



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE E DI PRECISIONE

TESI DI DOTTORATO IN
TECNOLOGIE BIOMEDICHE INNOVATIVE IN MEDICINA CLINICA
XXXIII CICLO

Espressione dell'indice di proliferazione Ki-67 e di HER2 nel carcinoma papillifero della tiroide: correlazioni istopatologiche e cliniche

Relatore:

Prof. Marco Centanni

Co-Relatore:

Prof. Andrea Lania

Dottoranda:

Dott.ssa Miriam Cellini

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

1. ABSTRACT

2. INTRODUZIONE

2.1 Carcinoma papillifero della tiroide

Epidemiologia

Fattori di rischio

Aspetti istologici

Aspetti genetici e molecolari

Diagnosi

Terapia

Stadiazione

Stratificazione del rischio di recidiva

Follow-up

Prognosi

2.2 Indice di proliferazione Ki-67

Caratteristiche della proteina Ki-67: struttura, regolazione e funzione

Indice di proliferazione Ki-67 e implicazioni cliniche

2.3 Recettore per il fattore di crescita epidermico HER2

Caratteristiche del recettore HER2: struttura e funzione

Espressione di HER2 e implicazioni cliniche

3. RAZIONALE DELLO STUDIO

4. SCOPO DELLO STUDIO

5. PAZIENTI E METODI

5.1 Gruppo di studio

5.2 Metodi

6. ANALISI STATISTICA

7. RISULTATI

7.1 Espressione di HER2

7.2 Espressione dell'indice di proliferazione Ki-67

8. DISCUSSIONE

9. BIBLIOGRAFIA

1. ABSTRACT

SCOPO

Valutare l'espressione dell'indice di proliferazione Ki-67 e del recettore per il fattore di crescita epidermico HER2 nel carcinoma papillifero della tiroide (PTC) e correlare l'espressione di tali marcatori con le caratteristiche istopatologiche e cliniche della neoplasia.

PAZIENTI E METODI

Sono stati selezionati retrospettivamente 74 pazienti sottoposti a tiroidectomia totale e con diagnosi istologica di PTC. L'espressione di HER2 e dell'indice proliferativo Ki-67 sono state determinate mediante tecnica immunohistochimica. La presenza di nuclei immunoreattivi per Ki-67 è stata espressa in percentuale e classificata in 4 gruppi: score <1%, score 1.1-3%, score 3.1-5%, score >5%. All'espressione di HER2 è stato attribuito un punteggio da 0 a 3+: 0 e 1+ espressione negativa, 2+ espressione debolmente positiva indagata con test di conferma con amplificazione genica mediante tecnica di ibridazione fluorescente in situ (FISH), 3+ espressione positiva.

RISULTATI

L'espressione di HER2 è stata valutata in 60 pazienti ed è risultata negativa, debolmente positiva e positiva, rispettivamente, nel 58.4%, 33.3% e 8.3% dei casi. Nei 20 pazienti con score 2+ il test di conferma mediante FISH ha rilevato l'iperespressione di HER2 in 12/20 pazienti. Pertanto, l'iperespressione finale di HER2 è risultata negativa in 43/60 pazienti (71.7%) e positiva in 17/60 pazienti (28.3%). L'espressione dell'indice proliferativo Ki-67 è stata valutata in 67 pazienti ed è risultata < 1% in 47/67 (70.1%), tra 1.1-3% in 16/67

(23.9%), tra 3.1-5% in 4/67 (6%). Analizzando l'espressione dell'indice proliferativo Ki-67 e l'iperpressione di HER2 non sono emerse differenze statisticamente significative in termini di espressione di tali marcatori e caratteristiche istopatologiche e cliniche di aggressività della neoplasia. Le uniche differenze significative sono emerse nei pazienti classificati a rischio di recidiva intermedio-alto e con carcinoma multifocale che hanno mostrato più frequentemente un'espressione di Ki-67 >1.1% rispetto ai pazienti a basso rischio di recidiva (p=0.014) e con neoplasia unifocale (p=0.0304).

CONCLUSIONI

In circa un terzo dei carcinomi papilliferi è stata rilevata un'iperpressione del recettore per il fattore di crescita epidermico HER2 e nel 70% circa dei campioni istologici è stato evidenziato un basso indice proliferativo Ki-67. L'iperpressione di entrambi i marcatori non correla con i parametri istologici e clinici di aggressività della neoplasia ad eccezione di una maggiore attività proliferativa riscontrata nei pazienti a rischio intermedio-alto di recidiva e con carcinoma multifocale.

2. INTRODUZIONE

2.1 CARCINOMA PAPILLIFERO DELLA TIROIDE

Epidemiologia

Il carcinoma differenziato della tiroide (DTC) è la più frequente neoplasia del sistema endocrino rappresentandone oltre il 95% dei casi. Il carcinoma papillifero della tiroide (PTC) rappresenta l'istotipo di DTC più frequente e costituisce l'80-85% di tutti i carcinomi della tiroide (1). L'incidenza del carcinoma differenziato della tiroide aumenta con l'avanzare dell'età raggiungendo un picco tra i 45-50 anni. Il DTC si presenta più frequentemente nel sesso femminile con un'incidenza nelle donne circa 4 volte più alta rispetto al sesso maschile e con un tasso di incidenza del 3,4/100.000 nell'uomo e di 11,5/100.000 nella donna. Nelle donne il tumore alla tiroide occupa il terzo posto tra le neoplasie più frequenti dopo quelle della mammella e del colon-retto (2). Nell'ultima decade si è registrato un incremento di circa il 4% nell'incidenza del DTC con una mortalità che non ha mostrato un parallelo incremento. Questo dato è da correlare verosimilmente all'intensificarsi dei programmi di screening e all'impiego di strumenti diagnostici più sensibili che hanno consentito di identificare tumori di piccole dimensioni e in particolare microcarcinomi papilliferi che presentano una prognosi generalmente favorevole rispetto agli altri istotipi (3).

Fattori di rischio

Diversi fattori di rischio (ambientali, genetici, ormonali, stile di vita) sono stati imputati come possibili favorevoli allo sviluppo della neoplasia tiroidea.

L'esposizione a radiazioni ionizzanti è l'unico fattore di rischio per il quale è stata

dimostrata una correlazione con il carcinoma differenziato della tiroide, incrementando il rischio di sviluppare la neoplasia tiroidea, e in particolare per il carcinoma papillifero, dal 5% al 50% soprattutto se l'esposizione è avvenuta in giovane età. Il meccanismo patogenetico non è del tutto chiaro ma verosimilmente va ricercato nei riarrangiamenti di RET e TRK (4).

La carenza iodica rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo della patologia nodulare della tiroide e negli animali per lo sviluppo di carcinoma tiroideo (5). Questo è da correlare all'incremento del TSH, principale fattore di crescita per le cellule follicolari (6). Tuttavia, nell'uomo nelle zone iodocarenti non è stata dimostrata una correlazione diretta tra deficit di iodio e incremento del rischio di carcinoma tiroideo. La carenza iodica sembrerebbe condizionare l'istotipo del carcinoma tiroideo con maggiore frequenza di insorgenza di carcinoma follicolare rispetto al papillifero nelle zone iodocarenti. Con l'introduzione della profilassi iodica nelle regioni iodocarenti si è assistito ad una riduzione del tasso di incidenza dei tumori follicolari ma contemporaneamente ad un aumento di incidenza di quelli papillari. La stimolazione cronica da parte del TSH, indotta dai bassi valori delle frazioni libere degli ormoni tiroidei correlati alla carenza iodica, provoca ipertrofia e iperplasia delle cellule follicolari e potrebbe costituire uno stimolo proliferativo per le cellule tumorali. Inoltre, l'aumentata incidenza di carcinomi papilliferi nelle regioni con aumentato introito di iodio è stata associata a mutazioni di BRAF ma i dati attualmente disponibili in tale ambito sono ancora discordanti e non conclusivi (7).

La presenza di tiroidite autoimmune è stata ipotizzata come possibile fattore di rischio per il carcinoma differenziato della tiroide sebbene ad oggi questa associazione sia ancora

controversa. I dati di due recenti metanalisi hanno dimostrato un'associazione tra carcinoma papillifero e tiroidite di Hashimoto (8, 9). Due ipotesi sono state avanzate per spiegare questa possibile correlazione tra autoimmunità e carcinogenesi: l'incremento del TSH con il suo stimolo proliferativo per cellule follicolari tiroidee e lo stato infiammatorio cronico con il rilascio di citochine pro-infiammatorie. Tuttavia, non è stata evidenziata una correlazione tra presenza di anticorpi anti-tiroide e rischio di sviluppare la neoplasia tiroide (10, 11).

Una maggiore incidenza di carcinoma differenziato della tiroide è stata descritta nei pazienti obesi ma non è del tutto chiaro quale possa essere il meccanismo patogenetico. Sono stati ipotizzate possibili correlazioni tra insulino-resistenza, dieta, scarsa attività fisica e valori più elevati del TSH nel paziente obeso e rischio incrementato di sviluppare il carcinoma differenziato della tiroide (12).

Aspetti istologici

Il carcinoma papillifero della tiroide istologicamente si presenta con papille contenenti un core fibrovascolare centrale rivestito da epitelio cuboide mono- o pluristratificato. Le atipie nucleari patognomoniche comprendono il nucleo a vetro smerigliato o ad occhio di Orphan Annie, le pseudoinclusioni nucleari e le incisioni nucleari. Frequentemente sono presenti calcificazioni concentriche (corpi psammomatosi) che confermano il sospetto diagnostico (13). Sono state descritte numerose varianti istologiche del PTC con aggressività clinica e prognosi differente riassunte in **Tabella 1**. La variante più comune, con una prognosi favorevole, è quella follicolare e si presenta come un tumore a pattern di crescita follicolare ma con atipie nucleari tipiche del PTC. La variante a cellule alte è caratterizzata dalla

presenza di cellule ossifile per più del 50% del tumore con altezza doppia rispetto alla larghezza. Questa variante, più frequente nei soggetti anziani, presenta un comportamento aggressivo e una prognosi peggiore rispetto ad altri sottotipi di PTC. Infatti, esordisce generalmente come una neoplasia di grandi dimensioni, con invasione extratiroidea e angioinvasione e presenta un rischio maggiore di metastasi linfonodali o a distanza. La variante sclerosante diffusa si presenta con estese aree di fibrosi e calcificazione e microscopicamente presenta pattern di crescita papillare con aree di metaplasia squamosa. Questa variante è rara, colpisce soprattutto soggetti giovani e presenta una prognosi più sfavorevole rispetto alla variante classica per il maggior coinvolgimento linfonodale alla diagnosi ed alla tendenza di recidivare. La variante Hobnail si presenta struttura non solida con componente a cellule alte/colonnare/sclerosante diffusa rappresentata per meno del 10%, perdita di polarità cellulare e nucleo posto in posizione atipica nel >10%. Il comportamento aggressivo di tale variante è associato ad una prognosi peggiore (14).

TABELLA 1. VARIANTI ISTOLOGICHE DEL CARCINOMA PAPILLIFERO DELLA TIROIDE

VARIANTI A RISCHIO BASSO	VARIANTI A RISCHIO ALTO
Variante classica	Variante a cellule alte
Variante follicolare	Variante a cellule colonnari
Variante capsulata	Variante solida/trabecolare
Variante Whartin-like	Variante a cellule hobnail
Variante a cellule ossifile/chiare/fusate	Variante sclerosante diffusa

Aspetti genetici e molecolari

Ad oggi sono stati descritti differenti meccanismi patogenetici coinvolti nella carcinogenesi del tumore differenziato della tiroide quali mutazioni geniche puntiformi, amplificazioni geniche, traslocazioni, modifiche epigenetiche. Tali alterazioni genetiche

coinvolgono principalmente due vie di segnale intracellulare che regolano la proliferazione, differenziazione e motilità cellulare: la via della protein-chinasi mitogeno-attivata (MAPK) e la via della fosfatidil-inositolo3-chinasi (PI3K/AKT). Nel carcinoma papillifero della tiroide, l'attivazione della via MAPK, può realizzarsi principalmente mediante i seguenti meccanismi: a) riarrangiamenti di RET (REarranged during Transfection) o NTRK1 (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor 1), b) mutazioni puntiformi di BRAF (B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), c) mutazioni di RAS (Rat Sarcoma) (15).

Riarrangiamenti RET/PTC

Il riarrangiamento cromosomico RET/PTC è stato il primo riarrangiamento descritto nel carcinoma differenziato della tiroide. Il proto-oncogene RET codifica per una proteina transmembrana con dominio intracellulare ad attività tirosino-chinasica e rappresenta un recettore per una classe di fattori di crescita neurotrofici di derivazione gliale (GFL). I riarrangiamenti RET/PTC consistono nella fusione della sequenza codificante per il dominio tirosino-chinasico del gene RET con il promotore e i primi esoni di geni non correlati. Questo riarrangiamento attiva, nelle cellule follicolari tiroidee, l'aberrante espressione della proteina chimerica del recettore e l'attivazione non controllata della via di segnale RAS/RAF/MAPK. Ad oggi, esistono diverse forme di riarrangiamenti RET/PTC rilevati in cui differenti geni partner si uniscono alla sequenza codificante la porzione tirosino-chinasica di RET. Nel carcinoma papillifero della tiroide i riarrangiamenti RET/PTC1 e RET/PTC3 svolgono un ruolo cruciale nell'indurre la trasformazione neoplastica nelle cellule tiroidee (16). In particolare, il riarrangiamento RET/PTC1 è più frequentemente riscontrato nella variante

classica del carcinoma papillifero della tiroide e mentre RET/PTC3 negli istotipi di carcinoma papillifero più aggressivi come la variante a cellule alte o la variante solida (17).

Mutazioni di BRAF

La proteina BRAF appartiene alla famiglia delle serin-treonin chinasi RAF che comprende tre isoforme: A-Raf, B-Raf e C-Raf. Tutti i membri della famiglia RAF sono coinvolti nella cascata di trasduzione del segnale che converge verso l'attivazione di RAS che a sua volta avvia la cascata delle MAPK. Il gene codificante BRAF si trova sul braccio lungo del cromosoma 7. La sostituzione T1799A nel gene BRAF è la mutazione più frequentemente riscontrata nel carcinoma papillifero della tiroide che determina la sostituzione del residuo amminoacidico valina in posizione 600 ad acido glutammico (BRAF V600E) (18). Tale mutazione modifica l'attività enzimatica di BRAF attivandone la sua attività chinasi in maniera costitutiva. La mutazione puntiforme di BRAF V600E si riscontra in una percentuale variabile di carcinomi papilliferi della tiroide (30-80%) e si attesta mediamente intorno al 45%. La presenza di tale mutazione nel 10-15% dei carcinomi tiroidei scarsamente differenziati della tiroide, ha suggerito un ruolo della mutazione di BRAF nella progressione verso forme avanzate della neoplasia. Infatti, tale mutazione può associarsi ad una ridotta espressione dei marker di differenziazione tiroidea e nello specifico del trasportatore NIS, che conferisce una resistenza alla terapia radiometabolica. Inoltre, la presenza della mutazione di BRAF è associata ad una prognosi peggiore nonché a caratteristiche istopatologiche di aggressività quali l'estensione extratiroidea, la presenza di metastasi linfonodali o a distanza (19). Sulla base di tali dati, la valutazione dello stato mutazionale di BRAF è stata inserita

nelle linee guida dell'American Thyroid Association (ATA) tra i parametri utilizzati nella stratificazione del rischio di recidiva di malattia (1).

Mutazioni di RAS

Le tre isoforme dei geni RAS (N-RAS, K-RAS e H-RAS) codificano per proteine G in grado di legare e idrolizzare il GTP a GDP passando così da una forma attiva a una forma inattiva. Le proteine RAS sono GTPasi che fungono da trasduttori di segnale dei recettori tirosino-chinasici e delle proteine G nelle vie di MAPK e PI3K-Akt. Le mutazioni dei geni RAS si traducono in un'attivazione costitutiva della proteina legata al GTP che induce attivazione delle proteine RAF e della cascata delle MAPK (20, 21). L'attivazione oncogenica dei geni RAS, a differenza dei riarrangiamenti RET/PTC e delle mutazioni di BRAF, è presente nel carcinoma papillifero e follicolare della tiroide sebbene sia molto più frequente nelle forme follicolari (20-50%) rispetto a quelle papillifere (5-10%) e in particolare nella variante follicolare del carcinoma papillifero (22). Tipicamente le mutazioni puntiformi nei geni RAS coinvolgono i codoni 12, 13 e 61 e si trovano più frequentemente nel codone 61 di NRAS e in misura minore in HRAS. Sebbene il ruolo prognostico delle mutazioni di RAS sia ancora incerto, la loro presenza nei tumori scarsamente differenziati della tiroide e nei tumori anaplastici suggerisce un possibile ruolo di RAS nella progressione e sdifferenziazione tumorale (15).

Riarrangiamenti PAX8/PPAR

PAX8/PPAR γ è una proteina chimerica dovuta alla traslocazione tra la regione 2q13 e quella 3p25. La proteina di fusione PFP (PAX8PPAR γ 1 Fusion Protein) mantiene i siti di

legame al DNA di entrambi i fattori di trascrizione PAX8 e PPAR γ . La proteina PAX8 è un fattore di trascrizione necessario per l'espressione di geni tiroide-specifici e per lo sviluppo della ghiandola stessa e la proteina PAX8 è sotto il controllo del promotore del PAX8. PPAR γ è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia dei recettori nucleari coinvolto nella differenziazione adipocitaria e nel metabolismo del glucosio e dei lipidi (23). Il riarrangiamento PAX8/PPAR γ è presente in circa il 35% dei carcinomi follicolari della tiroide mentre è molto più raro negli altri istotipi. È stato ipotizzato che tale riarrangiamento possa avere un ruolo nella carcinogenesi sebbene, il ruolo prognostico di tale evento molecolare non è del tutto chiaro (15).

hTERT

La cellula tumorale può acquisire un potenziale replicativo attraverso la riattivazione della telomerasi, una DNA polimerasi RNA dipendente costituita da 2 subunità catalitiche (hTERT, ossia human TELomerase Reverse Transcriptase), due template RNA (TERC, ossia TELomerase RNA Component) e due proteine coinvolte nell'assemblaggio della telomerasi (DKC1 e Nop10123). La telomerasi si lega ai telomeri ed utilizza il template RNA per allungarli e questo permette alla cellula di evitare la crisi telomerica (24). La riattivazione della telomerasi nei tumori tiroidei è dovuta ad una mutazione del promotore di hTERT. Esistono due hotspot mutazionali di tale promotore C228T e C250T che portano alla formazione di un sito di legame in grado di legare fattori di trascrizione che aumentano l'attività trascrizionale del gene. Le due mutazioni sono mutualmente escluse e la presenza di una delle due mutazioni è stata rilevata nel 10-15% dei carcinomi differenziati della tiroide,

con una frequenza maggiore nei carcinomi follicolari mentre sono assenti nei tumori benigni. Sebbene, il 50-70% dei carcinomi papillari della tiroide presenti una mutazione di BRAF, la maggior parte di questi tumori si caratterizza per un andamento clinico indolente. Questo suggerisce l'esistenza di altri meccanismi molecolari in grado di influenzare il comportamento biologico della neoplasia, quali le mutazioni di hTERT, identificate in sottogruppi più aggressivi di carcinoma papillifero. Infatti, i tumori con mutazioni di hTERT si presentano più frequentemente in età avanzata e mostrano un rischio maggiore di recidiva e metastasi a distanza nonché di mortalità tumore-correlata (25). Inoltre, le mutazioni di hTERT e BRAF agiscono in maniera sinergica e la loro coesistenza rappresenta un indicatore prognostico negativo, poiché associata a tumori scarsamente differenziati e clinicamente aggressivi (26).

Diagnosi

Il carcinoma papillifero della tiroide si presenta generalmente con un nodulo tiroideo riscontrato incidentalmente nel corso di procedure diagnostiche eseguite per altre patologie (Ecodoppler TSA, TC, RM o PET-FDG) e più raramente esordisce clinicamente con una tumefazione del collo associata o meno ad altri sintomi quali la disfagia, disfonia o dispnea (2, 13). L'ecografia del collo rappresenta l'indagine di primo livello, non invasiva, necessaria per stratificare il rischio ecografico di malignità dei noduli tiroidei e per selezionare quelli da sottoporre ad esame citologico da agoaspirato con ago sottile (FNAC) (27). Diverse società scientifiche hanno identificato i criteri di rischio di malignità del nodulo tiroideo attraverso l'insieme dei reperti di semeiotica ecografica definendo le relative raccomandazioni per FNAC (1, 28-30). La **Tabella 2**, modificata da Durante *et al.*, riporta i principali sistemi

standardizzati di stratificazione ecografica dei noduli tiroidei proposti e approvati da linee guida pratiche con le relative raccomandazioni per FNAC (27).

TABELLA 2. SISTEMI STANDARDIZZATI DI STRATIFICAZIONE ECOGRAFICA DI NODULI TIROIDEI

AACE, ACE e AME 2016	ATA 2015	EU-TIRADS 2017	ACR TIRADS 2017
Rischio basso Rischio di malignità 1% FNAC >20mm Semeiotica ecografica Nodulo cistico (componente fluida >80%); Noduli prevalentemente cistici con foci iperflettenti da reverbero in assenza di reperti ecografici sospetto; Noduli spongiformi isoecogeni, confluenti o con alone regolare	Rischio basso Benigno Rischio di malignità 1% FNAC non indicata Semeiotica ecografica Nodulo cistico Sospetto molto basso Rischio di malignità < 3% FNAC ≥ 20 mm o osservazione Semeiotica ecografica Noduli spongiformi/parzialmente cistici senza alcun aspetto ecografico di rischio basso, intermedio o alto Sospetto basso Rischio di malignità 5%-10% FNAC ≥ 15 mm Semeiotica ecografica Nodulo isoecogeno/iperecogeno o parzialmente cistico con componente solida eccentrica senza microcalcificazioni, margini irregolari, estensione extratiroidea, forma taller-than-wide	Rischio basso Benigno (EU-TIRADS 2) Rischio di malignità circa 0% FNAC non indicata Semeiotica ecografica Cisti anecogene Noduli spongiformi Basso rischio (EU-TIRADS 3) Rischio di malignità 2%-4% FNAC > 20 mm Semeiotica ecografica Nodulo isoecogeno o iperecogeno con forma ovale, margini regolari, in assenza di reperti ecografici sospetto	Rischio basso Benigno (TR1) Rischio di malignità < 2% FNAC non indicata Semeiotica ecografica Noduli spongiformi Noduli cistici Non sospetto (TR2) Rischio di malignità 2% FNAC non indicata Semeiotica ecografica Noduli misti solido/liquidi senza calcificazioni, con margini lisci e forma ovalare Sospetto medio (TR3) Rischio di malignità 5% FNAC ≥ 25 mm Semeiotica ecografica Nodulo isoecogeno o ipoecogeno, cistico senza calcificazioni con margini regolari e forma ovalare
Rischio intermedio o moderato	Rischio intermedio o moderato	Rischio intermedio o moderato	Rischio intermedio o moderato
Rischio intermedio Rischio di malignità 5%-15% FNAB > 20 mm Semeiotica ecografica Nodulo isoecogeni o lievemente ipoecogeno con forma da ovale a tonda, margini regolari Possono essere presenti: -vascolarizzazione intranodulare -elevata durezza all'elastografia -macrocalcificazioni o calcificazioni periferiche continue -spot iperecogeni indeterminati	Sospetto intermedio Rischio di malignità 10%-20% FNAC ≥ 10 mm Semeiotica ecografica Nodulo solido ipoecogeno con margini regolari, senza microcalcificazioni e/o estensione extratiroidea e/o forma taller-than-wide	Rischio intermedio (EU-TIRADS 4) Rischio di malignità 6%-17% FNAC > 15 mm Semeiotica ecografica Nodulo isoecogeno o iperecogeno con forma ovalare, margini regolari e assenza di reperti ecografici dell'alto rischio	Sospetto moderato (TR4) Rischio di malignità 5%-20% FNAC > 15 mm Semeiotica ecografica Nodulo solido ipoecogeno, non calcificato, con forma ovalare, margini regolari o irregolari o lobulati; Nodulo isoecogeno, non calcificato o mista, con forma taller-than-wide, margini irregolari o lobulati o foci iperecogeno puntiformi
Rischio alto	Rischio alto	Rischio alto	Rischio alto
Rischio alto Rischio di malignità 55%-90% FNAC ≥ 10 mm (5mm in casi selezionati) Semeiotica ecografica Nodulo con almeno una delle seguenti caratteristiche: -marcata ipoecogenicità -margini spiculati o lobulati -microcalcificazioni - forma taller-than-wide -diffusione extratiroidea -estensione extratiroidea -linfonodo patologico	Sospetto alto Rischio di malignità >70%-90% FNAC ≥ 10mm Semeiotica ecografica Nodulo solido ipoecogeno o nodulo parzialmente cistico con componente solida ipoecogena con almeno una delle seguenti caratteristiche: -margini irregolari (infiltrativi o microlobulati) -microcalcificazioni -forma taller-than-wide -calcificazioni periferiche con minima estensione tessuti molli -estensione extratiroidea	Alto rischio (EU-TIRADS 5) Rischio di malignità 26%-7% FNAC > 10 mm Semeiotica ecografica Nodulo con almeno una delle seguenti caratteristiche: -forma non ovalare -margini irregolari -microcalcificazioni -marcatamente ipoecogeno	Sospetto alto (TR5) Rischio di malignità ≥20% FNAC > 10 mm Semeiotica ecografica Nodulo solido ipoecogeno con almeno una delle seguenti caratteristiche: -forma taller-than-wide -estensione extratiroidea -foci iperecogeni puntiformi -nodulo solido isoecogeni con margini irregolari o lobulati e calcificazione periferica ad anello o foci iperecogeni puntiformi

L'esame citologico da agoaspirato con ago sottile rappresentano il cardine per la diagnosi di carcinoma papillifero della tiroide. Sono stati proposti diversi sistemi classificativi per la citologia tiroidea ed il più utilizzato nel territorio nazionale è il sistema classificativo italiano di citologia tiroidea rilasciato dalla SIAPEC-IAP (Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica – International Academy of Pathology) nel 2007 e modificato nel 2014. Tale sistema identifica cinque categorie citologiche descritte in **Tabella 3** (31).

TABELLA 3. CLASSIFICAZIONE ITALIANA 2014 DELLA CITOLOGIA TIROIDEA			
CODICE	CATEGORIE DIAGNOSTICHE	RISCHIO DI MALIGNITÀ (%)	AZIONE CLINICA SUGGERITA
TIR1	Non diagnostico	Non definito	Ripetere FNAC
TIR1C	Non diagnostico-cistico	Basso	Ripetere eventuale FNAC
TIR2	Non maligno/benigno	<3	Follow-up
TIR3A	Lesione indeterminata a basso rischio	<10	Ripetere FNAC/follow-up
TIR3B	Lesione indeterminata a basso rischio	15-30	Exeresi chirurgica
TIR4	Sospetto per malignità	60-80	Exeresi chirurgica con eventuale esame intraoperatorio
TIR5	Maligno	95	Exeresi chirurgica

Terapia

Trattamento chirurgico

Il trattamento iniziale del carcinoma papillifero della tiroide è chirurgico e prevede, sulla base della stadiazione preoperatoria, la tiroidectomia totale con o senza linfadenectomia oppure la loboistmectomia (1). La tiroidectomia totale è indicata nei seguenti casi: a) tumori di dimensioni > 4 cm, b) presenza di grossa estensione extratiroidea, c) evidenza clinica di metastasi linfonodali, d) evidenza clinica di metastasi a distanza. Gli interventi di tiroidectomia totale o loboistmectomia possono essere entrambi presi in

considerazione in pazienti con carcinoma papillifero della tiroide unifocale di dimensioni >1 cm e < 4 cm in assenza di estensione extratiroidea e metastasi linfonodali. L'intervento di loboistmectomia è sufficiente nei carcinomi papilliferi < 1 cm in assenza di estensione extratiroidea, metastasi linfonodali, neoplasia multifocale, precedente irradiazione nella regione del collo e carcinoma tiroideo familiare (1). La terapia chirurgica può richiedere, oltre all'asportazione della tiroide, anche l'exeresi chirurgica dei linfonodi del VI livello (linfonodi ricorrentiali) o dei linfonodi laterocervicali. Lo svuotamento ricorrentiale va eseguito in caso di metastasi clinicamente accertate e può essere considerato anche in presenza di un sospetto clinico. Lo svuotamento profilattico ricorrentiale è ancora argomento controverso e può essere considerato nei seguenti casi: a) lesioni cT3-cT4, b) coinvolgimento linfonodale laterocervicale (cN1b), c) qualora l'informazione clinica ottenuta possa risultare utile nel programmare la strategia terapeutica successiva. Lo svuotamento laterocervicale va eseguito solo nel caso di metastasi accertate pre-operatoriamente mentre non vi è indicazione ad intervento profilattico in assenza di coinvolgimento linfonodale (1, 32).

Terapia radiometabolica

L'intervento chirurgico di tiroidectomia totale è seguito dalla terapia radiometabolica con I131 (RAI) in casi selezionati sulla base dello stadio di malattia, delle caratteristiche istopatologiche della neoplasia, del rischio di recidiva di malattia, dei livelli di tireoglobulina e anticorpi anti-tireoglobulina e dell'ecografia del collo post-operatoria (1). Nei pazienti con basso rischio di recidiva ATA (T1a-b, N0-X, M0-X), la terapia radiometabolica con I131 non è generalmente raccomandata. In pazienti con rischio intermedio di recidiva (T1-2, N1a-N1b,

M0-X), la terapia radiometabolica dovrebbe essere considerata in particolare nei pazienti con età avanzata, tumori di grandi dimensioni, linfonodi macroscopici o clinicamente evidenti o presenza di estensione extranodale o istologia aggressiva o invasione vascolare. In pazienti ad alto rischio di recidiva (T3-4, qualsiasi N, qualsiasi M), la RAI è sempre raccomandata (1, 32).

Ormonoterapia

Nel paziente trattato chirurgicamente per carcinoma papillifero della tiroide la terapia con levotiroxina a dosaggio TSH-soppressivo ha la finalità di ridurre lo stimolo proliferativo del TSH sulle cellule tumorali e ridurre il rischio di recidiva (33). Il grado di soppressione del TSH dipende da differenti fattori quali la tipologia di trattamento iniziale, il rischio di recidiva ATA, la risposta alla terapia iniziale e durante il follow-up secondo le categorie ATA, l'età del paziente e le comorbidity. Il grado di soppressione del TSH desiderato sulla base di tali caratteristiche è schematizzato nella **Tabella 4A e 4B**.

TABELLA 4A. TARGET DI SOPPRESSIONE DEL TSH DOPO IL TRATTAMENTO INIZIALE					
RISCHIO ATA	Alto	Intermedio	Basso Tg indosabile e Ab-Tg negativi	Basso RAI, Tg bassa, Ab-Tg negativi	Basso Loboistmectomia
TSH	≤ 0.1	0.1-0.5	0.5-2	0.1-0.5	0.5-2
TSH Comorbidity e/o età>65 anni	0.1-0.5	0.5-2	0.5-2	0.5-2	0.5-2

Tg: tireoglobulina; Ab-Tg: anticorpi anti-tireoglobulina; RAI: terapia radiometabolica con I131

TABELLA 4A. TARGET DI SOPPRESSIONE DEL TSH DURANTE IL FOLLOW-UP			
RISPOSTA ALLA TERAPIA	Strutturale incompleta	Biochimica incompleta o indeterminata	Eccellente
TSH	≤ 0.1	0.1-0.5	0.5-2
TSH Comorbidity e/o età>65 anni	0.1-0.5	0.5-2	0.5-2

Altre terapie

In presenza di una persistenza o recidiva di malattia loco-regionale, è indicata l'exeresi chirurgica se la malattia è asportabile chirurgicamente. La radioterapia a fasci esterni e i trattamenti termoablativi possono essere considerati nei casi di malattia ad elevato rischio di recidiva locale (es. età avanzata, malattia macroscopica extratiroidea e/o malattia micro/macroscopica residua dopo chirurgia) non candidabile ad ulteriore chirurgia e/o terapia radiometabolica oppure nei casi di recidiva non asportabile chirurgicamente e/o refrattaria al radioiodio. In presenza di una malattia in stadio avanzato, metastatica e refrattaria al radioiodio, è indicata la terapia con gli inibitori delle tirosin-kinasi (TKI), che offrono un ruolo vantaggioso in termini di *progression-free survival* sebbene presentino numerosi effetti avversi (1).

Stadiazione

Il sistema di stadiazione utilizzato per la valutazione prognostica e della mortalità del carcinoma papillifero della tiroide è il sistema TNM che considera quattro parametri: l'età del paziente alla della diagnosi, la dimensione del tumore e l'invasione dei tessuti circostanti (parametro T), la presenza di metastasi linfonodali (parametro N) e di metastasi a distanza (parametro M). Tale sistema prevede 4 stadi in grado di definire e predire il rischio di mortalità correlato alla malattia. L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha pubblicato l'ottava edizione del sistema di stadiazione TNM per i carcinomi tiroidei differenziati, scarsamente differenziati, a cellule di Hürthle e anaplastici, che ha sostituito a partire da gennaio 2018 la precedente versione in uso dal 2009. I parametri valutati per la

stadiazione AJCC/TNM e le modifiche apportate dell'ottava edizione rispetto alla precedente versione sono schematizzati nella **Tabella 5** (34, 35).

TABELLA 5. SISTEMA DI STADIAZIONE TNM VII e VIII EDIZIONE							
VII edizione Età <45 anni				VIII edizione Età <55 anni			
I	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M0	I	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M0
II	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	II	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1
VII edizione Age ≥45 anni				VIII edizione Age ≥55 anni			
I	Tumore ≤2 cm limitato alla tiroide (T1)	Nx/N0	M0	I	Tumore ≤4 cm limitato alla tiroide (T1/T2)	Nx/N0	M0
II	Tumore ≤4 cm limitato alla tiroide (T2)	Nx/N0	M0	II	Tumore >4 cm (T3a) o con grossa estensione extratiroidea con sola invasione muscolare (T3b) o qualsiasi T con metastasi linfonodali (N1)		M0
III	Qualsiasi T con metastasi linfonodali del comparto centrale (N1a) o con minima estensione extratiroidea (T3) con o senza metastasi linfonodali del comparto centrale		M0	III	Qualsiasi T con grossa estensione extratiroidea con invasione dei tessuti sottocutanei, tessuti molli, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente (T4a)	Qualsiasi N	M0
IVa	Qualsiasi T con metastasi linfonodali laterocervicali (N1b) o con grossa estensione extratiroidea con invasione dei tessuti molli sottocutanei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente (T4a) con o senza metastasi linfonodali		M0	IVa	Qualsiasi T con grossa estensione extratiroidea con invasione fascia prevertebrale o arteria carotidea o vasi mediastinici (T4b)	Qualsiasi N	M0
IVb	Qualsiasi T con grossa estensione extratiroidea con invasione della fascia paravertebrale o dell'arteria carotide o dei vasi mediastinici (T4b)	Qualsiasi N	M0	IVb	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1
IVc	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	-	-	-	-

Stratificazione del rischio di recidiva

Il sistema TNM è utilizzato nella valutazione della prognosi del paziente con carcinoma differenziato della tiroide ma non consente di definire il rischio di recidiva di malattia, evento non trascurabile nel DTC. Per questo motivo, sulla base delle caratteristiche istopatologiche e cliniche della neoplasia, le linee guida ATA del 2015 raccomandano di classificare il paziente con DTC in tre categorie di rischio di recidiva. I parametri per definire le categorie di rischio sono riassunti in **Tabella 6**. La valutazione della categoria di rischio ATA e la sua integrazione con il sistema TNM consente di stimare in maniera più definita e personalizzata il reale rischio di recidiva (1).

TABELLA 6. CATEGORIE DI RISCHIO DI RECIDIVA ATA	
Rischio	Caratteristiche
BASSO	<p>Carcinoma papillifero con <u>tutte</u> le seguenti caratteristiche:</p> <ul style="list-style-type: none">- assenza di metastasi loco-regionali e a distanza- resezione macroscopica completa- assenza di invasione loco-regionale- il tumore non presenta un'istologia aggressiva (es. a cellule alte, insulare, a cellule colonnari, variante Hobnail, a cellule di Hürthle)- assenza di invasione vascolare- nessun uptake di ¹³¹I fuori dal letto operatorio alla prima scintigrafia (se eseguita)- cN0 oppure ≤5 micrometastasi linfonodali (N1 <2 mm) <p>Carcinoma papillare variante follicolare intratiroideo ed incapsulato Carcinoma follicolare ben differenziato, intratiroideo con invasione capsulare e senza/con minima invasione vascolare (< 4 foci) Microcarcinoma papillifero intratiroideo, unifocale/multifocale, inclusi i tumori con mutazione BRAF^{V600E}</p>
INTERMEDIO	<p>Presenza di ≥1 delle seguenti caratteristiche:</p> <ul style="list-style-type: none">- cN1 o presenza di > 5 metastasi linfonodali (pN1), di dimensioni <3 cm- Microcarcinoma papillifero multifocale con estensione extratiroidea e mutazione BRAF^{V600E}- invasione microscopica dei tessuti molli peritiroidei- presenza di invasione vascolare- presenza di aree avidi di ¹³¹I a livello del collo (al di fuori del letto operatorio) alla prima scintigrafia post-trattamento con radioiodio <p>Carcinoma con istologia aggressiva (es. a cellule alte, insulare, a cellule colonnari, variante hobnail, a cellule di Hürthle)</p>
ALTO	<p>Presenza di ≥1 delle seguenti caratteristiche:</p> <ul style="list-style-type: none">- estensione extratiroidea macroscopica- resezione incompleta con residuo macroscopico- presenza di metastasi a distanza- pN1 con lesioni linfonodali ≥3cm <p>Carcinoma follicolare con invasione vascolare estesa (>4 foci)</p>

Follow-up

Il follow-up post-chirurgico del paziente con carcinoma papillifero si basa su controlli periodici con dosaggio della Tireoglobulina (Tg), preferibilmente con metodo ultrasensibile, in corso di terapia con levotiroxina o dopo stimolo con rhTSH (TSH ricombinante), dosaggio degli anticorpi anti-tireoglobulina (Ab anti-Tg), ecografia del collo e, in casi selezionati, scintigrafia total body con ¹³¹I (WBS). In casi selezionati il follow-up prevede l'esecuzione di indagini di secondo livello come TC, 18-FDG PET, RMN e scintigrafia ossea (1). Sulla base dell'esito di tali indagini e della tipologia del trattamento iniziale, la risposta alla terapia durante il follow-up viene classificata in 4 categorie in accordo con i criteri delle linee guida ATA (**Tabella 7**). Ogni categoria di risposta alla terapia iniziale si associa ad un differente rischio di recidiva e di mortalità correlato alla patologia neoplastica che condiziona le tempistiche e la tipologia di indagini da utilizzare nel follow-up (**Tabella 8**). Infatti, la frequenza nei controlli durante il follow-up del paziente con carcinoma papillifero della tiroide dipendono dai parametri istopatologici di aggressività della neoplasia, dallo stadio di malattia, dal rischio di recidiva e dalla risposta al trattamento iniziale. Inoltre, il follow-up deve prevedere una continua e dinamica integrazione tra stratificazione iniziale del rischio di recidiva alla diagnosi, dati clinici, radiologici e laboratoristici del paziente che si acquisiscono nel tempo (1, 36).

TABELLA 7. CATEGORIE DI RISPOSTA ALLA TERAPIA INIZIALE			
Risposta alla terapia	Tiroidectomia totale con RAI	Tiroidectomia totale senza RAI	Lobectomia
ECCELLENTE	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale <0.2 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata <1 ng/ml	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale <0.2 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata <2 ng/ml	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale stabile <30 ng/ml
BIOCHIMICA INCOMPLETA	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale <1 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata <10 ng/ml, <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg in salita	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale <5 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata <10 ng/ml, <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg in salita <i>oppure</i> Livelli di Tg in salita con TSH stabile	Imaging negativo, <i>e</i> Tg basale ≥30 ng/ml, <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg in salita, <i>oppure</i> Livelli di Tg in salita con TSH stabile
STRUTTURALE INCOMPLETA	Evidenza strutturale o funzionale di malattia, indipendentemente dai valori di Tg o Ab-Tg	Evidenza strutturale o funzionale di malattia, indipendentemente dai valori di Tg o Ab-Tg	Evidenza strutturale o funzionale di malattia, indipendentemente dai valori di Tg o Ab-Tg
INDETERMINATA	Imaging non specifico <i>oppure</i> Lieve uptake di ¹³¹ I alla scintigrafia a livello del letto operatorio <i>oppure</i> Tg basale 0.2-1 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata 1-10 ng/ml, <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg stabili o in declino, senza malattia strutturale o funzionale	Imaging non specifico <i>oppure</i> Lieve uptake di ¹³¹ I alla scintigrafia a livello del letto operatorio <i>oppure</i> Tg basale 0.2-5 ng/ml, <i>oppure</i> Tg stimolata 2-10 ng/ml, <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg stabili o in declino, senza malattia strutturale o funzionale	Imaging non specifico <i>oppure</i> Livelli di Ab-Tg stabili o in declino, senza malattia strutturale o funzionale

Tg: tireoglobulina; Ab-Tg: anticorpi anti-tireoglobulina; RAI: terapia radiometabolica con I131

TABELLA 8. CORRELAZIONI TRA RISPOSTA ALLA TERAPIA, RISCHIO DI RECIDIVA E MORTALITA'		
RISPOSTA ALLA TERAPIA	OUTCOME A LUNGO TERMINE	MORTALITA'
ECCELLENTE	1%–4% recidiva	<1%
BIOCHIMICA INCOMPLETA	30% almeno evolvono spontaneamente in assenza di malattia 20% raggiungono lo stato di assenza di malattia dopo una terapia addizionale 20% sviluppano malattia strutturale	<1%
STRUTTURALE INCOMPLETA	50%–85% continuano ad avere persistenza di malattia nonostante terapia addizionale	11% (metastasi locoregionali) 50% (metastasi a distanza)
INDETERMINATA	15%–20% sviluppano malattia strutturale mentre nei restanti, i reperti aspecifici rimangono stabili o si risolvono	<1%

Prognosi

Il carcinoma papillifero presenta una prognosi generalmente favorevole con un tasso

di sopravvivenza che supera il 95% dei casi a 25 anni dalla diagnosi (37) e il trattamento radicale della neoplasia rende il 90% dei pazienti liberi da malattia neoplastica (38). Sebbene la mortalità del carcinoma papillifero sia relativamente bassa, il rischio di recidiva di questa neoplasia non è trascurabile e può arrivare al 25% durante il follow-up. La maggior parte delle recidive di malattia locali o a distanza si manifesta entro 5 anni dalla diagnosi sebbene, possono svilupparsi anche dopo oltre i 20 anni dal trattamento iniziale. I fattori che correlano con una prognosi peggiore e incrementano il rischio di recidiva includono l'età avanzata del paziente, il sesso maschile, le caratteristiche istopatologiche di aggressività della neoplasia (dimensioni, estensione extratiroidea, varianti aggressive, angioinvasione), presenza di metastasi linfonodali e/o a distanza, stadio di malattia e categoria di risposta alla terapia iniziale (39).

2.2 INDICE DI PROLIFERAZIONE Ki-67

L'antigene Ki-67 identifica una proteina nucleare, scoperta negli anni '80 dai ricercatori dell'università di Kiel, utilizzando un anticorpo monoclonale murino diretto contro un epitopo nucleare ottenuto da una linea cellulare derivata da linfoma di Hodgkin (40). La sua espressione risultava elevata nelle cellule in divisione cellulare e assente nelle cellule in fase quiescente (41), facendo ipotizzare un ruolo del Ki-67 come potenziale marcatore di proliferazione cellulare. Questa caratteristica ha avviato, successivamente, la ricerca scientifica verso la caratterizzazione biologica e clinica di questo marcatore proliferativo in ambito oncologico.

Caratteristiche della proteina Ki-67: struttura, regolazione e funzione

La proteina Ki-67 (pKi-67), codificata da un gene localizzato sul cromosoma 10, è una proteina non istonica nucleare e nucleolare della quale sono state identificate due isoforme con pesi molecolari di 345 e 395 kDa. Tale proteina ha un'emivita relativamente breve di circa 1-1,5 ore (42). L'antigene Ki-67 è presente durante le fasi attive del ciclo cellulare (fasi G1, S, G2 e M) mentre è assente nelle cellule in fase quiescente (G0). In particolare, i livelli di pKi-67 sono bassi nelle fasi G1 e S, raggiungono il picco nelle fasi precoci della mitosi e diminuiscono progressivamente nelle fasi successive della mitosi ovvero durante l'anafase e la telofase. Durante l'interfase l'antigene è presente esclusivamente nel nucleo mentre durante il processo di mitosi la proteina si trasferisce sulla superficie dei cromosomi (41, 43, 44). La quantità di pKi-67 è regolata da un fine equilibrio tra sintesi e degradazione. L'espressione di pKi-67 coincide con il passaggio delle cellule attraverso la

mitosi durante la quale la proteina subisce processi di fosforilazione e defosforilazione che la rendono suscettibile alla degradazione da parte delle proteasi, queste ultime controllate principalmente dal complesso ciclina/chinasi ciclina dipendente. Durante l'interfase la forma non fosforilata di pKi-67 forma un complesso con il DNA che suggerisce il suo ruolo nell'organizzazione della cromatina nucleolare nelle cellule in fase proliferativa mentre nella forma iperfosforilata la proteina Ki-67 non si lega al DNA durante la mitosi. La fosforilazione del Ki-67 ad opera della chinasi CDK1 è considerato il passaggio chiave per avviare l'ingresso della cellula in mitosi. Successivamente, via via che la cellula entra nello stato non proliferativo, la pKi-67 subisce una rapida degradazione (45). Le chinasi dipendenti dalla ciclina D (CDK4 e CDK6) hanno un ruolo predominante nella proliferazione cellulare e nella progressione verso la fase S del ciclo cellulare tramite la proteina del retinoblastoma. In condizioni normali il CDK4/6 forma un complesso con la ciclina D e avvia la fosforilazione della proteina della famiglia del retinoblastoma (Rb). La funzione della proteina Rb dipende dal suo stato di fosforilazione. Quando la proteina Rb non è fosforilata impedisce l'avanzamento del ciclo cellulare, inibendo i fattori di trascrizione E2F, tramite il blocco dei loro domini di attivazione e il reclutamento dell'istone deacetilasi. Quando la proteina Rb viene fosforilata avvia il rilascio di fattori di trascrizione associati a E2F che guidano l'espressione di geni responsivi a E2F e necessari per la progressione del ciclo cellulare. Alla fine della fase G1 la CDK2 si lega alla ciclina E e completa la fosforilazione di Rb portando a un'ulteriore attivazione della trascrizione mediata da E2F. Questo induce il passaggio dalla fase G1 alla fase S. Quando le cellule entrano nella fase S la proteina Rb diventa

iperfosforilata e rimane in questo stato per tutto il ciclo cellulare. L'Rb fosforilato ha un effetto regolatorio negativo sull'espressione genica formando un complesso con E2F. La proteina Ki-67 è legata alle proteine E2F ed è ipotizzato che nella patologia tumorale con l'iperespressione di E2F si assiste ad un accumulo di mRNA di Ki-67 (46, 47). Inoltre, in alcune neoplasie quali i tumori a cellule squamose del cavo orale e il carcinoma mammario è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione della proteina Ki-67 e quella della proteina p53, fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare con funzione di soppressore della proliferazione tumorale. Non è del tutto chiaro come p53 possa influenzare l'espressione della proteina Ki-67 ma è ipotizzabile che p53 inibisca l'espressione di Ki-67 interagendo con siti specifici presenti nella regione del promotore di Ki-67 (48). L'espressione della proteina Ki-67 durante il ciclo cellulare e la sua regolazione sono schematizzati nella **Figura 1**, adattata da Menon *et al.* (44).

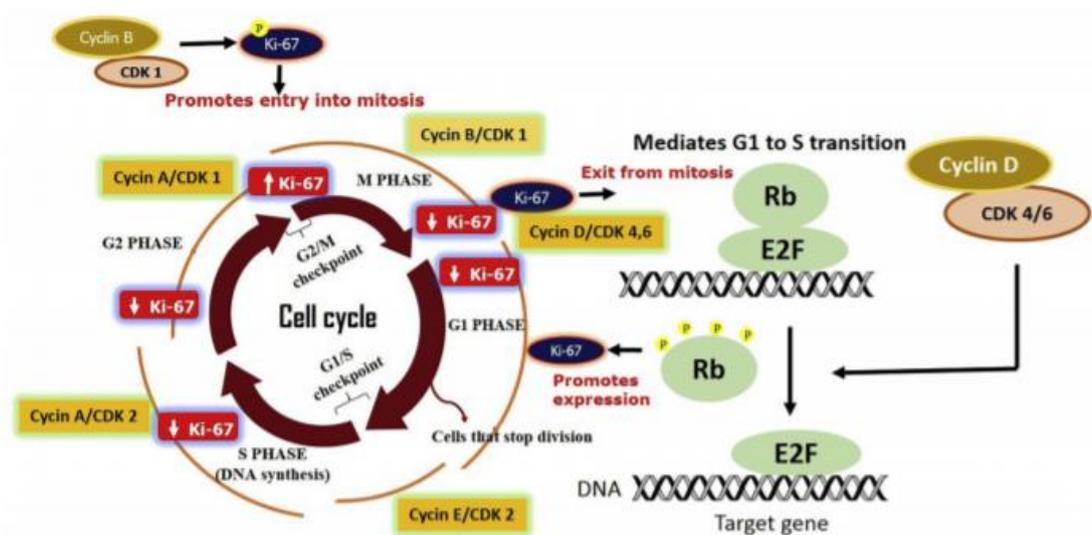


Figura 1. Espressione e regolazione di Ki-67 nel ciclo cellulare

Indice di proliferazione Ki-67 e implicazioni cliniche

Nelle ultime decadi, la valutazione dell'indice proliferativo Ki-67 ha attirato una crescente attenzione in ambito oncologico come marcatore diagnostico, prognostico e come potenziale bersaglio terapeutico in differenti neoplasie quali ad esempio quelle del polmone, della vescica, della mammella, nei tumori neuroendocrini e nei linfomi (49-53). Sebbene i dati sul Ki-67 come marker diagnostico di neoplasia siano scarsi e non conclusivi, quelli come marcatore prognostico sono maggiormente consolidati. Infatti, numerosi studi hanno mostrato una correlazione tra l'espressione del Ki-67 e il grado della neoplasia (54, 55). Altri dati in letteratura hanno evidenziato una correlazione tra Ki-67 e tasso di sopravvivenza della neoplasia, indipendentemente dal grado di differenziazione tumorale (56). In particolare, nel carcinoma dell'utero, del colon-retto e nel linfoma non Hodgkin è stato dimostrato un nesso tra il grado di espressione di Ki-67, il tasso di sopravvivenza e il rischio di recidiva della neoplasia (57, 58). L'utilità del Ki-67 come indicatore prognostico di neoplasia aggressiva trova conferma nella correlazione evidenziata tra espressione di tale marcatore e dimensioni del tumore primitivo, presenza di invasione linfonodale e/o metastasi a distanza (49, 59, 60). Inoltre, l'espressione di Ki-67 riflette il tasso di proliferazione del tumore, e la sua correlazione con un rischio più alto di progressione e di localizzazione a distanza della neoplasia indirizza verso un approccio terapeutico personalizzato sulla base del grado di espressione di tale marcatore (61). Sulla base di tali evidenze, si consolida sempre di più il ruolo dell'espressione di Ki-67, non solo nella valutazione complessiva dell'aggressività della neoplasia, ma anche nella personalizzazione dell'iter terapeutico (44).

2.3 RECETTORE PER IL FATTORE DI CRESCITA EPIDERMICO HER2

Caratteristiche del recettore HER2: struttura e funzione

HER2 (o ERB-2) è un recettore transmembrana dotato di attività tirosino-chinasica e codificato dal proto-oncogene HER-2/neu (C-erbB2), presente sul cromosoma 17q21. Appartiene alla famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico EGFR/ErbB, recettori essenziali nel controllo della proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare. Questa famiglia comprende quattro tipi di recettori: HER1 (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4). Tali recettori condividono una medesima struttura composta da un dominio extracellulare in grado di legare un ligando, un breve dominio transmembrana e un dominio intracellulare con attività tirosino-chinasica, la cui attivazione innesca una serie di eventi in grado di influire sulla biologia cellulare. La **Figura 2**, adattata da Zhang *et al.*, mostra i quattro membri della famiglia del recettore ErbB che condividono elevata omologia nel dominio extracellulare e nel dominio intracellulare con attività chinasi (62).

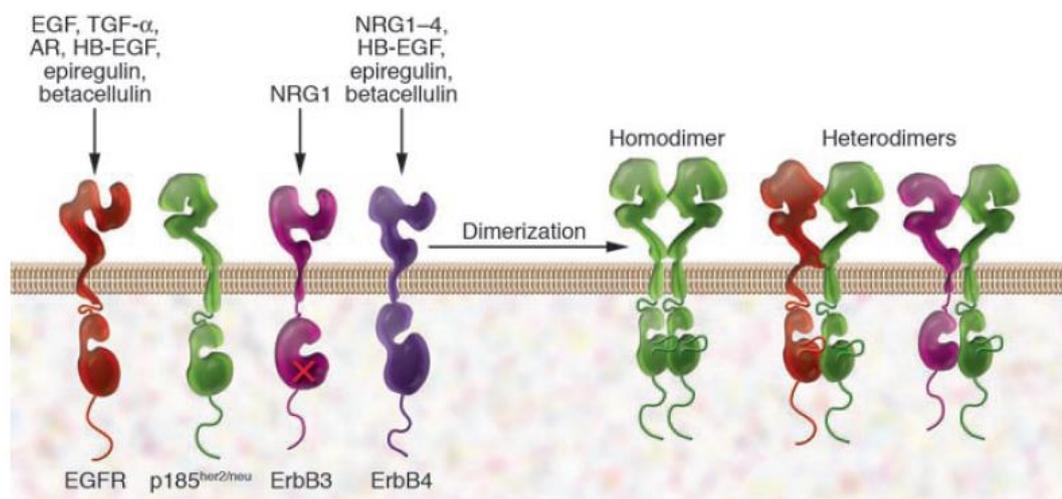


Figura 2. Recettori ErbB e loro ligandi

Nello specifico la **Figura 3**, adattata da Moasser *et al.*, mostra la struttura del recettore HER2 con il dominio extracellulare che presenta due siti di legame per il ligando (LD1 e LD2), due regioni ricche di cisteina (CR1 e CR2), un breve dominio transmembrana (TM), un dominio intracellulare con attività tirosino-chinasica (TK), una coda carbossile-terminale (CT) e numerosi siti di fosforilazione della tirosina (P) all'interno dei domini TK e CT (63).

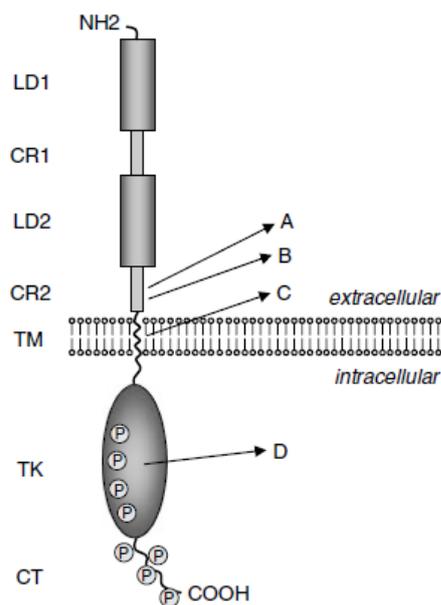


Figura 3. Struttura del recettore HER2

A differenza degli altri membri della famiglia che presentano un totale di 11 ligandi extracellulari, HER2 è recettore “orfano” di ligando e al momento non è stato riconosciuto un alcun ligando specifico. Sebbene sia un recettore orfano di ligando, HER2 rappresenta il partner ideale di eterodimerizzazione ed ha una funzione chiave in qualità di co-recettore universale per gli altri membri della famiglia HER. Infatti, HER2 si trova stabilmente in una conformazione attiva pronto ad interagire con gli altri recettori appartenenti alla famiglia dell'EGF, generando un eterodimero. Nello specifico, l'attivazione delle vie di segnalazione

mediate da HER2 avviene per eterodimerizzazione con EGFR o HER3 attivato dal ligando o per omodimerizzazione quando è presente in alte concentrazioni in caso di trasformazione neoplastica. La dimerizzazione provoca a sua volta l'autofosforilazione del residuo di tirosina nel dominio citoplasmatico del recettore e dà l'avvio alla trasduzione del segnale con attivazione delle vie metaboliche PI3K/Akt e Ras/Raf/MEK/MAPK, che regolano la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi cellulare (64). Gli eterodimeri contenenti HER2 hanno il potenziale mitogenico più elevato tra tutti i complessi HER e tra tutte le coppie, l'eterodimero HER2/HER3 è l'attivatore più potente della cascata di segnalazione PI3K/AKT tramite il legame della subunità p85 di PI3K a HER3 (65).

Espressione di HER2 e implicazioni cliniche

La sovraespressione dei recettori per il fattore di crescita epidermico HER2 svolge un ruolo fondamentale nel promuovere la proliferazione, l'invasione e la migrazione delle cellule tumorali (66). In particolare, la sovraespressione di HER2 determina un aumento di tutti i dimeri contenenti HER2: i dimeri di HER2/EGFR iperespressi guidano i processi di proliferazione e invasione tumorale, gli omodimeri HER2 iperespressi interrompono la polarità cellulare e i dimeri HER2/HER3 iperespressi attivano le vie di segnale coinvolte nei processi di proliferazione, sopravvivenza e invasione cellulare come mostrato in **Figura 4**, adatta da Moasser *et al.* (63).

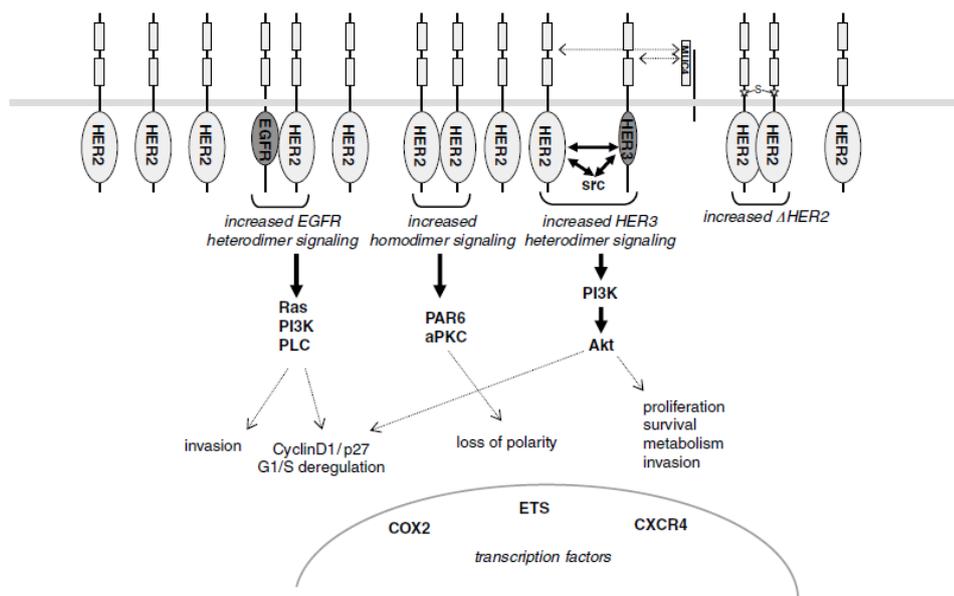


Figura 4. Schema delle anomalie di segnale derivanti dalla sovraespressione di HER2 e coinvolte nel meccanismo della carcinogenesi

L'iperpressione, l'amplificazione e le mutazioni di HER2 con la conseguente attivazione delle pathways cellulari anti-apoptotiche e proliferative sono coinvolta nel meccanismo di carcinogenesi di molte neoplasie ginecologiche (es. carcinoma mammario, ovarico, endometriale, cervice uterina) e non ginecologiche (es. tumori polmonari, gastrici e vescicali, colon-retto) (67, 68). I dati della letteratura hanno dimostrato che l'espressione aberrante di HER2 è associata ad una maggiore aggressività della neoplasia con un rischio aumentato di recidiva nonché di ridotta sopravvivenza (69, 70). Questi aspetti hanno indirizzato la ricerca scientifica verso lo sviluppo e l'utilizzo di terapie a bersaglio molecolare in grado di bloccare la pathway aberrante (68, 71, 72). In particolare, il ruolo di HER2 è stato ampiamente studiato nel carcinoma mammario dove si presenta iperespresso in circa il 15-20% dei carcinomi con conseguenti implicazioni prognostiche e terapeutiche. La sovraespressione di HER2 è principalmente attribuita all'amplificazione genica con

attivazione costitutiva della via di segnalazione intracellulare a valle di HER2. Il carcinoma mammario può possedere fino a 25-50 copie del gene HER2 e un aumento fino a 40-100 volte della proteina HER2 con conseguente iperespressione del recettore sulla superficie delle cellule tumorali (73). Sebbene l'amplificazione/iperespressione di HER2 peggiori significativamente la prognosi delle pazienti con carcinoma mammario, l'utilizzo di target therapy, ovvero di terapie mirate a bloccare tale pathway deregolato, ha permesso di migliorare la sopravvivenza di queste pazienti, riconducendo il tasso di sopravvivenza a valori simili a quelli della malattia HER2 negativa (74).

3. RAZIONALE DELLO STUDIO

L'acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi patogenetici che intervengono nel processo di trasformazione neoplastica ha indirizzato la ricerca scientifica verso l'identificazione di marcatori molecolari utili nella caratterizzazione della singola neoplasia, nella valutazione prognostica e nella personalizzazione dell'approccio terapeutico. Tuttavia, per alcuni marcatori molecolari non vi è ancora un'evidenza scientifica sufficiente per la loro applicazione nella pratica clinica, sia per la mancanza di standardizzazione delle metodiche di determinazione sia per le difficoltà metodologiche. Sebbene la grande maggioranza dei carcinomi papilliferi della tiroide sia caratterizzato da un andamento clinico indolente ed una prognosi favorevole, il rischio di recidiva non è trascurabile e meno del 5% di questi tumori presenta un andamento aggressivo rappresentando un problema di gestione clinico-terapeutica (37). Se la trasformazione neoplastica della cellula follicolare tiroidea prevede l'accumulo progressivo di mutazioni di geni coinvolti nei meccanismi di differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare, non sono del tutto noti i marcatori molecolari associati ad una maggiore aggressività clinica. E' ormai accertato che, in una notevole percentuale di casi, l'evento iniziale della carcinogenesi tiroidea sia costituito dalla mutazione mutazioni attivanti di BRAF o riarrangiamenti di alcuni geni quali RET/PTC e NTRK1. La valutazione di queste mutazioni genetiche, in particolare quella di BRAF, può essere di ausilio nell'identificare quel sottogruppo di carcinomi papilliferi clinicamente aggressivi e con un rischio maggiore di metastatizzazione nonché di sdifferenziazione (2). Tuttavia, anche i carcinomi tiroidei BRAF negativi possono presentarsi in forma aggressiva, rendendo perciò necessaria la ricerca di altri

marcatori affidabili per l'individuazione precoce di questi tumori. In questo ambito, l'applicazione delle esperienze effettuate in altre neoplasie potrebbe trovare utile applicazione anche nel carcinoma differenziato della tiroide. L'indice di proliferazione Ki-67 e il recettore per il fattore di crescita epidermico HER2 rappresentano due marcatori ampiamente studiati in ambito oncologico e, negli ultimi decenni, un numero crescente di studi ha valutato l'impatto clinico di questi due marcatori in diversi tumori di origine epiteliale (44, 67). L'iperespressione della proteina Ki-67 e l'amplificazione di HER2 sono state correlate all'attività proliferativa delle popolazioni cellulari tumorali nonché al grado di differenziazione, prospettando un loro utilizzo come marcatori di aggressività tumorale e come indicatori prognostici. Al contrario, pochi e discordanti dati sono disponibili sul ruolo di Ki-67 e di HER2 nel carcinoma differenziato della tiroide. In ambito tiroideo, l'espressione di Ki-67 mostra un valore limitato nella diagnosi differenziale tra lesioni maligne e benigne. Infatti, la percentuale di espressione di Ki-67 nelle lesioni maligne e benigne, come il carcinoma follicolare e l'adenoma, spesso risulta sovrapponibile. Inoltre, l'espressione di Ki-67 risulta generalmente bassa nel carcinoma differenziato della tiroide rispetto al carcinoma anaplastico e a quello scarsamente differenziato (75-79). Tuttavia, i dati sull'espressione del Ki-67 nel carcinoma papillifero della tiroide sono scarsi e mancano dati conclusivi sul significato clinico e prognostico di tale marcatore in questo ambito (80). I dati di un recente metanalisi hanno evidenziato una possibile associazione tra la percentuale di positività del Ki-67 e l'aggressività tumorale, sottolineando però una serie di bias legati all'eterogeneità dei diversi studi, soprattutto in merito al campione di pazienti esaminati e alle metodologie,

nonché ai cut-off utilizzati per la valutazione di tale indice proliferativo (80). Anche i dati della letteratura disponibili su HER2 nel carcinoma differenziato della tiroide sono scarsi e contraddittori. La prima descrizione dell'espressione del recettore HER2 nel carcinoma papillifero risale al 1992 (81). Successivamente, pochi studi hanno valutato l'espressione di questo recettore di membrana nel carcinoma differenziato della tiroide riportando un'ampia variabilità nell'espressione di HER2, con positività variabile dallo 0% al 70%, da attribuire in parte alle diverse metodologie utilizzate e alla eterogeneità nella interpretazione dei risultati (82-91). Per tale motivo, attualmente non vi è un consenso in letteratura sul potenziale valore clinico e prognostico di questo marcatore nel carcinoma differenziato della tiroide e in particolare nell'istotipo papillifero.

4. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di valutare **l'espressione dell'indice di proliferazione Ki-67** e del **recettore per il fattore di crescita epidermico HER2** in una casistica di carcinomi papilliferi della tiroide.

Gli obiettivi secondari sono stati quelli di correlare l'espressione di questi marcatori con i seguenti parametri:

- le **caratteristiche istopatologiche** (istotipo, dimensioni, multifocalità, estensione extratiroidea, angioinvasione, tiroidite cronica) e **cliniche** della neoplasia;
- la presenza di **metastasi linfonodali e/o a distanza**;
- lo **stadio** della malattia;
- le **categorie di rischio di recidiva** secondo i criteri delle linee guida ATA;
- le **categorie di risposta alla terapia** secondo i criteri delle linee guida ATA;
- la presenza di **ricidiva strutturale** di malattia durante il follow-up.

5. PAZIENTI E METODI

5.1 Gruppo di studio

Sono stati selezionati retrospettivamente 74 pazienti (età mediana: 48 anni; 52 donne e 22 uomini) sottoposti a tiroidectomia totale dal 2008 al 2018 con diagnosi istologica di carcinoma papillifero della tiroide. I 74 pazienti con carcinoma papillifero sono stati suddivisi in due sottogruppi: a) 56 pazienti con carcinoma papillifero variante classica; b) 18 pazienti con carcinoma papillifero variante non classica (15 variante follicolare, 1 variante oncocitaria, 1 variante Whartin-like, 1 variante a cellule colonnari). L'iter diagnostico e terapeutico e il successivo follow-up della patologia oncologica tiroidea sono stati eseguiti presso la UOC di Endocrinologia Universitaria dell'Ospedale SM Goretti di Latina e la UO di Endocrinologia, Diabetologia e Andrologia dell'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano.

Sono stati arruolati per lo studio i pazienti che rispettavano i seguenti criteri di inclusione: a) età maggiore dei 18 anni; b) firma del consenso informato; c) follow-up nel centro di arruolamento; d) disponibilità di dati clinici, biochimici e strumentali alla diagnosi e durante il follow-up; e) disponibilità di campione istologico sufficiente per la valutazione immunoistochimica. Sono stati esclusi dello studio i pazienti che presentavano i seguenti criteri di esclusione: a) presenza di aree di carcinoma follicolare, scarsamente differenziato e/o anaplastico all'istologico; b) perdita del paziente al follow-up; c) mancanza di dati clinici, biochimici e strumentali alla diagnosi e durante il follow-up; d) presenza di altre neoplasie in atto. Per ogni paziente del gruppo di studio sono stati raccolti retrospettivamente dalle relative cartelle cliniche ambulatoriali i dati anamnestici, antropometrici, clinici, biochimici e

strumentali. Le inclusioni in paraffina rappresentative della neoplasia tiroidea sono state selezionate dai relativi archivi dell'anatomia patologica dei centri coinvolti ed utilizzate per ottenere sezioni seriate. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina per confermare la diagnosi iniziale mentre le altre sezioni sono state utilizzate per l'indagine immunohistochimica. L'esame istologico definitivo è stato revisionato e confermato da due anatomo-patologici indipendenti. In particolare, per i carcinomi papilliferi variante follicolare un'attenta revisione è stata eseguita per ridefinire i casi di “*noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features*” (NIFTP), che sono stati esclusi dallo studio.

L'esame istologico revisionato prevedeva la descrizione dei seguenti parametri: a) istotipo di carcinoma papillifero; b) dimensioni della neoplasia; c) presenza o assenza di multifocalità; d) presenza o assenza di estensione extratiroidea; e) presenza o assenza di tiroidite cronica autoimmune; f) presenza o assenza di angioinvasione; g) presenza o assenza di metastasi linfonodali ove eseguita exeresi dei linfonodi.

5.2 Metodi

Stadiazione del carcinoma papillifero della tiroide

Tutti i pazienti arruolati nello studio sono stati stadiati dapprima con il sistema AJCC/TNM VII edizione del 2009 e, successivamente, con il sistema AJCC/TNM VIII edizione del 2018 (34, 35). I parametri utilizzati per definire il TNM e lo stadio di malattia con la VII e l'VIII edizione del TNM sono sintetizzati e confrontati nella **Tabella 5**.

Definizione del rischio di recidiva

Sulla base delle caratteristiche istopatologiche e cliniche il paziente con diagnosi di carcinoma papillifero della tiroide è stato classificato in tre categorie di rischio di recidiva (basso, intermedio e alto) in accordo con le linee guida ATA (1). I parametri utilizzati per definire la categoria di rischio di recidiva sono sintetizzati nella **Tabella 6**.

Definizione della risposta alla terapia

La risposta alla terapia iniziale è stata definita sulla base delle caratteristiche biochimiche e di imaging in 4 categorie (eccellente, biochimica indeterminata, biochimica incompleta, strutturale incompleta) in accordo con i criteri delle linee guida ATA (1). I parametri utilizzati per definire la risposta alla terapia sono sintetizzati nella **Tabella 7**.

Per la valutazione della risposta alla terapia, i pazienti sono stati inizialmente valutati 6 mesi dopo la terapia iniziale e poi monitorati durante il follow-up ogni 6-12 mesi. Pazienti con risposta iniziale incompleta o indeterminata alla prima valutazione clinica sono stati monitorati fino al raggiungimento di una risposta eccellente senza ulteriori trattamenti o è stato eseguito un secondo trattamento. I pazienti con iniziale risposta incompleta o indeterminata alla terapia che non hanno raggiunto una risposta eccellente, così come quelli sottoposti a secondo trattamento, sono stati classificati come pazienti con persistenza di malattia.

Definizione della recidiva

Nei pazienti con risposta eccellente alla terapia iniziale, la recidiva di malattia è stata definita come una nuova comparsa di malattia biochimica o strutturale durante il follow-up. La recidiva biochimica è stata diagnosticata in pazienti con Tg elevata (in soppressione o

dopo stimolo) e/o aumento progressivo dei livelli di anticorpi anti-Tg senza evidenza strutturale di malattia. La recidiva strutturale di malattia è stata definita attraverso i seguenti parametri: a) presenza di linfonodi sospetti nel comparto centrale o laterocervicale o tessuto sospetto nel letto tiroideo confermato dall'esame citologico mediante aspirazione con ago sottile e/o dosaggio della tireoglobulina su liquido di lavaggio dell'agoaspirato, b) imaging funzionale positivo con captazione nelle scansioni della scintigrafia total body con ¹³¹I (WBS) o della ¹⁸F-FDG-PET o altre immagini (TC, RMN) sospette di malattia metastatica con o senza conferma istologica/citologica (86, 92). Nello specifico, in questo studio sono state considerate solo le recidive strutturali di malattia.

Espressione dell'indice proliferativo Ki-67

L'espressione dell'indice proliferativo Ki-67 è stato valutato nel campione di tessuto tiroideo neoplastico ottenuto dai pazienti con diagnosi istologica di carcinoma papillifero della tiroide. Il tessuto tiroideo neoplastico fissato in formalina, tamponata neutra al 10% e incluso in paraffina, è stato tagliato in sezioni di 4 µm e colorato con ematossilina/eosina. L'attività proliferativa del Ki-67 è stata determinate mediante tecnica immunoistochimica (IHC), utilizzando specifico anticorpo monoclonale MIB-I (Leica Biosystem). La presenza di nuclei immunoreattivi per Ki-67 è stata valutata con tecnica automatizzata mediante microscopio a campo chiaro quantificandone la percentuale tramite apposito software. La stima della proliferazione cellulare è stata valutata utilizzando il *Ki-67 labeling index* (Ki-67 LI) definito come la percentuale di cellule immunoreattive sul totale di cellule neoplastiche presenti in 10 campi rappresentativi a forte ingrandimento. La presenza di nuclei

immunoreattivi per Ki-67 è stata espressa in percentuale e classificata in 4 gruppi: score <1%, score 1.1-3%, score 3.1-5%, score > 5%.

Espressione del recettore per fattore di crescita epidermico HER2

L'espressione del recettore di membrana HER2 è stata valutata nel campione di tessuto tiroideo neoplastico ottenuto dai pazienti con diagnosi istologica di carcinoma papillifero della tiroide. Il tessuto tiroideo neoplastico, fissato in formalina, tamponata neutra al 10% e incluso in paraffina, è stato tagliato in sezioni di 4 µm e colorato con ematossilina/eosina. L'espressione del recettore HER2 è stata determinata mediante tecnica immunoistochimica (IHC), utilizzando specifico anticorpo monoclonale e successivamente con procedura automatizzata mediante l'Hercep Test (Dako). In assenza di criteri standardizzati per il carcinoma della tiroide, l'intensità di colorazione e la localizzazione di espressione è stata valutata secondo il sistema di punteggio ASCO-CAP utilizzato per carcinoma della mammella (93). Nello specifico all'espressione dei recettori per il fattore di crescita epidermico HER2 è stato attribuito un punteggio da 0 a 3+ sulla base del pattern di colorazione come sintetizzato in **Tabella 8**: 0 e 1+ espressione negativa, 2+ espressione debolmente positiva, 3+ espressione positiva.

TABELLA 8. SCORE DI ESPRESSIONE DI HER2		
SCORE	IPERESPRESSIONE DI HER2	PATTERN DI COLORAZIONE
0	Negativo	Assenza di colorazione o colorazione della membrana rilevata in < 10% delle cellule tumorali
1+	Negativo	Colorazione della membrana incompleta debole/appena percettibile rilevata in > 10% delle cellule tumorali
2+	Debolmente positivo	Colorazione completa della membrana da debole a moderata rilevata in > 10% delle cellule tumorali
3+	Positivo	Colorazione forte e completa della membrana rilevata in > 10% delle cellule tumorali

In presenza di score 2+ è stata eseguito test di conferma con amplificazione genica mediante tecnica di ibridazione fluorescente in situ (FISH) per rilevare l'amplificazione del gene HER2. Il Kit HER2 FISH PharmDx™ (Dako) è stato utilizzato per eseguire la FISH. L'amplificazione genica è stata confermata in presenza di un rapporto gene HER2/centromero del cromosoma 17 (CEP17) pari a 2.0. Campioni di carcinoma mammario sono stati utilizzati come controlli positivi sia per la valutazione immunohistochimica che per la FISH.

6. ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati riportati come numero e percentuale per le variabili categoriche e come mediana e range interquartile (IQ1-IQ3) per le variabili continue. Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare le differenze tra le mediane dei gruppi. Il confronto fra gruppi è stato valutato mediante Fisher's Exact test o Chi-square ove appropriato. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Il software INSTAT GraphPad Prism 5.0 e Stata13 sono stati utilizzati per l'analisi statistica.

7. RISULTATI

Le caratteristiche antropometriche, istologiche e cliniche del gruppo di studio sono sintetizzate nella **Tabella 9**.

TABELLA 9. CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE E CLINICHE DEL GRUPPO DI STUDIO		
	CARATTERISTICHE	N° pazienti/valore
CARATTERISTICHE PAZIENTI	Totale	74
	Donne	52 (70%)
	Uomini	22 (30%)
	Età mediana alla diagnosi (IQ1-IQ3)	48 (38-60)
	Mediana follow-up, mesi (range)	43 (6-186)
CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE	Istologia:	
	Papillifero variante classica	56 (75.7%)
	Papillifero variante non classica	18 (24.3%)
	Mediana dimensioni neoplasia, mm (IQ1-IQ3)	14 (8-24)
	Presenza tiroidite cronica	16 (21.6%)
	Multifocalità	32 (43.2%)
	Estensione extratiroidea	33 (44.6%)
	Angioinvasione	20 (58.8%)
	Metastasi linfonodali, N1	30 (40.5%)
	Metastasi a distanza, M1	6 (8.1%)
TRATTAMENTO	Tiroidectomia totale	74 (100%)
	Terapia radiometabolica con 131I	65 (88%)
FOLLOW-UP	Recidiva:	11 (14.8%)
	Loco-regionale	6 (8.1%)
	Loco-regionale e a distanza	2 (2.7%)
	Distanza	3 (4%)
CATEGORIA DI RISCHIO ATA	Basso	17 (23%)
	Intermedio	49 (66.2%)
	Alto	8 (10.8%)
RISPOSTA ALLA TERAPIA	Eccellente	53 (71.6%)
	Biochimica incompleta	7 (9.5%)
	Strutturale incompleta	8 (10.8%)
	Indeterminata	6 (8.1%)
STADIO TNM VIII EDIZIONE	Stadio I	59 (79.7%)
	Stadio II	9 (12.2%)
	Stadio III	1 (1.3%)
	Stadio IV	5 (6.8%)

I pazienti sono stati dapprima stadiati con il sistema AJCC/TNM VII edizione e successivamente con il sistema AJCC/TNM VIII edizione. Utilizzando il TNM 7 i pazienti erano così distribuiti: 42 pazienti nello stadio I, 5 pazienti nello stadio II, 15 pazienti nello stadio III e 12 pazienti nello stadio 4. Applicando il TNM 8 un totale di 27/60 pazienti (25%)

sono stati sottostadiati con la seguente redistribuzione finale: 59 pazienti nello stadio I, 9 pazienti nello stadio II, 1 paziente nello stadio III e 5 pazienti nello stadio IV (**Figura 5**).

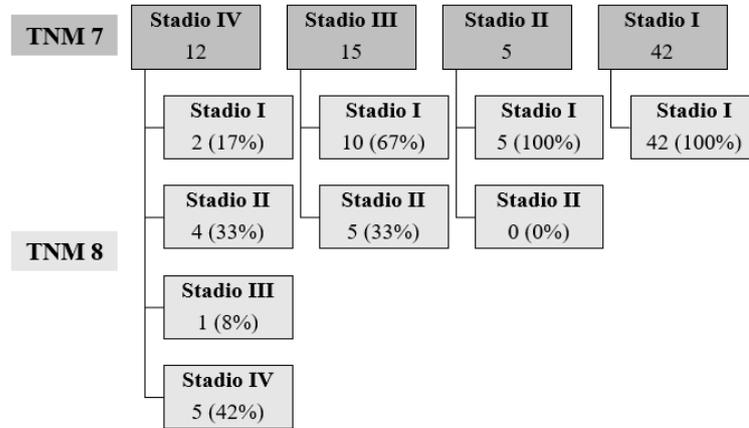


Figura 5. Ridistribuzione dei pazienti tra i vari stadi passando dal TNM VII al TNM VIII edizione

7.1 Espressione di HER2

L'espressione di HER2 è stata valutata in 60 pazienti. In 35/60 (58.4%) pazienti l'espressione è risultata negativa (score 0 e score 1+), in 20/60 (33.3%) debolmente positiva (score 2+) e in 5/60 (8.3%) positiva (score 3+) come mostrato in **Figura 6**.

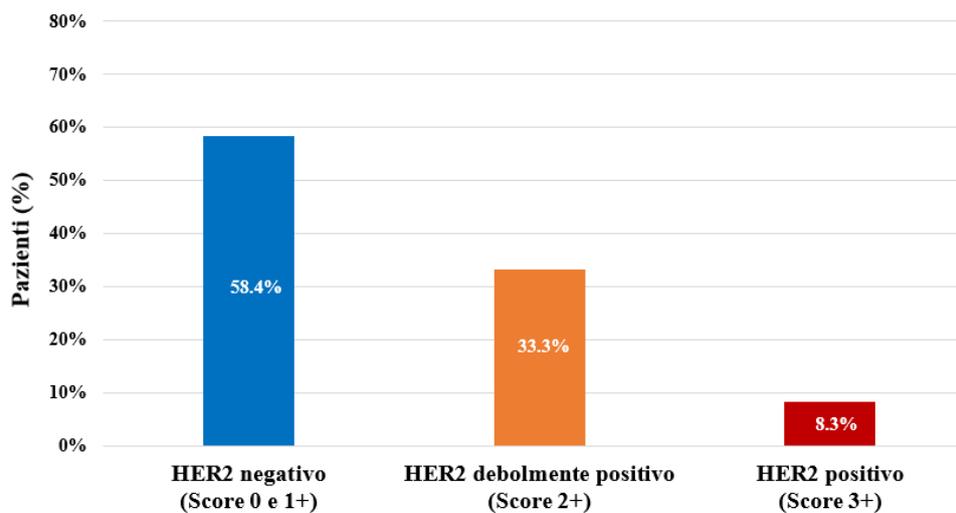


Figura 6. Espressione di HER2 in 60 pazienti del gruppo di studio

Nei pazienti con score 2+ è stato eseguito test di conferma mediante FISH. Nei 20 pazienti

con score 2+ la FISH ha confermato l'iperespressione di HER2 in 12/20 (60%) pazienti. Pertanto, l'iperespressione di HER2 è risultata negativa in 43/60 (71.7%) pazienti e positiva in 17/60 (28.3%) pazienti (**Figura 7**).

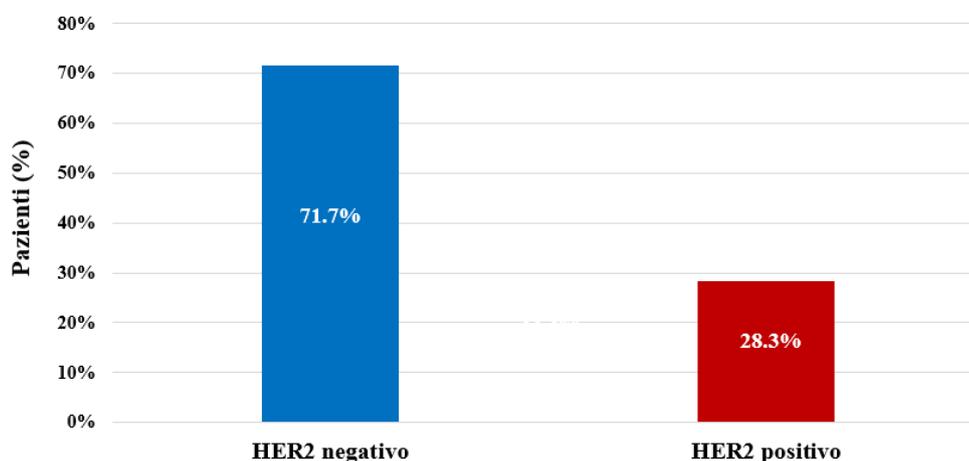


Figura 7. Espressione di HER2 dopo FISH nei 60 pazienti del gruppo di studio

Espressione di HER2 e caratteristiche istopatologiche

I 60 pazienti sottoposti ad analisi di HER2 sono stati confrontati in termini di espressione di HER2 e caratteristiche istopatologiche della neoplasia (dimensioni, tiroidite autoimmune, estensione extratiroidea, multifocalità, angioinvasione e variante istologica), presenza di metastasi linfonodali e/o a distanza e stadio di malattia. Le caratteristiche istopatologiche e lo stadio della neoplasia sono state paragonate nei due sottogruppi con espressione di HER2 negativa e positiva. Dall'analisi statistica non sono emerse differenze statisticamente significative nelle caratteristiche istopatologiche di aggressività della neoplasia tra i pazienti con iperespressione di HER2 e quelli negativi per HER2. I risultati di tale confronto sono descritti dettagliatamente nella **Tabella 10**.

TABELLA 10. CORRELAZIONI TRA ESPRESSIONE DI HER2 E CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE DELLA NEOPLASIA			
ESPRESSIONE HER2 IN 60 PTC	NEGATIVO (43 PTC)	POSITIVO (17 PTC)	p value
SESSO			
Uomini	9 (20.9 %)	6 (35.3%)	p=0.247
Donne	34 (79.1%)	11 (64.7%)	
ETA' ALLA DIAGNOSI (Mediana anni, IQ1-IQ3)	45 (37-56)	47 (35-71)	p=0.566
DIMENSIONI NEOPLASIA (Mediana mm, IQ1-IQ3)	15 (8-30)	19 (13-24)	p=0.506
ESTENSIONE EXTRATIROIDEA			
Presente	21 (48.8%)	9 (52.9%)	p=0.774
Assente	22 (51.2%)	8 (47.1%)	
TIROIDITE CRONICA LINFOCITARIA			
Presente	11 (25.6%)	2 (11.8%)	p=0.314
Assente	32 (74.4%)	15 (88.2%)	
MULTIFOCALITÀ			
Presente	21 (48.8%)	8 (52.9%)	p=0.901
Assente	22 (51.2%)	9 (47.1%)	
ANGIOINVASIONE			
Presente	10 (23.2%)	6 (35.3%)	p=0.274
Assente	33 (76.8%)	11 (64.7%)	
VARIANTE ISTOLOGICA PTC			
Classica	28 (65.1%)	14 (82.4%)	p= 0.330
Follicolare	13 (30.2%)	2 (11.8%)	
Altre varianti	2 (4.7%)	1 (5.9%)	
COINVOLGIMENTO LINFONODALE			
N1	17 (39.5%)	8 (47.1%)	p=0.594
N0	26 (60.5%)	9 (52.9%)	
METASTASI A DISTANZA			
Presenti	5 (11.6%)	1 (5.9%)	p=0.665
Assenti	38 (88.4%)	16 (94.1%)	
STADIO TNM 8			
Stadio I	34 (79%)	14 (82.3%)	p=0.154
Stadio II	6 (14%)	0 (0 %)	
Stadio III	0 (0%)	1 (5.9%)	
Stadio IV	3 (7%)	2 (11.8%)	

Espressione di HER2 e caratteristiche cliniche

Sulla base delle caratteristiche istopatologiche i 60 pazienti sono stati classificati nelle seguenti categorie di rischio di recidiva: 9/60 (15%) basso rischio, 45/60 (75%) rischio intermedio e 6/60 (10%) rischio alto. Analizzando la distribuzione dell'espressione di HER2 nelle differenti categorie di rischio non sono emerse differenze statisticamente significative (p=0.258) tra i pazienti HER2 positivi e quelli HER2 negativi (**Figura 8**).

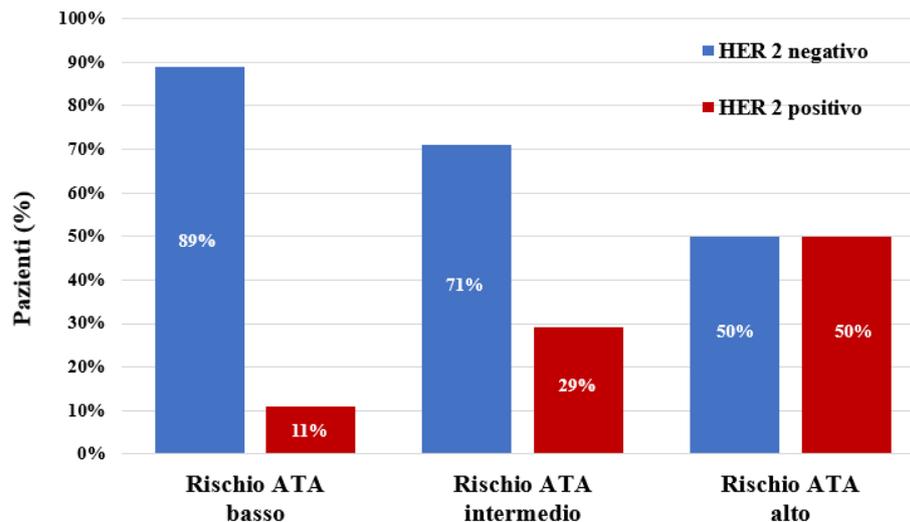


Figura 8. Distribuzione dell'espressione di HER2 nelle categorie di rischio di recidiva (p=0.258)

Sulla base della risposta alla terapia iniziale i 60 pazienti sono stati classificati come segue: 41/60 (68.3%) con risposta eccellente, 7/60 (11.7%) con risposta biochimica incompleta, 6/60 (10%) con risposta biochimica indeterminata e 6/60 (10%) con risposta strutturale incompleta. L'espressione di HER2 è risultata positiva in 12/41 pazienti (29.3%) con risposta eccellente, in 1/6 pazienti con risposta indeterminata (16.7%), in 1/7 pazienti con risposta biochimica incompleta (14.3%) e in 3/6 (50%) pazienti con risposta strutturale incompleta. Analizzando la distribuzione dell'espressione di HER2 nelle differenti categorie di risposta alla terapia iniziale non sono emerse differenze statisticamente significative (p=0.559) nei differenti sottogruppi in termine di espressione di HER2 (**Figura 9**).

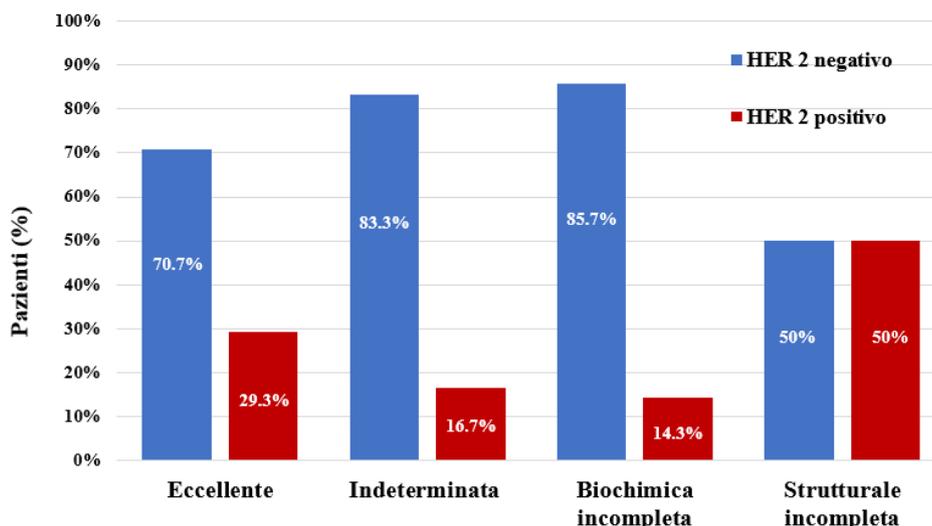


Figura 9. Distribuzione dell'espressione di HER2 nelle categorie di risposta alla terapia iniziale (p=0.559)

Espressione di HER2 e recidiva di malattia

Durante il follow-up, 9/60 (15%) pazienti hanno sviluppato una recidiva strutturale di malattia: 4/67 (6.7%) con recidiva loco-regionale, 2/60 (3.3%) con recidiva loco-regionale e a distanza e 3/60 (5%) con recidiva a distanza. Confrontando i pazienti con e senza recidiva strutturale di malattia non sono emerse differenze statisticamente significative (p=0.704) in termine di percentuale di espressione di HER2 (**Figura 10**).

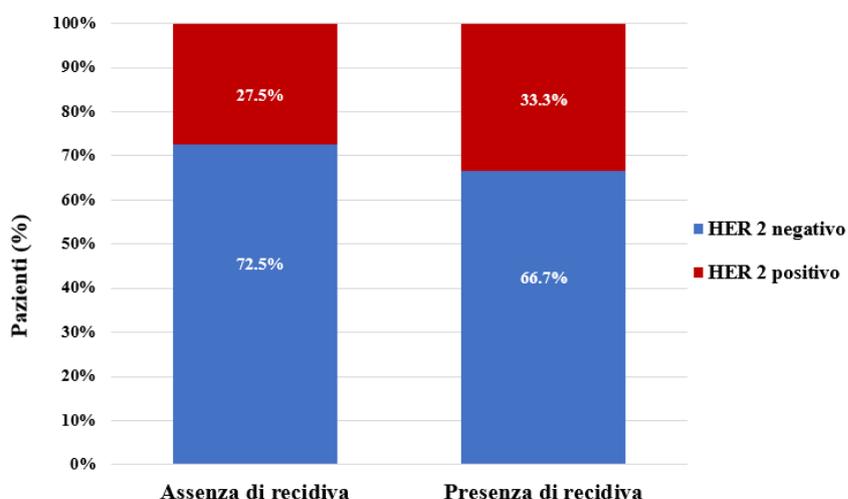


Figura 10. Distribuzione dell'espressione di HER2 nei pazienti con e senza recidiva di malattia (p=0.704)

7.2 Espressione dell'indice di proliferazione Ki-67

L'espressione dell'indice proliferativo Ki-67 è stata valutata in 67 pazienti del gruppo di studio. Tale espressione è risultata < 1% in 47/67 (70.1%) pazienti, tra 1.1-3% in 16/67 (23.9%) pazienti, tra 3.1-5% in 4/67 (6%) pazienti mentre in nessun campione istologico è stata rilevata un'espressione di Ki-67 superiore al 5% (**Figura 11**).

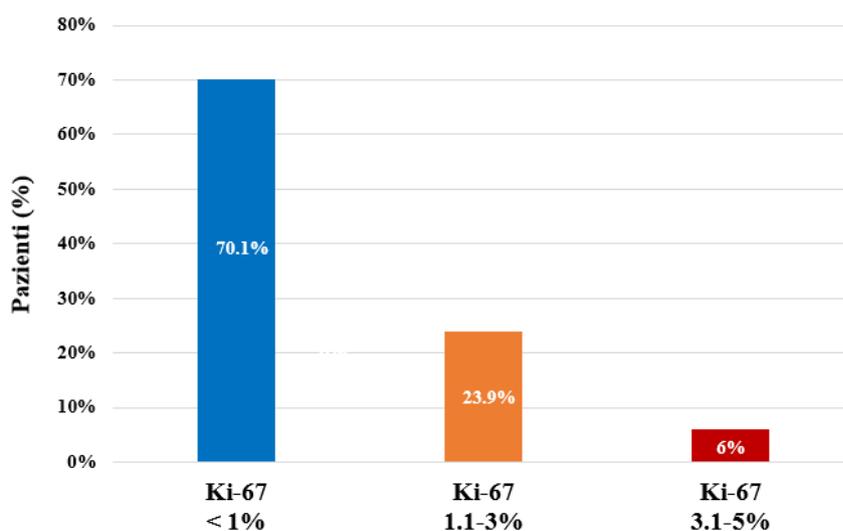


Figura 11. Espressione di Ki-67 nei 67 pazienti del gruppo di studio.

Espressione di Ki-67 e caratteristiche istopatologiche

I 67 pazienti sottoposti ad analisi dell'indice proliferativo Ki-67 sono stati confrontati in termini di percentuale di Ki-67 e caratteristiche istopatologiche della neoplasia (dimensioni, tiroidite autoimmune, estensione extratiroidea, multifocalità, angioinvasione e variante istologica), presenza di metastasi linfonodali e/o a distanza e stadio di malattia. Le caratteristiche istopatologiche e lo stadio della neoplasia sono state paragonate nei tre sottogruppi con differente espressione di Ki-67. Dall'analisi statistica non sono emerse differenze significative tra percentuale di espressione di Ki-67 e caratteristiche

istopatologiche di aggressività della neoplasia. I risultati di tale confronto sono descritti dettagliatamente nella **Tabella 11**.

TABELLA 11. CORRELAZIONI TRA INDICE PROLIFERATIVO KI-67 E CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE DELLA NEOPLASIA				
ESPRESSIONE KI-67 (67 PTC)	KI-67 <1% (47 PTC)	KI-67 1.1-3% (16 PTC)	KI-67 3.1-5% (4 PTC)	p value
SESSO				
Uomini	17 (36.2 %)	4 (25%)	0 (0%)	p=0.268
Donne	30 (63.8%)	12 (75%)	4 (100%)	
ETA' ALLA DIAGNOSI (Mediana anni, IQ1-IQ3)				
	50 (39-66)	47 (37-59)	46 (40-61)	p=0.801
DIMENSIONI NEOPLASIA (Mediana mm, IQ1-IQ3)				
	10 (8-25)	15 (13-25)	18 (12-24)	p=0.852
ESTENSIONE EXTRATIROIDEA				
Presente	19 (40.4%)	7 (43.7%)	3 (75%)	p=0.407
Assente	28 (59.6%)	9 (56.3%)	1 (25%)	
TIROIDITE CRONICA LINFOCITARIA				
Presente	10 (21.3%)	4 (25%)	1 (35%)	p=0.946
Assente	37 (78.7%)	12 (75%)	3 (75%)	
MULTIFOCALITÀ				
Presente	16 (34%)	11 (68.7%)	2 (50%)	p=0.051
Assente	31 (66%)	5 (31.3%)	2 (50%)	
ANGIOINVASIONE				
Presente	16 (34.8%)	2 (12.5 %)	0 (0%)	p=0.102
Assente	30 (65.2%)	14 (87.5%)	4 (100%)	
VARIANTE ISTOLOGICA PTC				
Classica	38 (80.9%)	10 (62.5%)	3 (75%)	p=0.638
Follicolare	7 (14.9%)	5 (31.3%)	1 (25%)	
Altre varianti	2 (4.3%)	1 (6.3%)	0 (0%)	
COINVOLGIMENTO LINFONODALE				
N1	16 (34%)	8 (50%)	1 (25%)	p=0.455
N0	31(66%)	8 (50%)	3 (75%)	
METASTASI A DISTANZA				
Presenti	5 (10.6%)	1 (6.2%)	0 (0%)	p=0.705
Assenti	42 (89.4%)	15 (93.8%)	4 (100%)	
STADIO TNM 8				
Stadio I	36 (76.6%)	13 (81.3%)	4 (100%)	p=0.952
Stadio II	6 (12.8%)	2 (12.5%)	0 (0%)	
Stadio III	1 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	
Stadio IV	4 (8.5%)	1 (6.2%)	0 (0%)	

Sulla base del parametro della multifocalità all'esame istologico i pazienti sono stati classificati come segue: 29/67 pazienti con neoplasia multifocale e 38/67 con neoplasia unifocale. Analizzando dettagliatamente la distribuzione dell'indice proliferativo Ki-67, i pazienti con neoplasia multifocale presentavano nel 55% (16/29) dei casi un Ki-67 <1% e nel restante 45% (13/29) dei casi un Ki-67 >1.1%, mentre i pazienti con neoplasia unifocale

mostravano nell'82% (31/38) dei casi un Ki-67 <1% e nel restante 18% (7/38) un Ki-67 >1.1% con una differenza statisticamente significativa ($p=0.0304$) nei due sottogruppi (Figura 12).

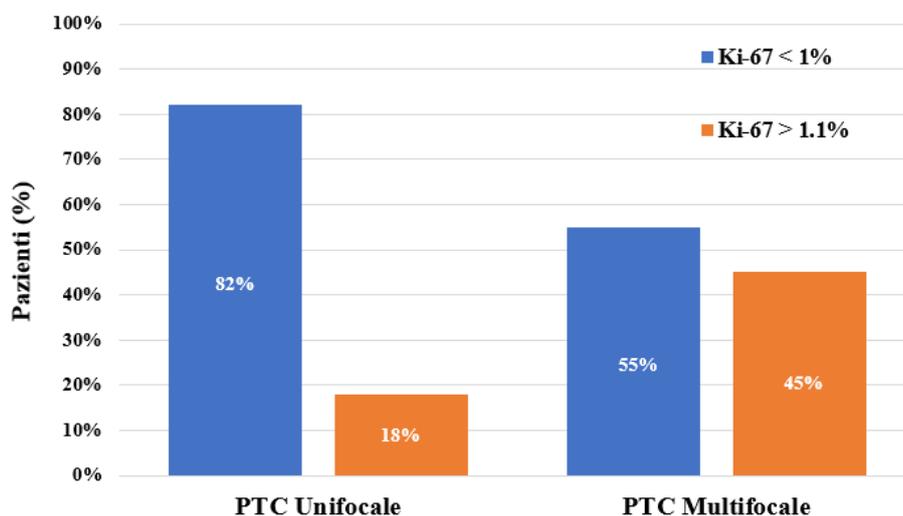


Figura 12. Distribuzione del Ki-67 nei pazienti con PTC unifocale e multifocale ($p=0.0304$)

Indice proliferativo Ki-67 e caratteristiche cliniche

In base alle caratteristiche istopatologiche i 67 pazienti sono stati classificati nelle seguenti categorie di rischio di recidiva: 17/67 (25.4%) basso, 42/67 (62.7%) intermedio e 8/67 (11.9%) alto rischio. Analizzando la distribuzione dell'indice proliferativo Ki-67 nelle differenti categorie di rischio non sono emerse differenze statisticamente significative nei differenti sottogruppi (Figura 13) ad eccezione dei pazienti classificati a rischio di recidiva ATA intermedio-alto che hanno mostrato più frequentemente un'espressione di Ki-67 >1.1% rispetto ai pazienti a basso rischio di recidiva ($p=0.014$).

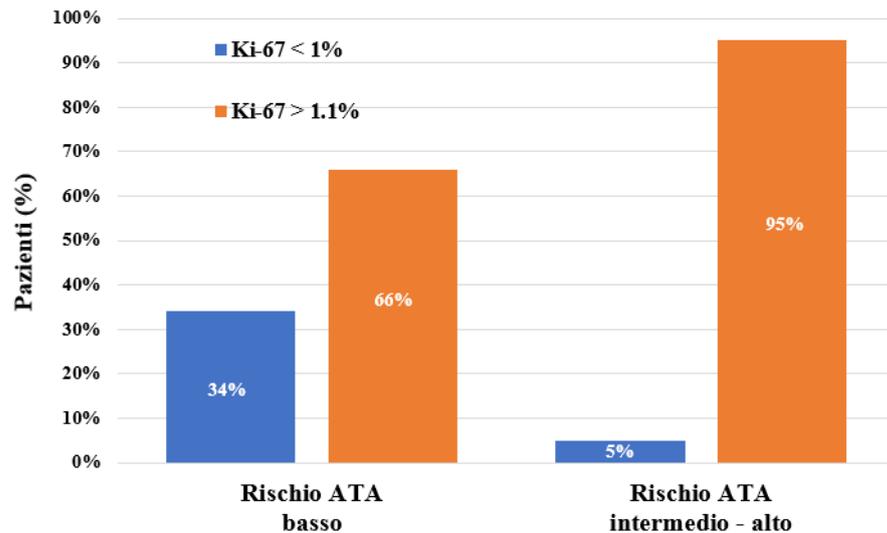


Figura 13. Distribuzione del Ki-67 nelle categorie di rischio di recidiva ($p=0.014$)

In base alla risposta alla terapia iniziale i 67 pazienti sono stati classificati come segue: 46/67 (68.7%) con risposta eccellente, 8/67 (11.9%) con risposta biochimica indeterminata, 6/67 (9%) con risposta biochimica incompleta, 7/67 (10.4%) con risposta strutturale incompleta. Nel gruppo con risposta eccellente l'espressione di Ki-67 risultava < 1% in 33/46, tra 1.1-3% in 10/46 e tra 3.1-5% in 3/46 pazienti. Nel gruppo con risposta indeterminata l'espressione di Ki-67 risultava < 1% in 5/8, tra 1.1-3% in 2/8 e tra 3.1-5% in 1/8 pazienti. Nel gruppo con risposta biochimica incompleta l'espressione di Ki-67 risultava < 1% in 5/6, tra 1.1-3% in 1/6 pazienti. Nel gruppo con risposta strutturale incompleta l'espressione di Ki-67 risultava < 1% in 4/7, tra 1.1-3% in 3/6 pazienti. Nessun paziente con risposta biochimica e strutturale incompleta presentava un'espressione di Ki-67 > 3.1%. Nelle differenti categorie di risposta alla terapia non sono emerse differenze statisticamente significative ($p=0.358$) in termine di percentuale di espressione di Ki-67 (**Figura 14**).

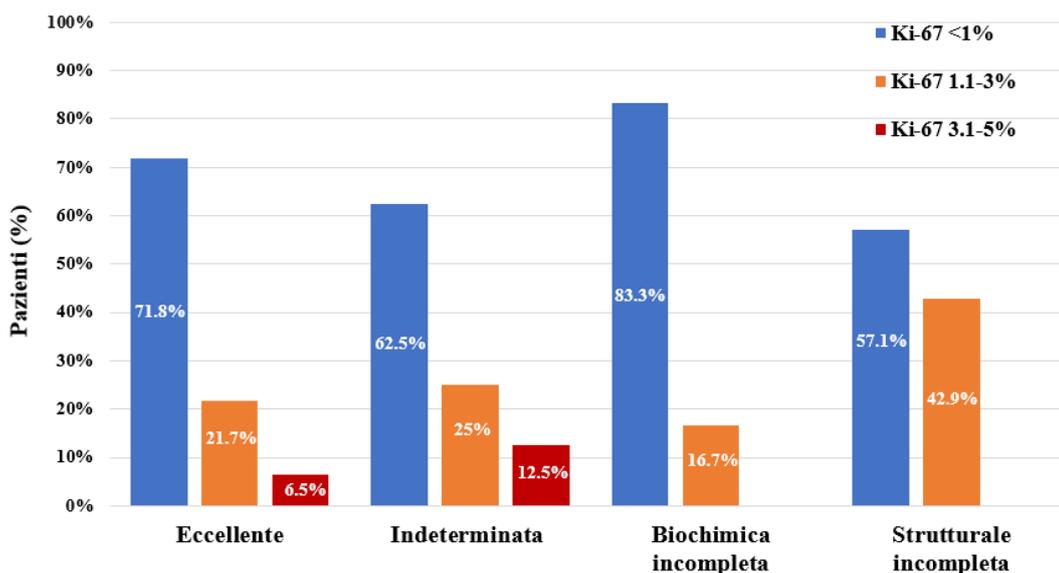


Figura 14. Distribuzione del Ki-67 nelle differenti categorie di risposta alla terapia (p=0.358)

Indice proliferativo Ki-67 e recidiva di malattia

Durante il follow-up, 10/67 (14.9%) pazienti hanno sviluppato una recidiva strutturale di malattia: 5/67 (7.5%) con recidiva loco-regionale, 2/67 (3%) con recidiva loco-regionale e a distanza e 3/67 (4.5%) con recidiva a distanza. Nei pazienti con o senza recidiva di malattia non sono emerse differenze statisticamente significative (p=0.642) in termine di percentuale di espressione del Ki-67 (**Figure 14**).

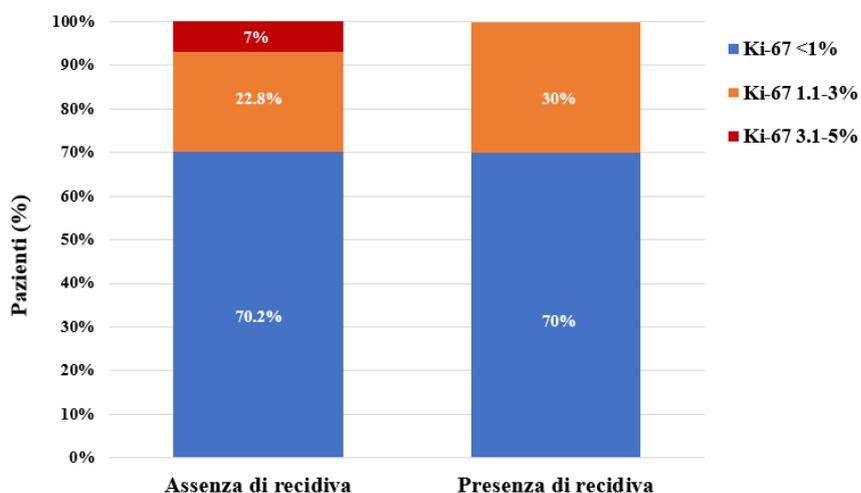


Figura 14. Distribuzione del Ki-67 nei pazienti con o senza recidiva di malattia (p=0.642)

8. DISCUSSIONE

In questo studio, condotto su pazienti con carcinoma papillifero della tiroide, nel 70% circa del campione è stato rilevato un basso indice proliferativo Ki-67 e in circa il 28% dei campioni istologici è stata evidenziata un'iperpressione del recettore per il fattore di crescita epidermico HER2. Per entrambi i marcatori non sono emerse delle correlazioni tra loro iperpressione e parametri istopatologici e clinici di aggressività della neoplasia, ad eccezione di una maggiore attività proliferativa riscontrata nei pazienti classificati a rischio intermedio-alto di recidiva e in quelli con neoplasia multifocale.

Il carcinoma papillare è la neoplasia tiroidea più comune e mostra generalmente una natura indolente con una prognosi eccellente, nonostante il rischio non trascurabile di metastasi linfonodali all'esordio e di recidiva strutturale durante il follow-up (37). Il rischio di recidiva e la prognosi del paziente con PTC dipendono da fattori già ampiamente studiati ovvero l'età avanzata, il sesso maschile, la presenza di massiva estensione extratiroidea, l'istotipo tumorale, la presenza di metastasi linfonodali e/o a distanza. L'attività proliferativa cellulare è uno dei marcatori utilizzati in ambito oncologico per definire l'aggressività della neoplasia, predire il rischio di recidiva, valutare la prognosi complessiva e indirizzare la strategia terapeutica (51, 53, 94, 95). Tale attività può essere valutata studiando l'espressione dell'indice proliferativo Ki-67, marker espresso nei nuclei delle cellule in fase proliferativa e assente in quelle in fase G0 di quiescenza (96). In ambito tiroideo, pochi dati sono disponibili sull'attività proliferativa delle cellule tumorali e sulle sue correlazioni cliniche e prognostiche. In questo studio il 70% circa dei pazienti con PTC presentava una bassa attività proliferativa

con un'espressione di Ki-67 $\leq 1\%$ e soltanto il 6% del campione mostrava un indice proliferativo $> 3\%$. Risultati analoghi sono stati evidenziati in uno studio di Ito *et al.*, condotto su una casistica più ampia di 371 pazienti con carcinoma papillifero della tiroide, nel quale il 57% del campione presentava un'espressione di Ki-67 $\leq 1\%$ e soltanto nel 10% del campione questa risultava superiore al 3% (97). Al contrario, dati discordanti sono emersi nello studio di Miyauchi *et al.* che ha dimostrato nel 20% di pazienti con PTC un indice proliferativo Ki-67 $> 5\%$ (98). Un ulteriore parametro che consente, indirettamente, di studiare l'attività proliferativa e l'aggressività della neoplasia in ambito oncologico è la valutazione dell'espressione del recettore di membrana HER2 appartenente alla famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico. La sua sovraespressione svolge un ruolo fondamentale nel promuovere la proliferazione, l'invasione e la migrazione delle cellule tumorali tramite l'attivazione delle vie metaboliche PI3K/Akt e Ras/Raf/MEK/MAPK (65) e rappresenta un fattore prognostico e predittivo di risposta alle terapie a bersaglio molecolare (62). Dai risultati di questo studio è emerso che circa un terzo dei pazienti con PTC presentava un'iperespressione del recettore di membrana HER2. Un risultato simile è stato riportato da Sugishita *et al.*, che ha analizzato l'espressione di HER2 in 61 pazienti con PTC riscontrando una sua amplificazione nel 23% del campione (89). In uno studio più recente, condotto sui carcinomi papilliferi e follicolari della tiroide, l'iperespressione di HER2 è stata evidenziata nel 18% dei tumori papilliferi con un tasso di espressione significativamente maggiore nell'istotipo follicolare (99). Al contrario, dati discordanti sono emersi in altri studi che hanno riportato una positività per HER2 variabile dal 7% al 52% dei carcinomi papilliferi della

tiroide (82, 90). La discordanza tra i dati della letteratura è da correlare in parte alla differente metodologia e alla eterogeneità nei criteri utilizzati per definire l'iperespressione di HER2 nel carcinoma tiroideo. In alcuni studi, infatti, sono stati considerati HER2 positivi campioni istologici con pattern immunohistochimico di espressione citoplasmatica anziché di membrana (82, 83, 87, 91, 100, 101) e questo rende i risultati difficilmente confrontabili tra loro. Al contrario, nel nostro studio la determinazione dell'espressione di HER2 è stata eseguita con un metodo riproducibile e già ampiamente standardizzato per il carcinoma della mammella (93).

Applicando le esperienze e i dati disponibili nell'ambito di altre neoplasie, è ipotizzabile che nel carcinoma papillifero della tiroide un'elevata attività proliferativa e un'iperespressione di HER2 possano correlare con le caratteristiche istopatologiche e cliniche di aggressività della neoplasia già ampiamente caratterizzate (102-106). I pochi dati disponibili in letteratura hanno evidenziato una correlazione tra un elevato indice proliferativo Ki-67 e caratteristiche come l'età avanzata alla diagnosi, l'estensione extratiroidea, le dimensioni della neoplasia, le varianti aggressive del carcinoma papillifero, il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi a distanza (97, 98). Questi dati non hanno trovato conferma nel nostro lavoro, nel quale non sono emerse correlazioni tra attività proliferativa della neoplasia e caratteristiche istopatologiche e cliniche di aggressività, fatta eccezione per una maggiore espressione di Ki-67 nei pazienti con neoplasia multifocale e in quelli classificati a rischio intermedio-alto di recidiva in accordo con i criteri dell'ATA. La multifocalità è una caratteristica comune del PTC e indica l'esistenza di più focolai tumorali

all'interno del parenchima ghiandolare tiroideo (107, 108). I meccanismi patogenetici responsabili del processo di multifocalità non sono del tutto noti. Tale caratteristica potrebbe essere il risultato della disseminazione attraverso i vasi linfatici intratiroidi (109) oppure l'esito della trasformazione neoplastica multicentrica (110) che può presentare riarrangiamenti genetici indipendenti dal tumore dominante (111) e iniziare molto prima della carcinogenesi del PTC unifocale primario (110). La presenza di multifocalità, e in particolare quella di più di 3 foci di PTC, rappresenta un fattore prognostico negativo e correla con un rischio maggiore di localizzazione linfonodale, anche in presenza di microcarcinomi papilliferi (37, 112). L'insieme di questi dati suggerirebbe un approccio chirurgico più radicale al carcinoma multifocale, preferendo la tiroidectomia totale o subtotale al fine di ridurre il rischio di recidiva e migliorare l'intervallo libero da malattia (37, 113). Sulla base dei risultati del nostro studio è possibile ipotizzare che nei pazienti con diagnosi istologica di PTC sottoposti ad intervento di lobotomectomia, la presenza di livelli di Ki-67 >1.1% possa incrementare il rischio di neoplasia multifocale e giustificare un approccio chirurgico più radicale. Sulla base delle caratteristiche istopatologiche della neoplasia, le linee guida ATA collocano il carcinoma differenziato della tiroide nelle categorie di rischio basso, intermedio e alto di recidiva (1). Nei pazienti considerati a basso rischio la probabilità di recidiva è inferiore all'1% e può raggiungere il 50% in quelli classificati ad alto rischio (1). Tale aspetto potrebbe giustificare la maggiore attività proliferativa in termini di Ki-67 evidenziata in questo studio nei pazienti a rischio intermedio-alto rispetto a quelli a basso rischio di recidiva. Questo dato, però, non ha trovato conferma nei pazienti con recidiva strutturale di malattia durante il

follow-up che non hanno mostrato differenze in termini di attività proliferativa rispetto a quelli senza ricorrenza di malattia. Anche il ruolo di HER2 come marcatore di aggressività e indicatore prognostico nel carcinoma differenziato della tiroide è ancora controverso. Alcuni autori hanno dimostrato un'iperespressione di HER2 nel carcinoma differenziato della tiroide multifocale, con estensione extratiroidea, con metastasi a distanza e/o linfonodali e con recidive durante il follow-up (83, 99, 114, 115). Al contrario, queste evidenze non sono state confermate nel nostro studio, nel quale l'espressione di HER2 è risultata indipendente dalle caratteristiche istopatologiche e cliniche di aggressività della neoplasia. Risultati sovrapponibili sono emersi in altri studi, che non hanno evidenziato associazioni tra l'iperespressione di HER2 e le dimensioni del tumore, la presenza di estensione extratiroidea, i sottotipi istologici di carcinoma papillare della tiroide, il coinvolgimento linfonodale, lo stadio della malattia e la sopravvivenza (83, 86, 89, 90, 99, 116).

Sebbene il carcinoma papillifero della tiroide sia spesso una malattia indolente, il rischio di recidiva non è trascurabile e può arrivare fino al 30%, con recidive linfonodali nel 20% dei casi e più raramente con recidive a distanza nel 10% dei casi (117-119). In questo studio il 14% circa dei pazienti ha sviluppato una recidiva strutturale loco-regionale e/o a distanza durante il follow-up. La comparsa di recidive strutturali impatta negativamente sulla prognosi con una mortalità che può arrivare fino all'11% nei pazienti con recidiva loco-regionale e risposta incompleta a trattamenti aggiuntivi, e può superare il 55% nei pazienti con metastasi a distanza (1, 120). Questo potrebbe far ipotizzare che tali neoplasie presentino una maggiore attività proliferativa e un'iperespressione di HER2, sebbene i dati disponibili

nel carcinoma differenziato della tiroide siano ad oggi ancora discordanti (98, 121). I risultati di questo studio, rispetto a quanto atteso, non hanno evidenziato differenze significative in termini di percentuale di espressione di Ki-67 e/o iperespressione di HER2 nei pazienti con recidiva strutturale di neoplasia. L'assenza di decessi tumore-correlato nel gruppo di studio potrebbe in parte giustificare il basso rate proliferativo e l'assenza di iperespressione di HER2 nel campione analizzato. Allo stesso tempo, l'insieme di questi dati suggerisce l'esistenza di altri fattori, indipendenti dall'attività proliferativa, in grado di influenzare il comportamento aggressivo della neoplasia e da ricercare verosimilmente nel differente profilo genetico del carcinoma tiroideo.

Questo studio presenta dei limiti correlati alla ridotta numerosità del campione analizzato, alla mancanza di dati sul profilo genetico della neoplasia e all'assenza nel gruppo di studio di decessi per neoplasia tiroidea, che non permette di correlare l'espressione di tali parametri con la prognosi complessiva e la mortalità tumore-correlata.

In conclusione, nel carcinoma papillifero della tiroide è presente un'iperespressione di HER2 in un terzo dei casi e circa il 70% dei tumori papilliferi presenta un basso indice proliferativo Ki-67. Entrambi i marcatori non sembrerebbero rappresentare degli indicatori predittivi di aggressività istopatologica e clinica della neoplasia tiroidea. Ulteriori studi su un campione più ampio sono certamente necessari per definire il ruolo di questi due marcatori nel carcinoma differenziato della tiroide.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.
2. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet*. 2016;388(10061):2783-95.
3. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;2013:965212.
4. Iglesias ML, Schmidt A, Ghuzlan AA, Lacroix L, Vathaire F, Chevillard S, et al. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(2):180-7.
5. Axelrad AA, Leblond CP. Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer*. 1955;8(2):339-67.
6. Zimmermann MB, Galetti V. Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies. *Thyroid Res*. 2015;8:8.
7. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(4):286-95.
8. Resende de Paiva C, Grønhoj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C. Association between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer in 64,628 Patients. *Front Oncol*. 2017;7:53.
9. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(3):343-9.
10. Fiore E, Rago T, Latrofa F, Provenzale MA, Piaggi P, Delitala A, et al. Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma: role of TSH and of treatment with L-thyroxine. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(4):429-37.
11. Noureldine SI, Tufano RP. Association of Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(1):21-5.
12. Marcello MA, Cunha LL, Batista FA, Ward LS. Obesity and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):T255-71.
13. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*. 2011;24 Suppl 2:S1-9.
14. Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary thyroid carcinoma variants. *Head Neck Pathol*. 2011;5(1):51-6.
15. Omur O, Baran Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;90(3):233-52.
16. Vecchio G, Santoro M. Oncogenes and thyroid cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(2):113-6.
17. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.
18. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007;28(7):742-62.
19. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(10):569-80.
20. 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;88(6):2745-52.

-
21. Meinkoth JL. Biology of Ras in thyroid cells. *Cancer Treat Res.* 2004;122:131-48.
 22. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):71-7.
 23. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science.* 2000;289(5483):1357-60.
 24. Mocellin S, Pooley KA, Nitti D. Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends Mol Med.* 2013;19(2):125-33.
 25. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):E1562-6.
 26. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1130-6.
 27. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *Jama.* 2018;319(9):914-24.
 28. Guglielmi R, Frasoldati A, Zini M, Grimaldi F, Gharib H, Garber JR, et al. ITALIAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS STATEMENT-REPLACEMENT THERAPY FOR PRIMARY HYPOTHYROIDISM: A BRIEF GUIDE FOR CLINICAL PRACTICE. *Endocr Pract.* 2016;22(11):1319-26.
 29. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J.* 2017;6(5):225-37.
 30. Tessler FN, Middleton WD, Grant EG. Thyroid Imaging Reporting and Data System (TI-RADS): A User's Guide. *Radiology.* 2018;287(1):29-36.
 31. 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;37(6):593-9.
 32. Pacini F, Basolo F, Bellantone R, Boni G, Cannizzaro MA, De Palma M, et al. Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six Italian societies. *Journal of Endocrinological Investigation.* 2018;41(7):849-76.
 33. Biondi B, Cooper DS. Thyroid Hormone Suppression Therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):227-37.
 34. Edge SB, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010. xix, 718 p. p.
 35. Amin MB, Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual.* Eighth edition. ed. Switzerland: Springer; 2017. xvii, 1024 pages p.
 36. Pacini F, Basolo F, Bellantone R, Boni G, Cannizzaro MA, De Palma M, et al. Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six Italian societies. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(7):849-76.
 37. Mazzaferri EL. Long-term outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma: effect of therapy. *Endocr Pract.* 2000;6(6):469-76.
 38. Mazzaferri EL, Massoll N. Management of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer: new paradigms using recombinant human thyrotropin. *Endocr Relat Cancer.* 2002;9(4):227-47.
 39. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Weiss RE, Degroot LJ, Simon CA, et al. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. *Surgery.* 2013;154(6):1436-46; discussion 46-7.

-
40. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.
 41. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-5.
 42. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123(3):513-22.
 43. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566-72.
 44. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta*. 2019;491:39-45.
 45. Endl E, Gerdes J. Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):371-80.
 46. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009;28(33):2925-39.
 47. Orjuela M, Orlow I, Dudas M, Ponce-Castañeda MV, Ridaura C, Leal C, et al. Alterations of cell cycle regulators affecting the RB pathway in nonfamilial retinoblastoma. *Hum Pathol*. 2001;32(5):537-44.
 48. Wang MJ, Pei DS, Qian GW, Yin XX, Cheng Q, Li LT, et al. p53 regulates Ki-67 promoter activity through p53- and Sp1-dependent manner in HeLa cells. *Tumour Biol*. 2011;32(5):905-12.
 49. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;153(3):477-91.
 50. Wen S, Zhou W, Li CM, Hu J, Hu XM, Chen P, et al. Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies. *BMC Cancer*. 2015;15:520.
 51. Lei Y, Li Z, Qi L, Tong S, Li B, He W, et al. The Prognostic Role of Ki-67/MIB-1 in Upper Urinary-Tract Urothelial Carcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Endourol*. 2015;29(11):1302-8.
 52. He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:153.
 53. Philips P, Kooby DA, Maithel S, Merchant NB, Weber SM, Winslow ER, et al. Grading Using Ki-67 Index and Mitotic Rate Increases the Prognostic Accuracy of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2018;47(3):326-31.
 54. Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, Najvani AD, Ashraf MJ, Taheri A, et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5155-9.
 55. Park JY, Kim KR, Nam JH. Immunohistochemical analysis for therapeutic targets and prognostic markers in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(1):81-9.
 56. Nagao K, Yamamoto Y, Hara T, Komatsu H, Inoue R, Matsuda K, et al. Ki67 and BUBR1 may discriminate clinically insignificant prostate cancer in the PSA range <4 ng/ml. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41(4):555-64.
 57. Vogt N, Klapper W. Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression. *Histopathology*. 2013;62(2):334-42.
-

-
58. Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, et al. Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2000;16(1):55-64.
 59. Seo SH, Kim KH, Oh SH, Choi Y, Ahn KJ, Lee JY, et al. Ki-67 labeling index as a prognostic marker in advanced stomach cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2019;96(1):27-33.
 60. Kanyılmaz G, Yavuz BB, Aktan M, Karaağaç M, Uyar M, Fındık S. Prognostic Importance of Ki-67 in Breast Cancer and Its Relationship with Other Prognostic Factors. *Eur J Breast Health.* 2019;15(4):256-61.
 61. Golmohammadi R, Pejhan A. The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients. *J Pak Med Assoc.* 2012;62(9):871-5.
 62. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2051-8.
 63. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26(45):6469-87.
 64. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(3):903-13.
 65. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5).
 66. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35.
 67. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014;25(3):282-303.
 68. Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(1):33-48.
 69. Shitara K, Yatabe Y, Matsuo K, Sugano M, Kondo C, Takahari D, et al. Prognosis of patients with advanced gastric cancer by HER2 status and trastuzumab treatment. *Gastric Cancer.* 2013;16(2):261-7.
 70. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3(6):385-9.
 71. Gerson JN, Skariah S, Denlinger CS, Astsaturov I. Perspectives of HER2-targeting in gastric and esophageal cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(5):531-40.
 72. Greally M, Kelly CM, Cercek A. HER2: An emerging target in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 2018;42(6):560-71.
 73. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(2):100-7.
 74. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama.* 2019;321(3):288-300.
 75. Wallin G, Bäckdahl M, Christensson B, Grimelius L, Auer G. Nuclear protein content and Ki-67 immunoreactivity in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Anal Quant Cytol Histol.* 1992;14(4):296-303.
 76. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer.* 1997;75(4):537-41.
 77. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol.* 1998;11(2):169-74.
 78. Rickert D, Mittermayer C, Lindenfelser R, Biesterfeld S. MIB-1 immunohistochemistry of follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid gland. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22(3):229-34.
 79. Mehrotra P, Gonzalez MA, Johnson SJ, Coleman N, Wilson JA, Davies BR, et al. Mcm-2 and Ki-67 have limited potential in preoperative diagnosis of thyroid malignancy. *Laryngoscope.* 2006;116(8):1434-8.
-

-
80. Pan DH, Wen DY, Luo YH, Chen G, Yang H, Chen JQ, et al. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6,051 cases. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3261-76.
 81. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas. *Br J Cancer.* 1992;65(6):832-7.
 82. Utrilla JC, Martín-Lacave I, San Martín MV, Fernández-Santos JM, Galera-Davidson H. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in human thyroid tumours. *Histopathology.* 1999;34(1):60-5.
 83. Kremser R, Obrist P, Spizzo G, Erler H, Kendler D, Kemmler G, et al. Her2/neu overexpression in differentiated thyroid carcinomas predicts metastatic disease. *Virchows Arch.* 2003;442(4):322-8.
 84. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Cytoplasmic staining of erbB-2 but not mRNA levels correlates with differentiation in human thyroid neoplasia. *Clinical Endocrinology.* 1998;49(5):629-37.
 85. Ensinger C, Prommegger R, Kendler D, Gabriel M, Spizzo G, Mikuz G, et al. Her2/neu expression in poorly-differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Anticancer Res.* 2003;23(3b):2349-53.
 86. Mondini MM, Rich R, Ituarte P, Wong M, Bergman S, Clark OH, et al. HER2 expression in thyroid tumors. *Am Surg.* 2003;69(12):1100-3.
 87. Elliott DD, Sherman SI, Busaidy NL, Williams MD, Santarpia L, Clayman GL, et al. Growth factor receptors expression in anaplastic thyroid carcinoma: potential markers for therapeutic stratification. *Hum Pathol.* 2008;39(1):15-20.
 88. Qin C, Cau W, Zhang Y, Mghanga FP, Lan X, Gao Z, et al. Correlation of Clinicopathological Features and Expression of Molecular Markers With Prognosis After 131I Treatment of Differentiated Thyroid Carcinoma. *Clinical Nuclear Medicine.* 2012;37(3):e40-e6.
 89. Sugishita Y, Kammori M, Yamada O, Poon SS, Kobayashi M, Onoda N, et al. Amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 gene in differentiated thyroid cancer correlates with telomere shortening. *Int J Oncol.* 2013;42(5):1589-96.
 90. Mdah W, Mzalbat R, Gilbey P, Stein M, Sharabi A, Zidan J. Lack of HER-2 gene amplification and association with pathological and clinical characteristics of differentiated thyroid cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):1107-10.
 91. Wu G, Wang J, Zhou Z, Li T, Tang F. Combined staining for immunohistochemical markers in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: improvement in the sensitivity or specificity? *J Int Med Res.* 2013;41(4):975-83.
 92. Momesso DP, Tuttle RM. Update on Differentiated Thyroid Cancer Staging. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2014;43(2):401-21.
 93. Rakha EA, Starczynski J, Lee AH, Ellis IO. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice. *Histopathology.* 2014;64(5):609-15.
 94. Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodríguez-Romo L, Hernández-Barajas D, González-Guerrero JF, Rodríguez-Fernández IA, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* 2017;35(8):499-506.
 95. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, et al. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.* 2017;13(9):843-57.
 96. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1992;168(4):357-63.
-

-
97. Ito Y, Miyauchi A, Kakudo K, Hirokawa M, Kobayashi K, Miya A. Prognostic significance of ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2010;34(12):3015-21.
 98. Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Ito Y, Kihara M, Higashiyama T, et al. Ki-67 Labeling Index Is a Predictor of Postoperative Persistent Disease and Cancer Growth and a Prognostic Indicator in Papillary Thyroid Carcinoma. *European Thyroid Journal.* 2013;2(1):57-64.
 99. Ruggeri RM, Campennì A, Giuffrè G, Giovanella L, Siracusa M, Simone A, et al. HER2 Analysis in Sporadic Thyroid Cancer of Follicular Cell Origin. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
 100. Gumurdulu D, Uguz A, Erdogan S, Tuncer I, Demircan O. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in different types of thyroid tumors: an immunohistochemical study. *Endocr Res.* 2003;29(4):465-72.
 101. Soda G, Antonaci A, Bosco D, Nardoni S, Melis M. Expression of bcl-2, c-erbB-2, p53, and p21 (waf1-cip1) protein in thyroid carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 1999;18(3):363-7.
 102. Ito Y, Miyauchi A. Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr J.* 2009;56(2):177-92.
 103. Shi X, Liu R, Basolo F, Giannini R, Shen X, Teng D, et al. Differential Clinicopathological Risk and Prognosis of Major Papillary Thyroid Cancer Variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(1):264-74.
 104. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. Ultrasonographically and anatomopathologically detectable node metastases in the lateral compartment as indicators of worse relapse-free survival in patients with papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2005;29(7):917-20.
 105. Castagna MG, Forleo R, Maino F, Fralassi N, Barbato F, Palmitesta P, et al. Small papillary thyroid carcinoma with minimal extrathyroidal extension should be managed as ATA low-risk tumor. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(9):1029-35.
 106. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. Prognostic significance of extrathyroid extension of papillary thyroid carcinoma: massive but not minimal extension affects the relapse-free survival. *World J Surg.* 2006;30(5):780-6.
 107. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994;97(5):418-28.
 108. Gerfo PL, Chabot J, Gazetas P. The intraoperative incidence of detectable bilateral and multicentric disease in papillary cancer of the thyroid. *Surgery.* 1990;108(6):958-62; discussion 62-3.
 109. Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A. Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer.* 1992;70(6):1585-90.
 110. Shattuck TM, Westra WH, Ladenson PW, Arnold A. Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;352(23):2406-12.
 111. Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa SL. *ret/PTC-1, -2, and -3* oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3360-5.
 112. Qu N, Zhang L, Ji QH, Chen JY, Zhu YX, Cao YM, et al. Risk Factors for Central Compartment Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Meta-Analysis. *World J Surg.* 2015;39(10):2459-70.
 113. Markovic I, Goran M, Besic N, Buta M, Djuriscic I, Stojiljkovic D, et al. Multifocality as independent prognostic factor in papillary thyroid cancer - A multivariate analysis. *J buon.* 2018;23(4):1049-54.
-

-
114. Ciobanu Apostol D, Căruntu ID, Lozneanu L, Andriescu EC, Giușcă SE. HER-2÷neu expression in different histological subtypes of papillary thyroid carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(2):439-44.
 115. Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, Varhaug JE. Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer.* 1993;68(4):808-12.
 116. Balta AZ, Filiz AI, Kurt Y, Sucullu I, Yucel E, Akin ML. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med Oncol.* 2012;29(2):734-41.
 117. Brassard M, Borget I, Edet-Sanson A, Giraudet A-L, Mundler O, Toubeau M, et al. Long-Term Follow-Up of Patients with Papillary and Follicular Thyroid Cancer: A Prospective Study on 715 Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;96(5):1352-9.
 118. Sampson E, Brierley JD, Le LW, Rotstein L, Tsang RW. Clinical management and outcome of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer presenting with distant metastasis at diagnosis. *Cancer.* 2007;110(7):1451-6.
 119. Schmidbauer B, Menhart K, Hellwig D, Grosse J. Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
 120. Sugitani I, Fujimoto Y, Yamamoto N. Papillary thyroid carcinoma with distant metastases: survival predictors and the importance of local control. *Surgery.* 2008;143(1):35-42.
 121. Dai YJ, Qiu YB, Jiang R, Xu M, Zhao L, Chen GG, et al. Concomitant high expression of ER α 36, EGFR and HER2 is associated with aggressive behaviors of papillary thyroid carcinomas. *Sci Rep.* 2017;7(1):12279.