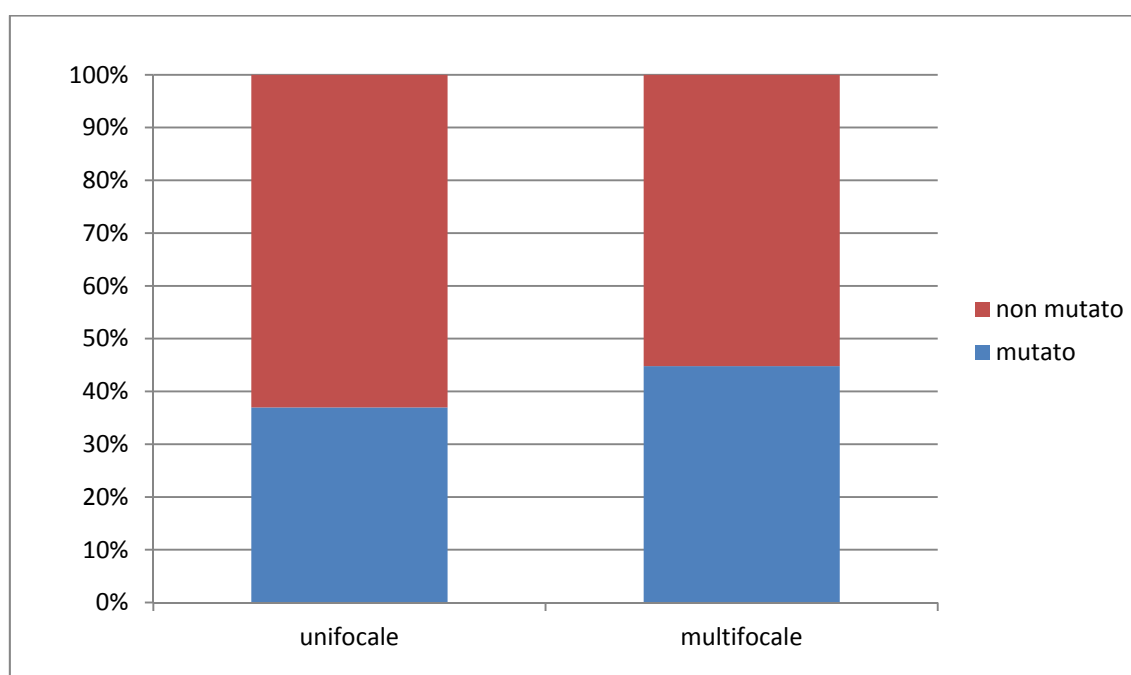


Figura 22: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali. Campione 2864 preparati.  $P < 0,0001$ ; OR= 1,38 (1,19-1,61)



Presenza di capsula	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Non capsulato</b> <b>(1675)</b>	871 (52)	804 (48)
<b>Capsulato</b> <b>(1189)</b>	284 (24)	905 (76)

Tabella 15: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati. Campione di 2864 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=3,45 (2,93-4,07)

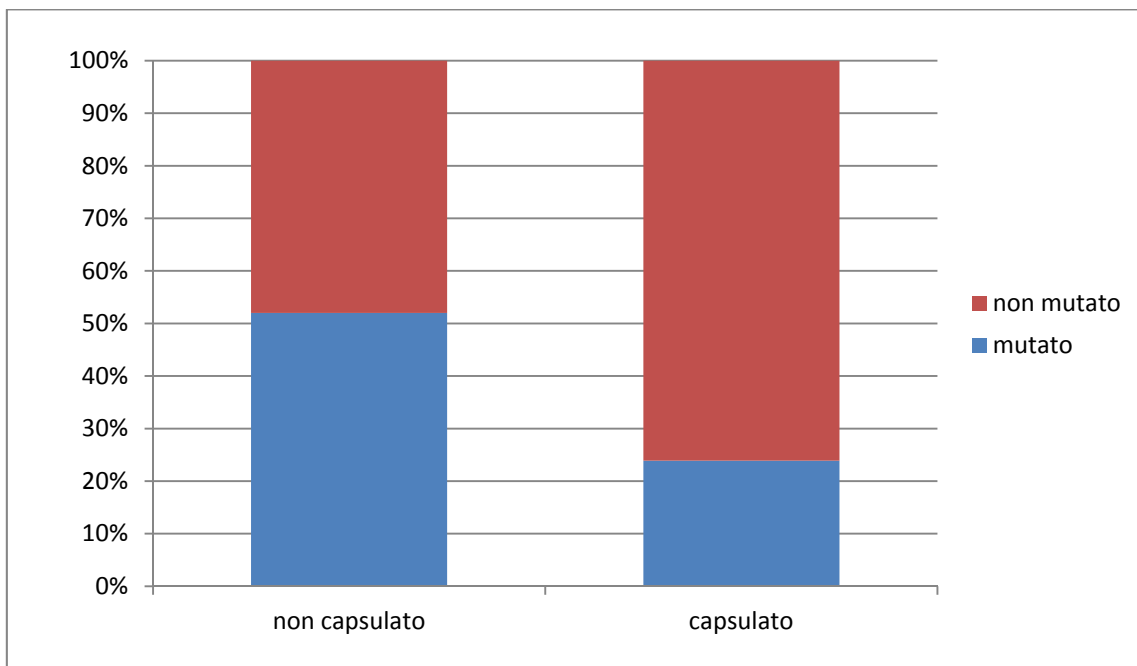


Figura 23: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati. Campione 2864 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=3,45 (2,93-4,07)

Invasione extratiroidea	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Invasivo</b> <b>(603)</b>	378 (63)	225 (37)
<b>Non invasivo</b> <b>(2261)</b>	777 (34)	1484 (66)

Tabella 16: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione extratiroidea. Campione di 2864 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=3,21 (2,66-3,87).

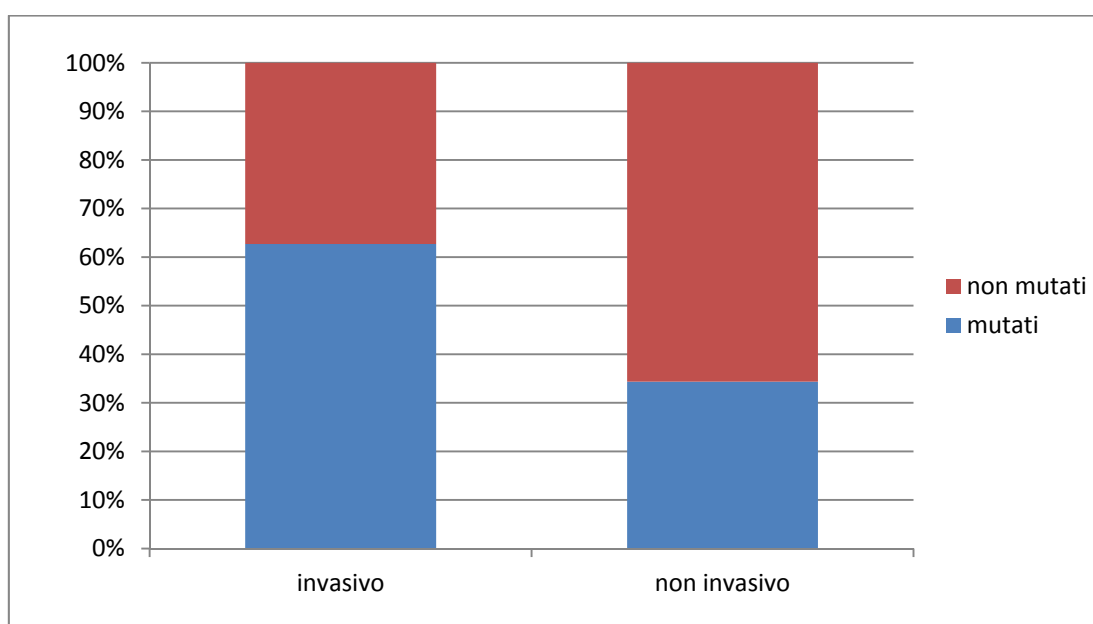


Figura 24: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione extratiroidea. Campione di 2864 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=3,21 (2,66-3,87).

Metastasi linfonodali	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Presenti (321)</b>	193 (60)	128 (40)
<b>Assenti (2543)</b>	962 (38)	1581 (62)

Tabella 17: Frequenza della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza presenza di metastasi linfonodali. Campione di 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ ;  $OR=2,48$  (1,95-3,14)

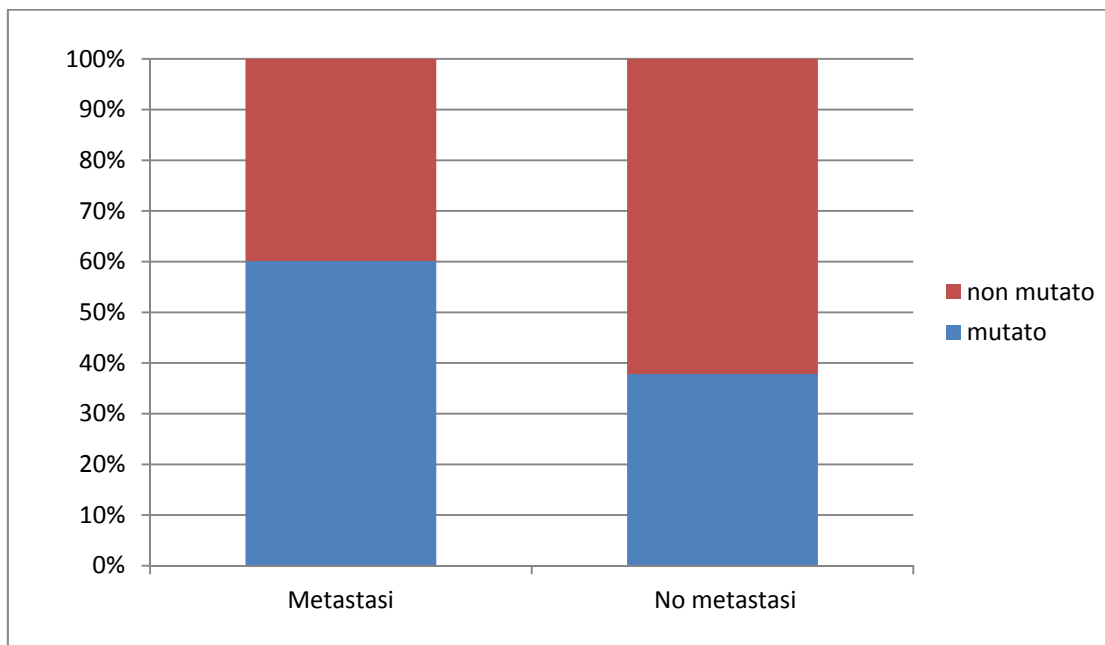


Figura 25: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi con o senza metastasi linfonodali. Campione 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ ;  $OR=2,48$  (1,95-3,14)

### Stadiazione TNM

pTNM	Mutato (%)	Non mutato (%)
T1/T2 (2132)	754 (35)	1378 (65)
T3/T4 (732)	401 (55)	331 (45)

### Modello stadiativo AJCC

Stadio	Mutato (%)	Non mutato (%)
I/II (2387)	883 (37)	1504 (63)
III/IV (477)	272 (57)	205 (43)

Tabella 18: Distribuzione della mutazione di BRAF nei differenti stadi della classificazione pTNM e AJCC. Campione 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ .  $OR=2,26$  (1,85-2,76)

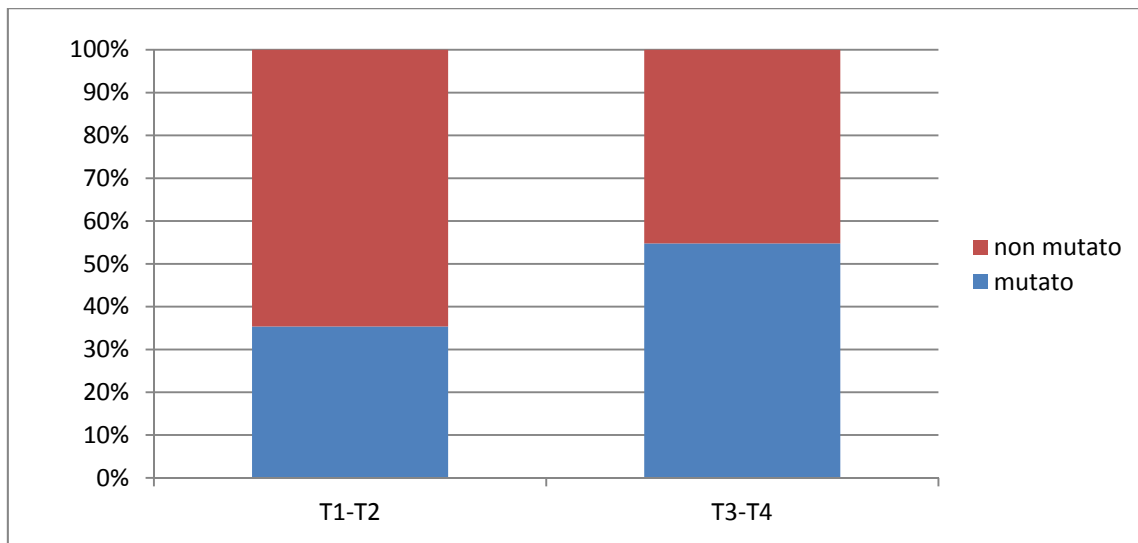


Figura 26: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei diversi stadi della stadiazione pTNM. Campione 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ ;  $OR=2,26$  (1,85-2,76)

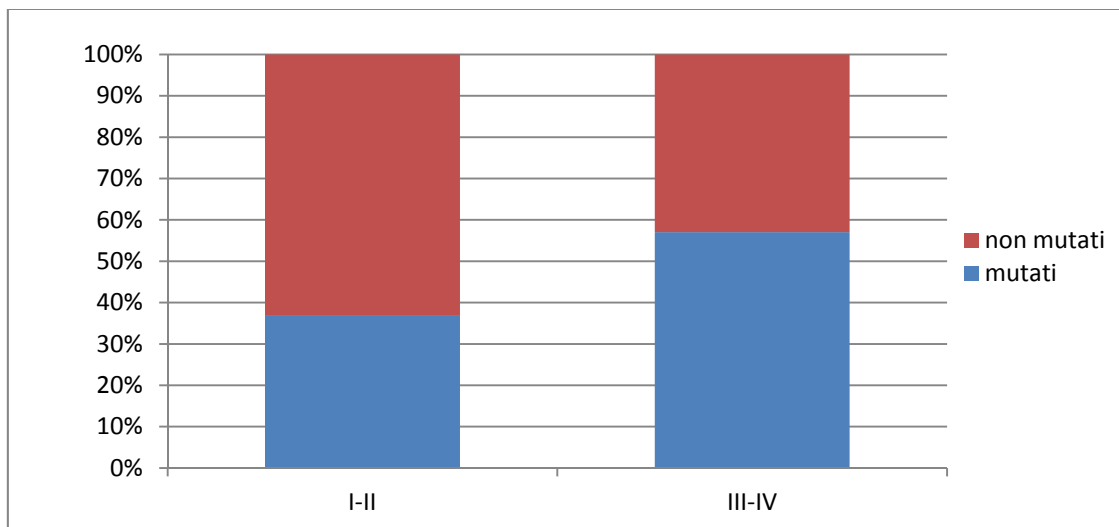


Figura 27: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei diversi stadi della stadiazione AJCC. Campione 2864 pazienti.  $P < 0,0001$ ; OR=2,26 (1,85-2,76)

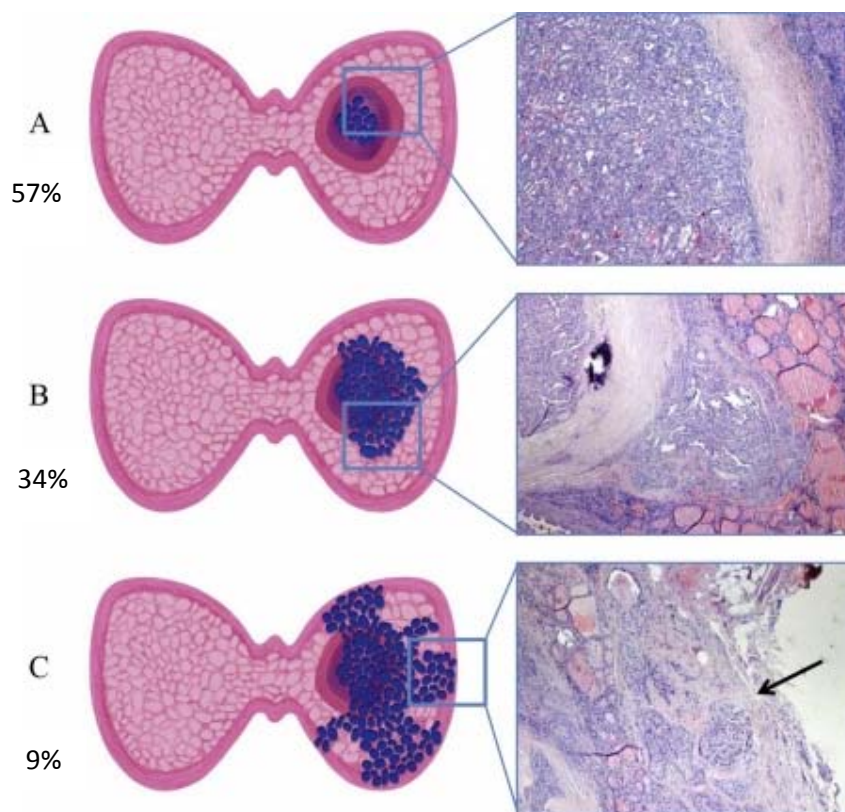
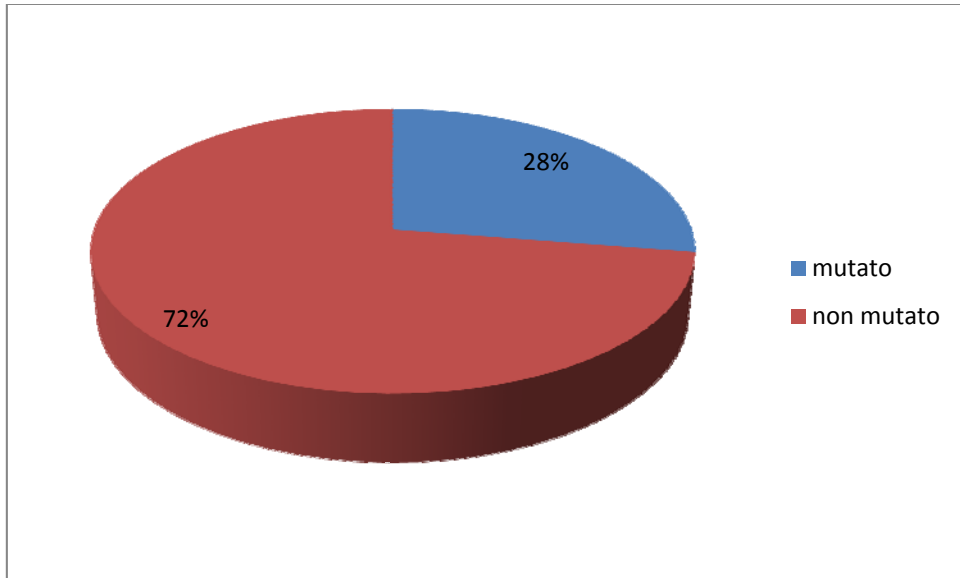


Figura 28: Rappresentazione grafica e corrispettivo anatomopatologico dei vari livelli di invasione. A) Il carcinoma è totalmente capsulato e non invade il tessuto tiroideo circostante. B) Il carcinoma invade il tessuto tiroideo sano circostante C) Il carcinoma invade la capsula tiroidea senza oltrepassarla. Campione 1798 pazienti (5)



**Figura 29:** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF nella casistica "low-risk". Campione 1798 pazienti.

Caratteristiche istopatologiche	Mutato (%)	Non mutato (%)
Non Capsulato (774)	303 (39)	471 (61)
Capsulato (1024)	192 (19)	832 (81)

Tabella 19: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati nel sottogruppo "low risk". Campione 1798 pazienti.  $P < 0,0001$  OR=2,79 (2,25-3,45)

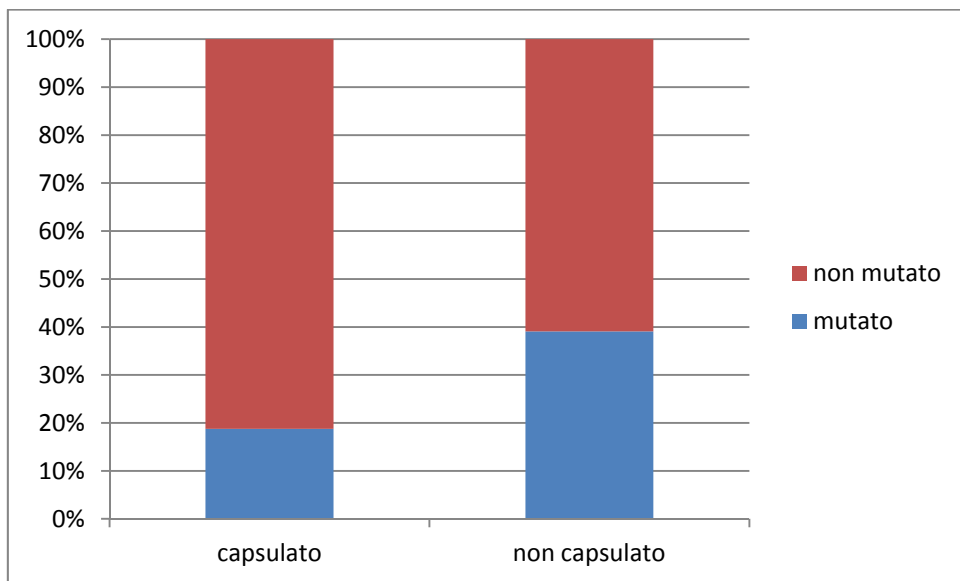
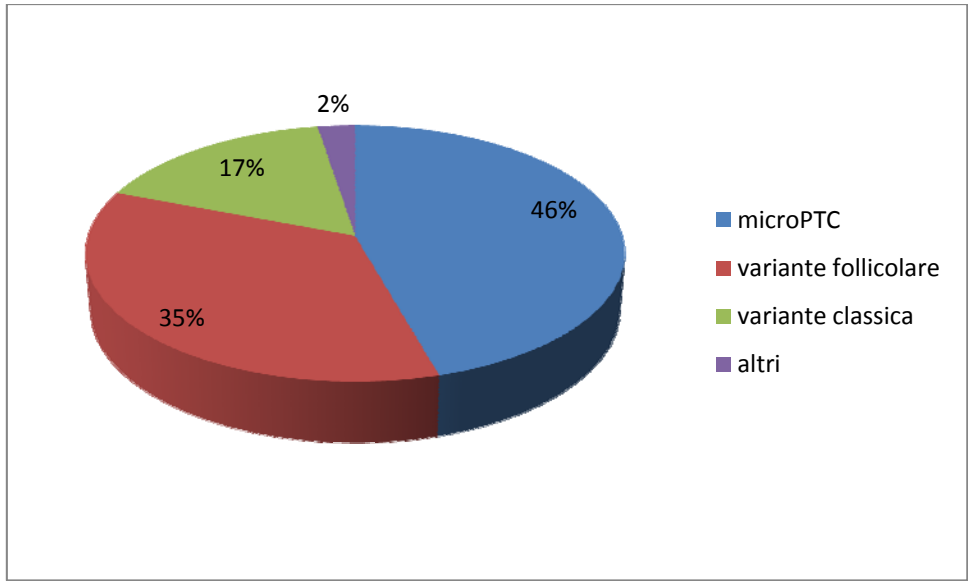


Figura 30: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti.  $P < 0,0001$ ; OR=2,79 (2,25-3,45)



**Figura 31: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale delle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti.**



Variante istologica	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>microPTC</b> <b>(820)</b>	267 (32)	553 (68)
<b>Follicolare</b> <b>(633)</b>	56 (9)	577 (91)
<b>Classica</b> <b>(299)</b>	168 (56)	131 (44)
<b>Altri</b> <b>(46)</b>	4 (9)	42 (91)

Tabella 20: Distribuzione della mutazione di BRAF nelle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti. P<0,001

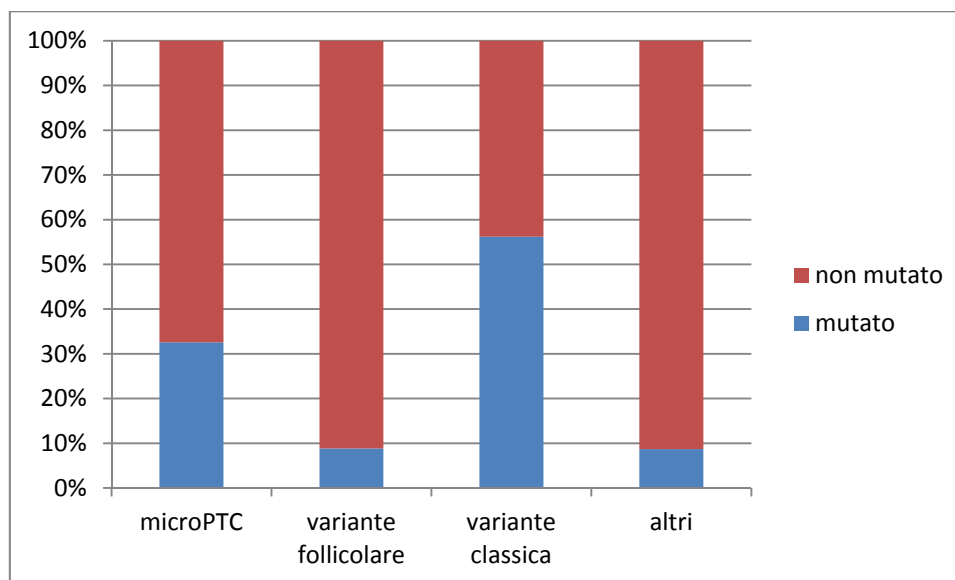


Figura 32: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nelle differenti varianti di PTC nel sottogruppo "low-risk". Campione 1798 pazienti. P<0,001.

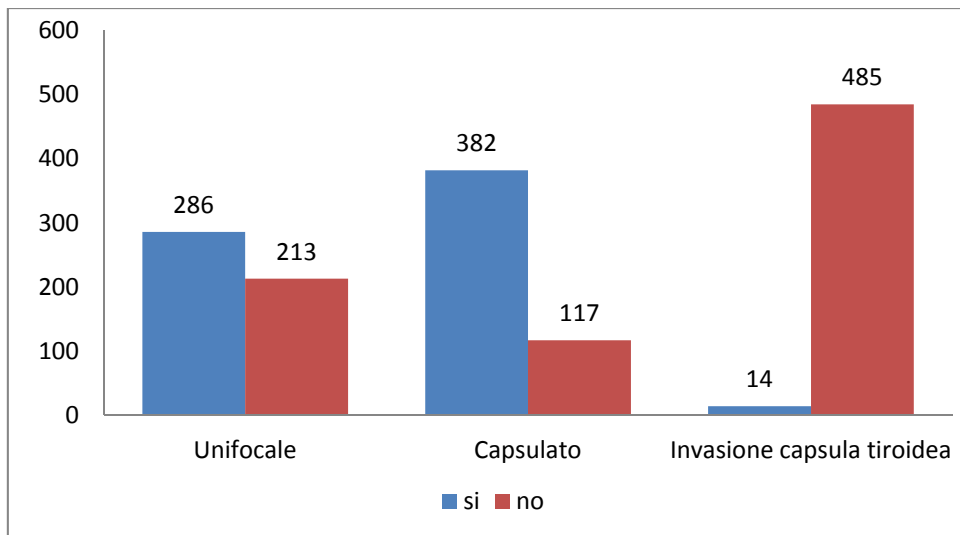


Figura 33: Rappresentazione grafica delle caratteristiche (unifocale/multifocale, capsulato/non capsulato, invasione capsula tiroidea/non invasione della capsula tiroidea) dei carcinomi "very low risk". Campione 499 pazienti.

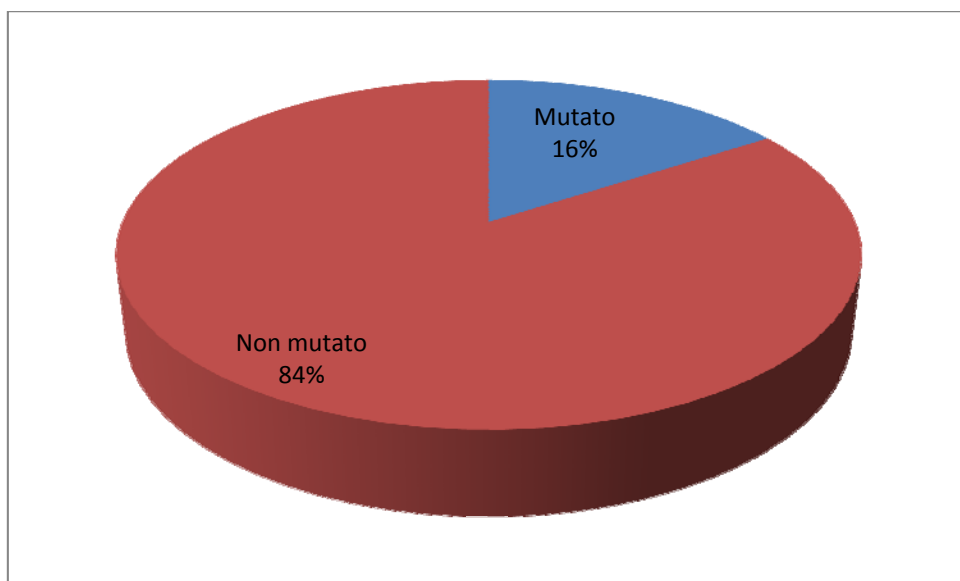
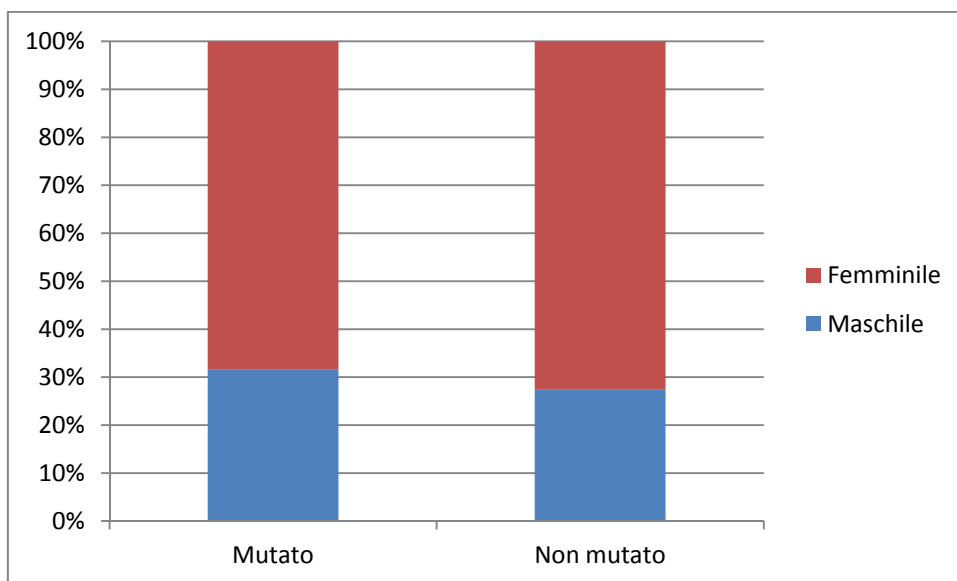


Figura 34: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.

Sesso	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Maschile</b> <b>(140)</b>	25 (18)	115 (82)
<b>Femminile</b> <b>(359)</b>	54 (15)	305 (85)

**Tabella 21: Distribuzione della mutazione di BRAF nei due sessi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,4 OR=1,23 (0,73-2,07)**



**Figura 35: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei due sessi nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,4; OR=1,23 (0,73-2,07)**

Focalità	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Multifocale</b> <b>(213)</b>	37 (17)	176 (83)
<b>Unifocale</b> <b>(286)</b>	42 (15)	244 (85)

Tabella 22: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,4; OR=1,22 (0,75-1,98)

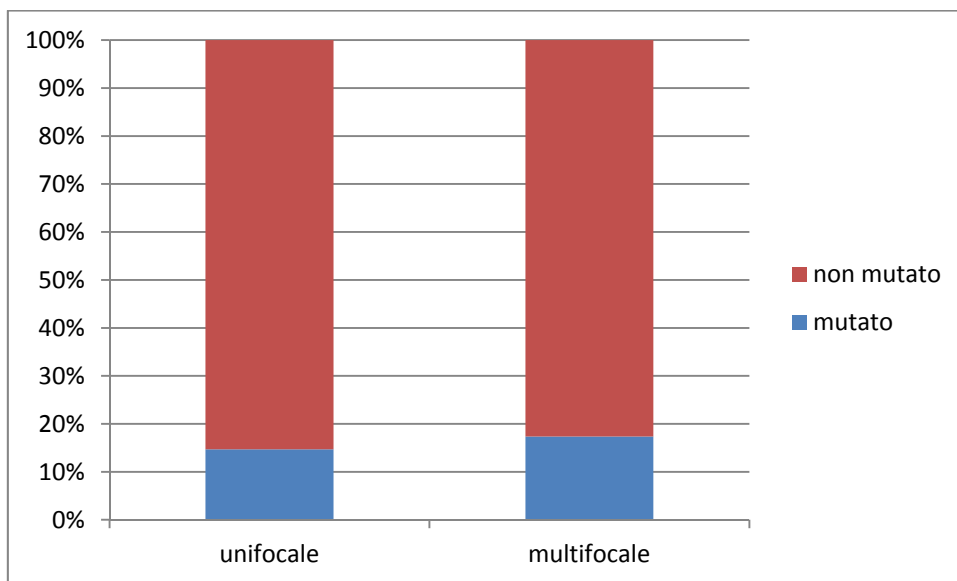


Figura 36: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi unifocali e multifocali del sottogruppo "very low risk". Campione 499 preparati. P=0,4; OR=1,22 (0,75-1,98)

Capsula tumorale	Mutato (%)	Non mutato (%)
Non capsulato (117)	30 (26)	87 (74)
Capsulato (382)	49 (13)	333 (87)

Tabella 23: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=2,34 (1,40-3,91)

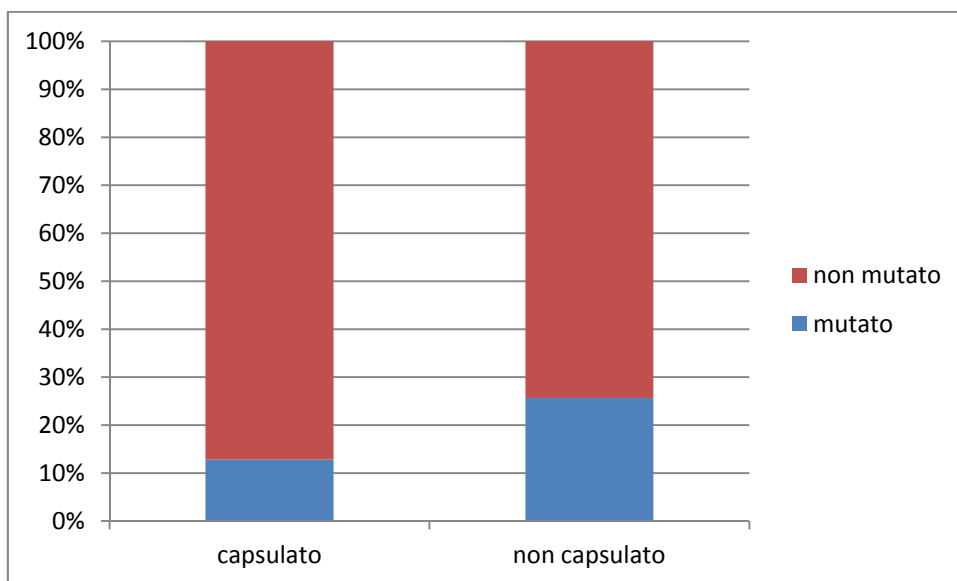
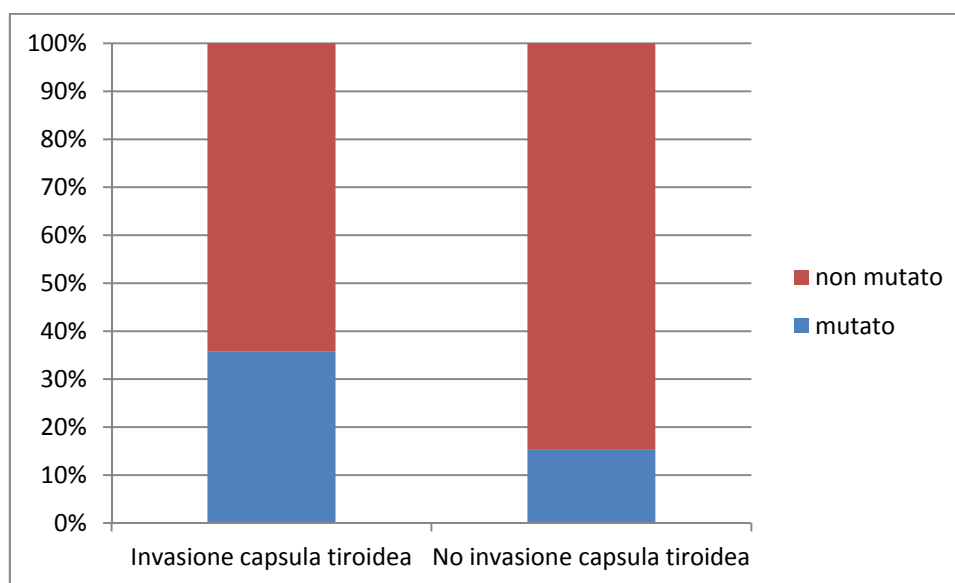


Figura 37: Rappresentazione grafica della distribuzione di BRAF nei carcinomi capsulati e non capsulati del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti.  $P < 0,001$ ; OR=2,34 (1,40-3,91)

Invasione capsula tiroidea	Mutato (%)	Non mutato (%)
<b>Invasione</b> <b>(14)</b>	5 (36)	9 (64)
<b>Non invasione</b> <b>(485)</b>	74 (15)	411 (85)

**Tabella 24: Distribuzione di BRAF nei carcinomi con o senza invasione della capsula tiroidea del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P< 0,007; OR=3,09 (1,01-9,47)**



**Figura 38: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF nei carcinomi con o senza invasione della capsula tiroidea nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P<0,007; OR=3,09 (1,01-9,47)**

Dimensioni tumorali	Mutato (%)	Non mutato (%)
< 1cm (116)	26 (22)	90 (78)
> 1 cm (383)	53 (14)	330 (86)

Tabella 25: Distribuzione della mutazione di BRAF nei carcinomi di dimensioni inferiori e superiore al centimetro nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,026; OR=1,80 (1,07-3,04).

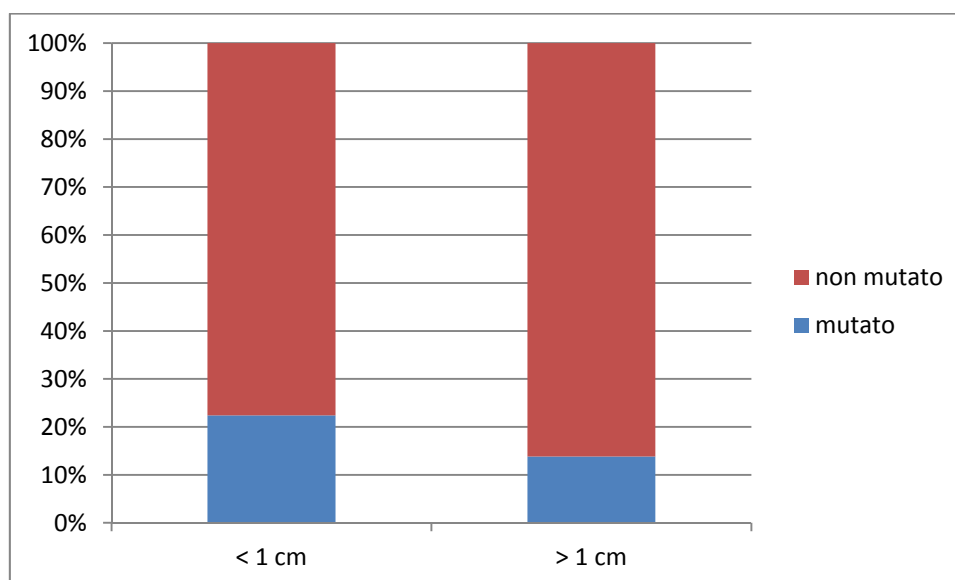


Figura 39: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF nei carcinomi di dimensioni inferiori e superiori al centimetro nel sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,026; OR=1,80 (1,07-3,04).

pT stadiazione TNM	Mutato (%)	Non mutato (%)
pT1 (336)	64 (19)	272 (81)
pT2 (163)	15 (9)	148 (91)

Tabella 26: Distribuzione della mutazione di BRAF negli stadi pT1 e pT2 (TNM) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,005, OR=2,32 (1,28-4,22)

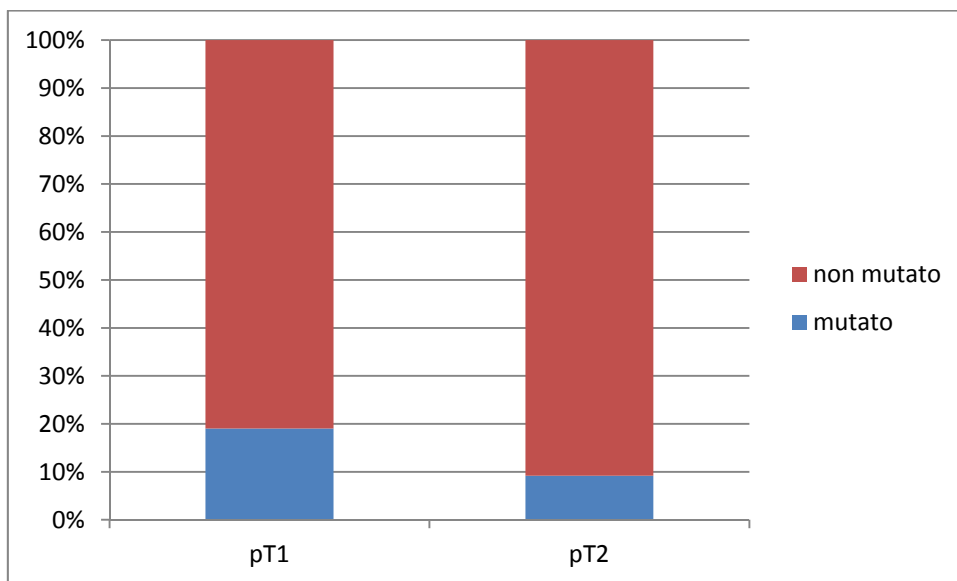


Figura 40: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale di BRAF negli stadi pT1 e pT2 (TNM) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P=0,005; OR=2,32 (1,28-4,22)



Stadio AJCC	Mutato (%)	Non mutato (%)
Stadio I (402)	70 (17)	332 (83)
Stadio II (97)	9 (9)	88 (91)

Tabella 27: Distribuzione della mutazione di BRAF negli stadi I e II (AJCC) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P= 0,049; OR= 2,06 (0,99-4,29)

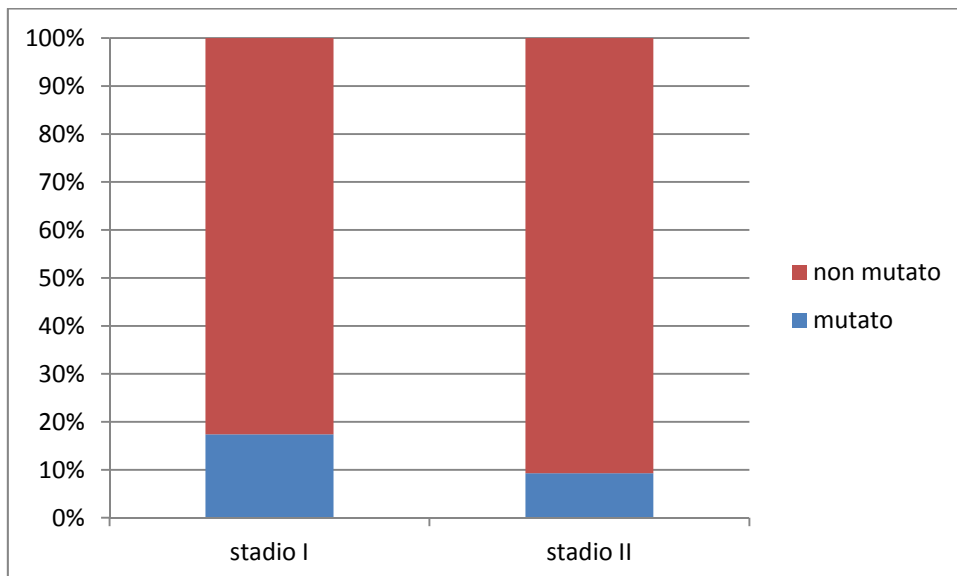


Figura 41: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF negli stadi I e II (AJCC) dei carcinomi del sottogruppo "very low risk". Campione 499 pazienti. P= 0,049. OR= 2,06 (0,99-4,29)

Aspetto istopatologico	Mutazione di BRAF (%)	P Value	OR (95% CI)
<b>Multifocalità</b>			
• Si (1230)	551 (45)	<0,0001	1,38 (1,19-1,61)
• No (1634)	604 (37)		
<b>Presenza di capsula</b>			
• Si (1189)	284 (24)	<0,001	3,45 (2,93-4,07)
• No (1675)	871 (52)		
<b>Invasione extratiroidea</b>			
• Si (603)	378 (63)	<0,001	3,21 (2,66-3,87)
• No (2261)	777 (34)		
<b>Metastasi linfonodali</b>			
• Si (321)	193 (60)	<0,0001	2,48 (1,95-3,14)
• No (2543)	962 (38)		

Tabella 28: Distribuzione della mutazione di BRAF secondo i vari aspetti istologici analizzati. Campione 2864 preparati.

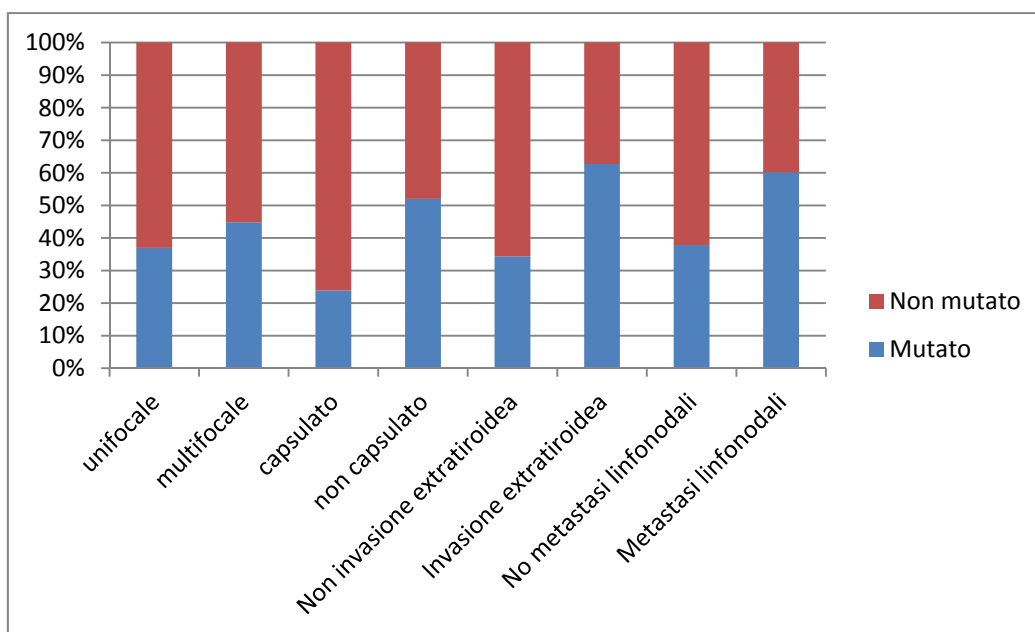


Figura 42: Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale della mutazione di BRAF in base alle diverse caratteristiche istologiche analizzate. Campione 2864 pazienti.

## Bibliografia

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*;61(2):69–90.
2. Dionigi R. *Chirurgia: Basi teoriche e chirurgia generale*. 2011.
3. Kumar V. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Elsevier Health Sciences*; 2014.
4. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol.* 2006 Jun ;154(6):787–803.
5. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, et al. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):4197–205.
6. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet.* Elsevier Ltd; 2013 Mar 23;381(9871):1058–69.
7. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* 2007 Dec;28(7):742–62.
8. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev.* 2004 Oct ;25(5):722–46.
9. Anastasi G. *Trattato di anatomia umana*. Milano: Edi.Ermes; 2006.
10. Harrison T. *Harrison principi di medicina interna*. Milano: CEA; 2012.
11. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Hauger BR, Kloos RT, Lee SL, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009 Nov;19(11):1167–214.
12. Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer.* 1988 Mar 15;61(6):1272–81.

13. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Mar ;18(3):784–91.
14. Dal Maso L, Lise M, Zambon P, Falcini F, Crocetti E, Serraino D, et al. Incidence of thyroid cancer in Italy, 1991-2005: time trends and age-period-cohort effects. *Ann Oncol.* 2011 Apr;22(4):957–63.
15. Agate L, Lorusso L, Elisei R. New and old knowledge on differentiated thyroid cancer epidemiology and risk factors. *J Endocrinol Invest.* 2012 Jan;35(6 Suppl):3–9.
16. Navarro Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. Risk factors for thyroid cancer: a prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2005 Sep 1;116(3):433–8.
17. Charkes ND. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid.* 2006 Feb;16(2):181–6.
18. Agrawal S. Diagnostic accuracy and role of fine needle aspiration cytology in management of thyroid nodules. *J Surg Oncol.* 1995 Mar;58(3):168–72.
19. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer.* 2007 Dec 25 111(6):508–16.
20. Compton C. *AJCC cancer staging atlas a companion to the seventh editions of the AJCC cancer staging manual and handbook.* New York, NY Springer; 2012.
21. Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control.*;7(3):229–39.
22. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2009 Nov;132(5):658–65.
23. Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, Fadda G, Frasoldati A, Orlandi F, et al. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest.* 2014 May 1;593–9.
24. Kocjan G, Cochand-Priollet B, de Agustin PP, Bourgain C, Chandra a, Daneshbod Y, et al. Diagnostic terminology for reporting thyroid fine needle aspiration cytology: European Federation of Cytology Societies

- thyroid working party symposium, Lisbon 2009. *Cytopathology*. 2010 Apr;21(2):86–92.
25. Miller B, Burkey S, Lindberg G, Snyder WH, Nwariaku FE. Prevalence of malignancy within cytologically indeterminate thyroid nodules. *Am J Surg*. 2004 Nov;188(5):459–62.
  26. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Third edition - WHO - OMS .
  27. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 1994 Jan;4(2):233–6.
  28. D'Avanzo A, Treseler P, Ituarte PHG, Wong M, Streja L, Greenspan FS, et al. Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis. *Cancer*. 2004 Mar 15;100(6):1123–9.
  29. Lloyd R V, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, et al. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004 Oct;28(10):1336–40.
  30. Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;14(4):517–39.
  31. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan;91(1):213–20.
  32. Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, et al. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4688–93.
  33. Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jul;86(7):3211–6.
  34. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1454–7.

35. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;88(6):2745–52.
36. Lee SR, Jung CK, Kim TE, Bae JS, Jung SL, Choi YJ, et al. Molecular genotyping of follicular variant of papillary thyroid carcinoma correlates with diagnostic category of fine-needle aspiration cytology: values of RAS mutation testing. *Thyroid.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2013 Nov 6;23(11):1416–22.
37. Millington GWM. Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (*Nature* 2002; 417: 949-54). *Clin Exp Dermatol.* 2013 Mar;38(2):222–3.
38. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):245–62.
39. Pita JM, Figueiredo IF, Moura MM, Leite V, Cavaco BM. Cell cycle deregulation and TP53 and RAS mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Mar;99(3):E497–507.
40. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao X-H, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4238–45.
41. Pupilli C, Pinzani P, Salvianti F, Fibbi B, Rossi M, Petrone L, et al. Circulating BRAFV600E in the diagnosis and follow-up of differentiated papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug
42. McLeod DS a, Sawka AM, Cooper DS. Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer. *Lancet.* Elsevier Ltd; 2013 Mar 23;381(9871):1046–57.
43. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013 Apr 10;309(14):1493–501.
44. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):3943–9.

45. Chen D, Wang Y-Y, Chuai Z-R, Huang J-F, Wang Y-X, Liu K, et al. High-resolution melting analysis for accurate detection of BRAF mutations: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2014 Jan 25;4:4168.
46. Tufano RP, Bishop J, Wu G. Reoperative central compartment dissection for patients with recurrent/persistent papillary thyroid cancer: efficacy, safety, and the association of the BRAF mutation. *Laryngoscope*. 2012 Jul;122(7):1634–40.
47. Marotta V, Sciammarella C, Vitale M, Colao A, Faggiano A. The evolving field of kinase inhibitors in thyroid cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* . 2014 Sep 16;

## Ringraziamenti

Al termine di questo lungo percorso mi sembra doveroso ringraziare alcune delle persone che mi sono state vicine.

Ringrazio innanzitutto la mia famiglia che mi ha sempre supportato anche nei momenti difficili.

Ringrazio i professori Gabriella Fontanini e Fulvio Basolo per avermi accolto nel reparto di Anatomia Patologica permettendomi di realizzare questo lavoro.

Ringrazio il Dott. Liborio Torregrossa per il grande aiuto che mi ha dato in questi mesi nella stesura della tesi.

Ringrazio Nicole per il sostegno e la pazienza dimostrata in tutti questi anni al mio fianco.

Ringrazio infine Paolo, Michele, Lorenzo, Sara, Giulia, Valeria per l'amicizia e i bei momenti passati assieme.