



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE TRASLAZIONALI
CICLO XXXIV

**STUDIO PILOTA, SPERIMENTALE, PROSPETTICO PER LA
VALUTAZIONE DEL RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE
NELLA DIAGNOSI E NELLA PROGNOSI DEL CARCINOMA
TIROIDEO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nicola Sverzellati

Tutore:

Chiar.mo Prof. Graziano Ceresini

Dottorando: Matteo Rossini

Anni Accademici 2018/2019 – 2020/2021

SOMMARIO

1	ABSTRACT.....	5
2	INTRODUZIONE	9
2.1	EPIDEMIOLOGIA DEI NODULI TIROIDEI	9
2.2	WORKUP DEL NODULO TIROIDEO.....	12
2.2.1	Esame clinico e anamnestico	12
2.2.2	Ecografia	13
2.2.3	Citologia per agoaspirazione.....	22
2.2.4	Indagini biomolecolari	26
2.2.5	Indicazioni e scelte chirurgiche	34
2.2.6	Classificazione istopatologica e prognosi delle neoplasie tiroidee.....	37
3	RAZIONALE DELLO STUDIO	43
3.1	Scopo dello studio	45
4	MATERIALI E METODI.....	46
4.1	Disegno dello studio	46
4.2	Popolazione in studio	46
4.2.1	Criteri di inclusione.....	46
4.2.2	Criteri di esclusione	47
4.2.3	Visita di screening (V0)	48
4.2.4	Visita di arruolamento (V1)	49
4.2.5	Ecografia e successiva nuova agoaspirazione dei noduli.....	50
4.2.6	Citoaspirazione con ago sottile per indagine biomolecolare.....	51
4.2.7	Intervento chirurgico	52
4.2.8	Visita di follow up (FU)	52
4.2.9	Valutazioni biomolecolari su agoaspirato dei noduli tiroidei.....	53
5	ANALISI STATISTICA	63
6	RISULTATI	64
7	DISCUSSIONE.....	75
8	BIBLIOGRAFIA.....	83

1 ABSTRACT

BACKGROUND

Il carcinoma tiroideo rappresenta il più comune tumore endocrino e la sua incidenza è in incremento. Esso si presenta come un nodulo tiroideo. Tuttavia, la maggior parte dei noduli tiroidei è di natura benigna.

Da ciò la necessità di poter avere una corretta stima del rischio di malignità di un nodulo tiroideo al fine di evitare interventi chirurgici non necessari

Una delle sfide più importanti è costituita dai noduli a citologia indeterminata

ma anche i noduli citologicamente maligni possono essere meglio inquadrati prima della chirurgia allo scopo di individuare marcatori di outcome che potrebbero, almeno teoricamente, influenzare la decisione chirurgia o il tipo di intervento.

Uno degli aspetti più indagati negli ultimi tempi è rappresentato dalle caratteristiche biomolecolari dei noduli tiroidei. Di seguito vengono riportati i risultati di un'analisi ad interim di uno studio il cui obiettivo è quello di valutare la combinazione di un pannello mutazionale e la determinazione di microRNA (miRNA) 146b e 222 su agoaspirazione in noduli tiroidei a citologia indeterminata e maligna con lo scopo di migliorare la stima del rischio nei noduli indeterminati e la predizione di outcome nei noduli istologicamente maligni derivanti da citologia maligna o indeterminata.

MATERIALI E METODI

Il seguente è uno studio prospettico monocentrico in cui sono stati arruolati 29 pazienti con nodulo/ i tiroideo/i sottoposti ad agoaspirazione con ago

sottile con riscontro di diagnosi citologica di categoria II, IV, V e VI secondo la classificazione di Bethesda.

Ogni nodulo è stato rivalutato e sottoposto nuovamente ad agoaspirato per studio biomolecolare ricercando la presenza di miRNA 146b e miRNA 222.

I dati biomolecolari sono stati confrontati con l'istologia finale di ogni nodulo dopo intervento chirurgico. Inoltre, i pazienti affetti da malignità sono stati seguiti nel tempo e, per ognuno di essi, l'outcome è stato confrontato con l'espressione di miRNA 146b e miRNA 222 sull'agoaspirato inizialmente effettuato a carico del nodulo.

RISULTATI

Sono stati valutati 29 pazienti. Secondo la Classificazione di Bethesda 2017, 19 dei noduli esaminati (65%) all'esame citologico appartenevano a classi di rischio indeterminate. I restanti 10 noduli valutati (35%) appartenevano alla classe di rischio VI, indicativa di malignità. All'esame istologico definitivo sul pezzo operatorio 9 noduli (47%) citologicamente indeterminati sono risultati maligni. La prevalenza di miRNA 146b era significativamente più alta nei noduli a citologia maligna rispetto ai noduli a citologia indeterminata (comprendenti tuttavia noduli a successiva istologia benigna e maligna) (32% nella citologia indeterminata vs 80% nella citologia maligna; $P=0,01$). Il miRNA 222 presentava una prevalenza del 95 % nei noduli appartenenti alle classi indeterminate e del 90% nei noduli a citologia maligna. Il diametro medio dei noduli è risultato significativamente più elevato nei noduli a citologia indeterminata rispetto ai noduli a citologia maligna (21 ± 13 mm nei noduli indeterminati vs 11 ± 3 mm nei noduli a citologia maligna, $P=0,005$). All'ecografia, nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra noduli a citologia indeterminata e noduli a citologia maligna riguardo a: ipoecogenicità, tipo di struttura (solida o non solida),

struttura, margini (regolari o irregolari), disomogeneità, microcalcificazioni, aspetto taller than wide ed elasticità all'elastografia. Considerando i noduli maligni all'istologia, sono stati calcolati i valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 nei noduli a citologia indeterminata ed i noduli a citologia maligna. Il confronto dei valori assoluti di miRNA 146b e 222 tra queste due tipologie citologiche di noduli istologicamente maligni, non ha prodotto risultati significativi ($P= 0,095$ e $0,60$ rispettivamente per miRNA 146b e 222). Considerando solamente i noduli di citologia indeterminata, sono stati valutati i valori di miRNA 146b e 222 tra quelli che poi sono risultati maligni e benigni all'istologia. Il confronto tra questi due gruppi di noduli non ha mostrato alcuna differenza dei valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 ($P= 0,18$ e $0,21$ rispettivamente per miRNA 146b e miRNA 222). Valutando un follow-up di 18 mesi in pazienti sottoposti a trattamento radiometabolico post-chirurgico e 24 mesi in pazienti non radiotrattati, non è emersa alcuna relazione tra positività dei miRNA ed outcome. Ciò è stato in gran parte determinato dalla scarsità dei dati: infatti, tutti i pazienti si presentavano liberi da malattia ai diversi follow-up ad eccezione di un solo soggetto che è risultato non libero da malattia a 24 mesi di FU.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio, pur rappresentando una valutazione preliminare, non mostrano un ruolo significativo di miRNA 146b e miRNA 222, valutati su agoaspirato tiroideo, nel migliorare la stima di rischio dei noduli tiroidei o la predizione dell'outcome di pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide.

Indubbiamente, l'aumento della casistica e l'accorpamento del dosaggio di tali miRNA con pannelli mutazionali potrà meglio affrontare la problematica oggetto del presente studio.

Tutto ciò, nella prospettiva di individuare marker molecolari che possano avere, in aggiunta ad una migliore stima del rischio, un valore prognostico. Ciò permetterebbe di stratificare i pazienti in diversi gruppi di rischio con conseguente miglioramento del programma chirurgico che potrebbe essere in tal modo meglio ritagliato sul singolo paziente.

2 INTRODUZIONE

2.1 EPIDEMIOLOGIA DEI NODULI TIROIDEI

I noduli tiroidei sono lesioni radiograficamente distinte all'interno della ghiandola tiroidea che possono presentare carattere di benignità o malignità, rappresentando una rilevante problematica clinica. La maggior parte dei noduli tiroidei risulta benigna, con un tasso di malignità di circa il 5% in pazienti adulti senza storia personale di esposizione a radiazioni ionizzanti. La prevalenza dei noduli tiroidei dipende dalla popolazione di pazienti presi in esame e dal metodo con cui vengono identificati. Noduli tiroidei palpabili sono stati storicamente riportati nel 4%-7% dei pazienti sulla base del riscontro tramite esame clinico, ma l'utilizzo dell'ecografia, gold standard per la diagnosi di neoformazioni tiroidee, ha aumentato esponenzialmente il riscontro di noduli tiroidei misconosciuti alla clinica ^[1]. Secondo i diversi studi l'ecografia tiroidea è infatti in grado di evidenziare lesioni nodulari tiroidee nel 20-76% di pazienti selezionati in modo casuale e clinicamente silenti ^[2,3]. I noduli sono più comuni tra i pazienti di età avanzata, di sesso femminile e in coloro i quali presentino una storia clinica di carenza di iodio o esposizione a radiazioni ionizzanti ^[4,5,6]. Il

miglioramento della risoluzione dell'imaging medicale, ed il suo maggiore utilizzo, ha contribuito ad un aumento dell'identificazione dei noduli tiroidei e, di conseguenza, dei carcinomi tiroidei rilevati ^[7]. Attualmente, noduli tiroidei vengono identificati come riscontro incidentale in corso di ecografia del collo fino al 67% delle volte ^[8], nel 16% degli studi di tomografia computerizzata e risonanza magnetica che includono il collo ^[9], nel 9% in corso di eco color Doppler delle carotidi ^[10], e nel 2% di scansioni PET effettuate con 18F-fluorodesossiglucosio (FDG-PET) ^[11]. I noduli tiroidei accidentali rappresentano una sfida clinica difficile perché possono avere un basso rischio di malignità nella popolazione generale senza una storia di malattie della tiroide (dall'1,6% al 12,5% di malignità ^[12-14]), e sono spesso identificati in pazienti anziani che hanno maggiori probabilità di avere malattie acute o croniche coesistenti ^[15].

Inoltre, non esistono metodi affidabili o standardizzati per segnalare caratteristiche riguardanti la malignità in noduli rilevati su imaging diverso dagli ultrasuoni, ciò comporta una variazione nel work-up e nella gestione dei noduli identificati con le differenti metodiche ^[16]. Per dimostrare quanto queste lesioni siano frequenti e spesso asintomatiche, si possono citare alcuni studi autoptici nei quali è stato dimostrato che più del 50% degli adulti presenta noduli tiroidei all'esame post mortem ^[17]. Nel contempo, carcinomi papillari della tiroide (PTC) occulti sono stati documentati in ben il 35% degli adulti di età superiore ai 60 anni ^[18], con una prevalenza stimata

sulla popolazione generale dell'11% ^[19]. I risultati di questi studi suggeriscono che esiste un pool di pazienti con noduli tiroidei e tumori tiroidei clinicamente occulti, molti dei quali sono microcarcinomi papillari della tiroide (con misure < 1 cm) ^[20].

Si pensi che solo negli Stati Uniti l'incidenza annua in circa 35 anni è triplicata, passando da 4,9 casi su 100.000 pazienti nel 1975 a 14,3 casi su 100.000 soggetti nel 2009 con un netto aumento dei casi di carcinoma papillare ^[21].

L'aumento dell'identificazione di noduli subclinici mediante studi di diagnostica per immagini ha coinciso con l'aumento dell'uso di biopsie FNA (fine needle agobiopsy) tiroidee per ottenere l'analisi citopatologica dei noduli indagati, allo fine di dettare le successive raccomandazioni terapeutiche per le neoplasie riscontrate, comportando un concomitante aumento del numero di interventi chirurgici di tiroidectomia eseguiti ^[22].

2.2 WORKUP DEL NODULO TIROIDEO

2.2.1 Esame clinico e anamnestico

Le linee guida di riferimento, a seguito di diagnosi di sospetta nodularità tiroidea, raccomandano un'approfondita analisi della ghiandola tiroidea e delle stazioni linfonodali dei sei compartimenti associati bilateralmente.

E' inoltre particolarmente importante eseguire un'accurata anamnesi personale associata ad un esame clinico completo, che mirino a evidenziare la presenza di fattori di rischio specifici; tra questi risultano particolarmente significativi: storia di familiarità di primo grado per carcinoma tiroideo e sindromi familiari spesso correlate a carcinoma tiroideo come: la poliposi adenomatosa familiare del colon, la sindrome di Cowden, le sindromi di Lamb e di Name, le MEN (multiple endocrine neoplasia); peculiarità che fanno sospettare malignità come: il rapido accrescimento del nodulo e i sintomi ad esso correlati come la comparsa di disfonia per compressione dei nervi laringei, la dispnea correlata alla deviazione/infiltrazione tracheale e la disfagia da compressione esofagea ^[23]. È dimostrata inoltre la correlazione da ricercare con pregresse irradiazione nella regione testa-collo in età infantile e adolescenziale, l'esposizione a radiazioni ionizzanti in giovane età e la precedente irradiazione total-body per trapianto di midollo osseo ^[24,25].

2.2.2 Ecografia

In ogni paziente che presenti sospetto di nodularità tiroidea, gozzo, o patologia infiammatoria della tiroide, è mandatoria l'analisi mediante ecografia del collo, mirata allo studio del tessuto parenchimatoso ghiandolare e alle caratteristiche morfovolumetriche della ghiandola stessa. In caso di nodularità sarà necessario studiare le caratteristiche del nodulo e le sue alterazioni che possano portare a sospettare una trasformazione maligna. In caso di linfadenopatia palpabile, e comunque da eseguire in corso di ecografia tiroidea, è lo studio delle stazioni linfonodali tiroidee cervicali mirando alla diagnosi differenziale tra linfadenopatie reattive e sospette metastasi ^[23,26].

La tiroide è posizionata sul margine inferiore della laringe nella regione sottoioidea. L'ecografia si effettua a paziente supino con collo iperesteso utilizzando sonde lineari a trasmissione da 5 a 13 MHz ottenendo risoluzioni spaziali inferiori ai 3 mm.

L'ecografia B-mode rappresenta una metodica non invasiva e a basso costo che permette una rapida valutazione del numero dei noduli, dei margini e delle dimensioni degli stessi e delle eventuali caratteristiche esterne ed interne come la struttura (solida, cistica oppure mista) oltre che della presenza di calcificazioni ^[23].

L'utilizzo della metodica color-doppler permette invece di andare ad indagare l'eventuale vascolarizzazione dei noduli ghiandolari e dei linfonodi dei comparti interessati ^[27].

Le caratteristiche ecografiche che secondo le linee guida vanno ricercate e possono avere un significato prognostico sono ^[23,26]:

- dimensioni del nodulo (diametri ecografici)
- disomogeneità, forma (in particolare se “taller than wide”, ossia con diametro anteroposteriore maggiore rispetto al diametro laterolaterale)
- aspetto dei margini
- ecogenicità
- struttura
- presenza di microcalcificazioni
- vascolarizzazione
- caratteristiche elastosonografiche

Alla luce della bassa sensibilità complessiva, e per la presenza di bias legati alla natura operatore dipendente dell'esame ecografico, la presenza di segni di sospetto non è considerata chiaramente predittiva di malignità, limitandone l'utilizzo come strumenti rule in / rule out per indicazione alla chirurgia ^[28]. È tuttavia dimostrato che la contemporanea presenza di due o

più caratteristiche ecografiche di sospetto accresce sensibilmente il rischio di tumore tiroideo ^[29,30].

Tali caratteristiche, che portano al sospetto di malignità, sono tipiche del carcinoma papillare mentre risultano più rare nelle forme follicolari e midollari.

La variante a cellule alte del carcinoma papillare mostra più frequentemente il tipico aspetto suggestivo di malignità caratterizzato da marcata ipoecogenicità, microcalcificazioni, margini lobulati e irregolari. Inoltre in questo istotipo, alla diagnosi sono spesso presenti invasione dei tessuti extratiroidei e metastasi linfonodali cervicali ^[31].

La variante follicolare del carcinoma papillare invece può presentarsi con un aspetto ecografico apparentemente benigno, caratterizzato da forma ovale, margini ben definiti e assenza di microcalcificazioni ^[32].

La variante sclerosante diffusa papillare può talvolta mimare le condizioni generali di una tiroidite cronica autoimmune, in cui la ghiandola appare diffusamente ipoecogena e di dimensioni aumentate, con possibile aspetto a cielo stellato dovuto alla presenza di multiple microcalcificazioni ^[33].

La maggior parte delle lesioni follicolari, sia benigne che maligne, si presentano come tumori solidi, con componenti cistiche più frequenti (fino al 20%) rispetto alle varianti papillari. Le caratteristiche di ipoecogenicità (meno riscontrate in questo tipo di lesione), l'orletto periferico ipoecogeno e

irregolarmente spesso, associate alle grandi dimensioni, sono invece suggestive delle sole forme carcinomatose ^[34].

Il carcinoma midollare si presenta solitamente come una lesione di aspetto maligno ma con caratteristiche piuttosto variabili, che ne rendono difficoltosa la diagnosi ecografica, potendo essere presenti, di fatto, tutte le caratteristiche precedentemente elencate per le altre forme istologiche ^[35].

Anche il carcinoma a cellule di Hurthle ecograficamente si può presentare con caratteristiche piuttosto eterogenee, con lesioni più spesso ipoecogene, ma raramente anche iso o iperecogene. Come per le varianti follicolari maligne sono spesso riscontrati: grandi dimensioni, margini irregolari, orletto iperecogeno irregolare e struttura disomogenea ^[36].

Altra valutazione importante da effettuare sui noduli tiroidei in corso di esame ecografico è rappresentata dall'elastosonografia, una tecnica sviluppata negli ultimi anni e basata sull'analisi dell'elasticità dei tessuti analizzati, il cui razionale è correlato all'assunto che un nodulo palpatoriamente rigido o di consistenza aumentata, sia un nodulo clinicamente sospetto per malignità.

Comprimendo mediante sonda dedicata un nodulo, le parti meno rigide si deformano più facilmente, risultando in una distorsione degli ultrasuoni che viene analizzata dal software della macchina ecografica dedicata. Ciò permette di visualizzare i risultati su schermo in tempo reale mediante un

elastogramma a colori, che viene sovrapposto all'immagine B-mode secondo una scala di colori associati al grado di elasticità. Sulla base del riscontro elastosonografico ad ogni nodulo viene assegnato uno score di elasticità ^[37]:

- Score 1= soffice
- Score 2=elasticità intermedia/mista
- Score 3= duro

La metodica elastosonografica è considerata un valido strumento in grado di implementare la valutazione di caratteri di sospetto delle nodularità tiroidee migliorando la caratterizzazione dei noduli tiroidei. Tuttavia, questa tecnica presenta alcune limitazioni, in gran parte legate ad una possibile operatore-dipendenza ed al fatto che alcune lesioni non si prestano alla caratterizzazione elastosonografica; lesioni cistiche e noduli calcifici risultano difficilmente comprimibili, mentre micronoduli, complessi nodulari e lesioni in presenza di tiroidite cronica, appaiono difficilmente caratterizzabili ^[38].

Alcuni studi hanno comunque rilevato un'alta sensibilità nella diagnostica del carcinoma tiroideo, con elevato valore predittivo negativo (fino al 97%) ^[39].

Nonostante lo sviluppo della tecnica sia promettente la sua applicazione non risulta ancora routinaria, tuttavia l'elastosonografia potrebbe essere applicata nel work-up delle lesioni tiroidee come criterio diagnostico

addizionale per la gestione dei noduli risultati citologicamente indeterminati.

Lo studio ecografico, nel suo complesso, ha la funzione di ipotizzare il rischio di malignità dei noduli in esame, permettendo di discernere quelli che andranno portati a citologia per ago aspirazione da quelli che invece risultano meritevoli del solo follow up clinico-strumentale.

Pertanto, negli anni, diverse società scientifiche hanno prodotto linee guida che permettono la stratificazione del rischio ecografico in diverse classi tentando così di unificare i risultati della diagnostica strumentale (FIG.1). Nel 2014, per prima, la British Thyroid Association (BTA), ha prodotto delle linee guida che hanno suddiviso i noduli tiroidei in cinque classi di rischio ecografico a rischio di malignità crescente ^[40]. L'anno successivo la American Thyroid Association ha pubblicato linee guida differenti, ma che mantenevano le 5 classi di rischio ^[23]. Nel 2016, l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), l'American College of Endocrinology (ACE), e l'Associazione Medici Endocrinologi (AME), in uno sforzo comune, hanno prodotto nuove linee guida che vanno a suddividere i noduli in solo tre classi di rischio ecografico ^[26]:

- Classe 1. Lesioni a basso rischio (rischio atteso di malignità circa 1%): cisti semplici; noduli in gran parte cistici (contenuto fluido > 80%) con artefatti da riverberazione ("comet tail") e senza segni ecografici di sospetto; o noduli spongiformi, confluenti o con alone regolare.

- Classe 2. Lesioni a rischio intermedio (rischio atteso di malignità circa 5-15%): noduli debolmente ipoecogeni (confrontati col tessuto tiroideo circostante) e noduli isoecogeni di forma ovoidale o arrotondata e margini regolari o indefiniti; possono essere presenti : vascolarizzazione intra-nodulare, elevata rigidità all’elastosonografia, macrocalcificazioni o calcificazioni marginali, o spot iperecogeni di incerto significato (non definibili con certezza come microcalcificazioni), che modificano il rischio di malignità.
- Classe 3. Lesioni ad alto rischio (rischio atteso di malignità circa 50-90%, in rapporto al numero di caratteri di sospetto). Sono presenti uno o più dei seguenti segni: marcata ipoecogenicità (rispetto ai muscoli pretiroidei); margini spiculati o lobulati (in almeno tre punti); microcalcificazioni; forma “taller than wide”; crescita extra tiroidea o adenopatie patologiche.

AACE/ACE-AME	ATA	BTA
		U1 Normal
1 Low-risk lesion - Cysts (fluid component >80%) - Mostly cystic nodules with reverberating artifacts and not associated with suspicious US signs - Isoechoic spongiform nodules, either confluent or with regular halo.	Benign Purely cystic nodules (no solid component) Very low suspicion Spongiform or partially cystic nodules without any of the US features described in low-, intermediate- or high-suspicion patterns Low suspicion Isoechoic or hyperechoic solid nodule, or partially cystic nodule with eccentric solid area <u>without</u> : - Microcalcifications - Irregular margin - Extrathyroidal extension - Taller than wide shape	U2 Benign A. Halo, isoechoic, mildly hyperechoic B. Cystic change $\pm$ ring-down sign (colloid) C. Microcystic/spongiform - D-E. Peripheral eggshell calcification F. Peripheral vascularity
2 Intermediate-risk thyroid lesion Slightly hypoechoic (vs. thyroid tissue) or isoechoic nodules, with ovoid-to-round shape, smooth or ill-defined margins May be present: - Intranodular vascularization - Elevated stiffness at elastography, - Macro or continuous rim calcifications - Indeterminate hyperechoic spots	Intermediate suspicion Hypoechoic solid nodule with smooth margins <u>without</u> : - Microcalcifications - Extrathyroidal extension - Or taller than wide shape	U3 Indeterminate/equivocal A. Homogeneous, markedly hyperechoic, solid, halo (follicular lesion) B. Hypoechoic (?), equivocal echogenic foci, cystic change (irregular) C. Mixed/central vascularity
3 High-risk thyroid lesion (50-90%) Nodules <u>with at least 1</u> of the following features: - Marked hypoechogenicity (vs. prethyroid muscles) - Spiculated or lobulated margins - Microcalcifications - Taller-than-wide shape (AP>TR) - Extrathyroidal growth - Pathologic adenopathy Expected risk of malignancy in accordance with the presence of 1 or more suspicious findings.	High suspicion Solid hypoechoic nodule or solid hypoechoic component of partially cystic nodule <u>with 1 or more</u> of the following features: - Irregular margins (infiltrative, microlobulated) - Microcalcifications - Taller than wide shape - Rim calcifications with small extrusive soft tissue component - Evidence of extrathyroidal extension	U4 suspicious A. Solid, hypoechoic (cf. thyroid) B. Solid, very hypoechoic (cf. strap muscle) C. Disrupted peripheral calcification, hypoechoic D. Lobulated outline U5 Malignant A. Solid, hypoechoic, lobulated/irregular outline, microcalcification (papillary carcinoma?) B. Solid, hypoechoic, lobulated/irregular outline, globular calcification (medullary carcinoma?) C. Intranodular vascularity D. Shape tall>wide (AP>TR) E. Characteristic associated lymphadenopathy
Abbreviations: AACE/ACE-AME = American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology/Associazione Medici Endocrinologi; AP = anteroposterior; ATA = American Thyroid Association; BTA = British Thyroid Association; TR = transverse; US = ultrasonography. * Adapted from: 2015 ATA Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Carcinoma. <i>Thyroid</i> . 2016;26:1-133; British Thyroid Association Guidelines for the Management of Thyroid Carcinoma. <i>Clin Endocrinol</i> . 2014;81 Suppl 1:1-122; 2016 AACE/ACE-AME Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. <i>Endocr Pract</i> . 2016;22 Suppl 1:1-59.		

FIG.1 Confronto tra linee guida AACE/ACE-AME ATA e BTA per la classificazione del rischio ecografico di malignità

Infine, nel 2017, la European Thyroid Association, mediante un panel di esperti e basandosi sulle precedenti linee guida, ha creato un sistema unico

di stratificazione del rischio, lo European Thyroid Imaging and Reporting Data System (EU-TIRADS) nuovamente a 5 classi di rischio (FIG.2) [42].

Category	US features	Malignancy risk, %
EU-TIRADS 1: normal	No nodules	None
EU-TIRADS 2: benign	Pure cyst Entirely spongiform	$\cong 0$
EU-TIRADS 3: low risk	Ovoid, smooth isoechoic/hyperechoic No features of high suspicion	2–4
EU-TIRADS 4: intermediate risk	Ovoid, smooth, mildly hypoechoic No features of high suspicion	6–17
EU-TIRADS 5: high risk	At least 1 of the following features of high suspicion: – Irregular shape – Irregular margins – Microcalcifications – Marked hypoechogenicity (and solid)	26–87

EU-TIRADS, European Thyroid Imaging Reporting and Data System; US, ultrasound.

FIG.2 *Classificazione EU-TIRADS per la stratificazione del rischio ecografico*

Fine ultimo dei diversi sistemi di classificazione è quello di guidare l'indicazione all'esame citologico per agoaspirazione.

2.2.3 Citologia per agoaspirazione

Quando indicato, come da linee guida più recenti, la metodica più comunemente utilizzata e affidabile per la diagnostica del nodulo tiroideo è l'analisi citologica su agoaspirazione con ago sottile (FNAC). Tale indagine consente infatti una diagnosi di benignità o malignità nella maggior parte dei casi. Tuttavia, nel 25-30% circa dei noduli tiroidei, la citologia agoaspirativa non è in grado di escludere la malignità e pertanto tali casi vengono classificati in una delle categorie di citologia cosiddetta indeterminata ^[42-45].

Negli ultimi anni sono stati approntati diversi sistemi di classificazione citologica dei noduli tiroidei che permettono una stima del rischio di malignità comune e sovrapponibile tra centri differenti ^[43,46,47], tra questi il sistema attualmente universalmente maggiormente utilizzato è il Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (BSRTC). La recente esclusione della neoplasia follicolare non invasiva con caratteristiche nucleari di tipo papillare (NIFTP) dalla lista delle lesioni cancerose, ha modificato le percentuali di rischio di malignità delle singole classi, portando a una revisione del BSRTC nel 2017. Le NIFTP sono a tutti gli effetti infatti delle lesioni precancerose con possibilità di evoluzione a forme carcinomatose papillari a variante follicolare, la cui asportazione chirurgica in fase non invasiva comporta un rischio di recidiva a 15 anni dell'1% circa.

Il NIFTP, inoltre, presenta le alterazioni molecolari (mutazioni RAS, riarrangiamenti PPAR- γ) tipiche delle lesioni follicolari e non esprime BRAF V600E. Questa entità anatomopatologica dovrebbe indurre ad un comportamento meno aggressivo nel trattamento chirurgico, anche se mancano ancora studi prospettici che permettano di definire con certezza il corretto follow up per i pazienti con NIFTP. Essendo tuttavia comunque trattate chirurgicamente nella maggior parte dei casi mediante emitiroidectomia, vengono ancora inserite, in una tabella a parte, nelle stime che valutano il rischio di malignità delle classi BSRTC (FIG 3) [48].

Diagnostic category	Risk of malignancy if NIFTP $\neq$ CA (%)	Risk of malignancy if NIFTP = CA (%)	Usual management ^a
Nondiagnostic or Unsatisfactory	5-10	5-10	Repeat FNA with ultrasound guidance
Benign	0-3	0-3	Clinical and sonographic follow-up
Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance	6-18	~10-30	Repeat FNA, molecular testing, or lobectomy
Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm	10-40	25-40	Molecular testing, lobectomy
Suspicious for Malignancy	45-60	50-75	Near-total thyroidectomy or lobectomy ^{b,c}
Malignant	94-96	97-99	Near-total thyroidectomy or lobectomy ^c

Abbreviations: NIFTP, non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features; CA, carcinoma; FNA, fine-needle aspiration.

^aActual management may depend on other factors (eg, clinical, sonographic) besides the FNA interpretation.

^bSome studies have recommended molecular analysis to assess the type of surgical procedure (lobectomy versus total thyroidectomy).

^cIn the case of "Suspicious for metastatic tumor" or a "Malignant" interpretation indicating metastatic tumor rather than a primary thyroid malignancy, surgery may not be indicated.

Adapted from Ali and Cibas⁷ with permission of Springer.

FIG.3 *Classificazione Bethesda 2017 per il report citologico*

Nel BSRTC esistono sei classi basate sulla stima del rischio neoplastico ottenibile dall'analisi delle caratteristiche citologiche del reperto FNAC. Le classi sono attualmente così suddivise:

- Classe I, non diagnostico o non soddisfacente (ND/UNS, rischio di malignità del 5-10%), indicazione a ripetere FNAC
- Classe II, benigno (rischio di malignità del 0-3%), indicazione a follow up clinico ed ecografico
- classe III, atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato (AUS/FLUS, rischio di malignità del 6-18%), indicazione secondo i casi a indagini biomolecolari, ripetizione FNAC, emitiroidectomia
- classe IV, neoplasia follicolare o sospetto per neoplasia follicolare (FN/SFN, rischio di malignità del 10-40%), indicazione secondo i casi a indagini biomolecolari e/o emitiroidectomia
- classe V, sospetto di malignità (SM, rischio di malignità del 45-60%), indicazione secondo i casi a tiroidectomia o lobectomia
- Classe VI, maligna (rischio di malignità 94-96%), indicazione a tiroidectomia o lobectomia secondo i casi.

Per quanto attiene ai noduli a citologia indeterminata (classi III-IV-V), data l'impossibilità di ottenere una diagnosi definitiva con il solo esame citologico, la maggior parte dei pazienti viene sottoposta ad intervento di asportazione

completa (tiroidectomia totale) o parziale (emitiroidectomia) della tiroide, ai fini di definire una diagnosi istopatologica ed il conseguente percorso terapeutico. All'esame istologico definitivo sul campione operatorio solo il 10-40% dei noduli precedentemente classificati come indeterminati si confermano effettivamente maligni, pertanto, negli ultimi anni, si sono attuati grandi sforzi al fine di trovare un mezzo diagnostico ulteriore per limitare l'overtreatment dei noduli indeterminati ^[43, 49].

2.2.4 Indagini biomolecolari

Recentemente è stato proposto il ricorso ad indagini biomolecolari atte ad individuare mutazioni e riarrangiamenti genici su citoaspirato allo scopo di meglio definire il rischio di malignità dei noduli a citologia indeterminata aumentando così l'efficacia della diagnosi prechirurgica ^[50-52]. L'impatto di queste metodiche è stato tale che l'American Thyroid Association (ATA) nelle linee guida del 2015 ha raccomandato l'utilizzo della diagnosi molecolare nell'algoritmo di gestione dei noduli tiroidei a citologia indeterminata ^[23]. Le alterazioni più comunemente individuate sono le mutazioni di BRAF e della famiglia di RAS e i riarrangiamenti genici di RET/PTC e PAX8/PPAR- γ ^[53]. La mutazione di BRAF è altamente specifica per il carcinoma papillare della tiroide in cui compare nel 29-77% dei casi, ma la sua sensibilità è ancora troppo bassa per poter essere singolarmente presa in considerazione come predittiva di malignità ^[54]. I riarrangiamenti di PAX8/PPAR- γ , con una frequenza che raggiunge il 30%, sono presenti nel carcinoma follicolare, nella variante follicolare del carcinoma papillare e nell'adenoma follicolare. I riarrangiamenti RET/PTC sono presenti nel 10-20% dei carcinomi papillari ed in particolare nella popolazione giovanile. Le mutazioni della famiglia RAS (NRAS, HRAS e KRAS) hanno specificità minore per il carcinoma tiroideo, con un valore predittivo positivo inferiore

rispetto a BRAF; RAS è infatti frequentemente mutato anche in lesioni benigne ^[55]. Complessivamente queste alterazioni geniche sono riscontrate in circa il 70% delle neoplasie tiroidee con un'accuratezza diagnostica nella predizione di malignità che va dall' 80% al 94% mantenendo purtroppo una sensibilità del solo 70% ^[44,49-51,53]. Oltre ad una certa specificità nella predizione di malignità le mutazioni di BRAF V600E negli ultimi anni sono state anche proposte come indicatore di prognosi negativa nel carcinoma papillare della tiroide dove infatti si associano ad un outcome clinico-patologico peggiore ^[56-57]. Ancora più recentemente le mutazioni di TERT promoter (TERTp) sono state proposte come marker prognostico del carcinoma tiroideo. Questa mutazione è riscontrata con maggiore frequenza nei carcinomi ad alta aggressività come la variante a cellule alte del carcinoma papillare, il carcinoma follicolare invasivo, i carcinomi tiroidei scarsamente differenziati e gli anaplastici. La mutazione di TERTp, rispetto alle alterazioni geniche precedentemente descritte, presenta un'alta specificità per le forme maligne di neoplasia tiroidea, tanto che nella quasi totalità degli studi presenti in letteratura, non viene riscontrata nella patologia benigna ^[50]. Nei carcinomi ben differenziati della tiroide la mutazione di TERTp si associa invece a una maggior aggressività della neoplasia stessa, intendendosi come tale la presenza di metastasi a distanza, una prognosi peggiore ed un maggiore rischio di mortalità ^[58]. Solo pochissimi studi su campioni ristretti di soggetti sono volti alla ricerca della mutazione di TERTp nella popolazione europea, nonostante sia noto come la

prevalenza della stessa presenti una notevole differenza tra i diversi studi, con percentuali variabili dal 7.5% al 25.5% per il carcinoma papillare e dal 13.8% al 36.4% per il carcinoma follicolare [50,59-60].

Sulla base di questi dati, e con lo scopo di ottenere uno strumento che permetta di effettuare decisioni cliniche basate su un maggior numero di informazioni relative al nodulo in esame, sono stati sviluppati negli ultimi anni molteplici test biomolecolari che ricercano le mutazioni e i riarrangiamenti descritti. Gli attuali strumenti di diagnostica molecolare disponibili sono classificati in due diverse categorie: metodi 'rule-out', che hanno lo scopo di ridurre l'asportazione di noduli benigni, e metodi 'rule-in', che mirano ad ottimizzare la gestione chirurgica (tiroidectomia totale o lobectomia diagnostica). Tra i metodi rule-in, l'ultima versione di ThyroSeq® (TSv3) è in grado di identificare più di 12.000 mutazioni in "hotspot" e più di 120 fusioni, mentre l'Afirma® Genomic Sequencing Classifier (GSC), un rule out test, analizza il profilo di espressione di 1115 geni e rileva varianti e fusioni di singoli nucleotidi [61]. Sebbene sia stato dimostrato che sia GSC che TSv3 siano economicamente più convenienti rispetto alla lobectomia diagnostica, il principale svantaggio di questi strumenti molecolari rimane l'alto costo che limita la loro applicazione in modo ampio nella pratica clinica [62,63].

Al fine di superare questa limitazione sono stati istituiti pannelli di mutazioni personalizzati di 5 o 7 geni, per analizzare le alterazioni genetiche più frequenti riscontrate nel carcinoma tiroideo ^[64].

Una limitazione importante dei panneli attualmente in commercio è dettata dal fatto che tre su cinque dei test richiedono un campione biologico aggiuntivo, che di solito significa eseguire almeno un FNAC aggiuntivo; solo due dei cinque test molecolari in commercio possono essere eseguiti utilizzando lo striscio citologico dei vetrini utilizzati per classificare il nodulo tiroideo indeterminato. Sebbene in corso di puntura ecoguidata un lavaggio dell'ago dallo FNAC iniziale possa essere raccolto e archiviato al fine di eseguire le analisi biomolecolari, purtroppo questa operazione non viene eseguita di routine da tutti i centri ^[65].

Più recentemente i MicroRNAs (miRNAs) hanno attratto molta attenzione per il ruolo nella possibile applicazione come biomarker e regolatori del processo di carcinogenesi. I miRNA sono corte catene di acido ribonucleico, non codificanti, comprese tra i 18 e i 24 nucleotidi, che svolgono un ruolo regolatorio epigenetico nei processi cellulari.

Il ruolo biologico dei miRNAs nella cancerogenesi tiroidea non è ancora completamente noto, ma vi sono ragioni per ritenere che i differenti profili di espressione rispetto al tessuto sano possano essere utili nella diagnosi, classificazione, prognosi e nel trattamento del carcinoma tiroideo ^[66].

Esperimenti in vitro e in vivo hanno rivelato il ruolo di diversi miRNAs nella patogenesi del cancro della tiroide. È stato dimostrato che questi oncomiR (miRNAs classificati come oncogenici) sono in grado di ridurre l'espressione di un certo numero di oncosoppressori, favorendo così la proliferazione cellulare e la progressione del ciclo cellulare. Il ruolo di questi miRNAs è esercitato attraverso la modulazione delle vie di segnalazione correlate al cancro come PI3K/Akt/mTOR, la via di segnalazione delle adipocitochine, le vie di segnalazione Hippo, Wnt e Jak-STAT ^[67].

In un recente studio è stato dimostrato che diversi istotipi di tumori tiroidei, derivati dallo stesso tipo di cellula, avevano profili di espressione di microRNA differenti; anche lo stesso ceppo cellulare può quindi presentare pattern differenti in relazione a specifiche mutazioni oncogeniche. È stato identificato un gruppo di sette microRNA che risultano costantemente iperespressi in tutti i tumori derivati dall'epitelio follicolare: miR-187, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-146b, miR-155 e miR-224. Di questo gruppo, quelli più frequentemente disregolati sembrano essere miR-221, miR-222 e miR-146b ^[68].

Successivamente a questa dimostrazione è stato confermato che un sottogruppo di miRNAs, formato da miR-146, miR-221 e miR-222 era chiaramente iperespresso nel carcinoma papillare se comparato con il tessuto sano adiacente, con livelli dalle 11 alle 19 volte superiori ^[69].

L'obiettivo di questi microRNA sembra essere c-KIT, che è un recettore tirosin-chinasico correlato ai geni MAPK e RAS, coinvolto nella crescita e nella differenziazione cellulare. Nel tessuto del carcinoma papillare dove questi microRNA sono iperespressi, sono state riportate down-regulation di un trascritto e di una proteina c-KIT. L'assenza di c-KIT è un segno distintivo nel carcinoma papillare, ma il suo significato biologico non è ancora noto con precisione.

D'altra parte, miR-146b sembra essere correlato non solo alla carcinogenesi tiroidea, ma anche all'invasione extratiroidea, agli stadi avanzati del carcinoma papillare, e alle mutazioni di BRAF ^[70].

Nel contempo miR-222, il cui bersaglio sembra essere APQ-1, è stato identificato come un altro oncomiR di frequente riscontro nel carcinoma papillare, dimostrando la sua iperespressione in pazienti con cancro rispetto al gruppo di controllo affetto da gozzo multinodulare. Inoltre, i suoi livelli di espressione, risultavano più alti nei pazienti con tumori di dimensioni maggiori e proprietà maggiormente invasive. L'espressione di miR-222 è stata infine correlata con i livelli di rischio stilati dall'American Thyroid Association (rischio di recidiva), mentre non risulta in relazione con la stadiazione TNM (prognosi) ^[71].

Un altro studio ha dimostrato una up-regulation di miR-146b, miR-222, miR-21, miR-221 e miR-181b nei campioni di tessuto prelevato da carcinoma papillare rispetto ai normali tessuti tiroidei. La iperpressione di questi

miRNA è stata rilevata anche in carcinomi papillari recidivanti rispetto a campioni prelevati da tumori di prima insorgenza, e in campioni positivi per metastasi linfonodali cervicali rispetto a quelli senza secondarismi [72].

Più recentemente sono risultate significative le relazioni tra up-regulation di miR-146b-5p e miR-222-3p, e un rischio più elevato di recidiva, ed inoltre si è notato come la sovraespressione di miR-146b-5p e miR-146b-3p distingue il tipo classico e la variante a cellule alte ma non la variante follicolare di carcinoma papillare [73].

Lo stesso gruppo di studio ha quindi identificato il profilo sierico di 754 miRNA nei pazienti con carcinoma papillare prima e dopo tiroidectomia. In particolare, l'espressione di otto miRNA era significativamente più elevata nei pazienti prima del trattamento chirurgico rispetto ai livelli presenti sia nei soggetti sani, che negli stessi pazienti dopo il trattamento. I risultati più promettenti sono stati riportati per miR-146a-5p e miR-221-3p. Alla luce di ciò si suppone che l'espressione di questi miRNA potrebbe in futuro essere utilizzata come biomarker per il follow-up dei pazienti mediante sierologia [74].

In uno studio successivo è stata valutata l'efficacia prognostica dei microRNA determinando i meccanismi con cui il miR-146 ha influenzato l'aggressività del carcinoma papillare in linee cellulari che ospitano mutazioni BRAF. I risultati hanno mostrato che i pazienti con elevata espressione di miR-146 nel tumore primario avevano un tasso di

sopravvivenza libera da malattia inferiore rispetto a quelli con bassi livelli di espressione di miR-146 ^[75].

Parlando di carcinoma follicolare, esistono diversi miRNAs che presentano iperespressione, ma anche in questo caso spiccano miR-221 e miR-222, che risultano inoltre iperespressi nei carcinomi a prognosi peggiore, come quelli di volume maggiore o con infiltrazione capsulare, vascolare o linfatica, ed inoltre nelle forme metastatiche ^[76-79]. I livelli sierici di miR-222 sono stati inoltre riscontrati dalle due alle tre volte superiori nei pazienti con carcinomi papillari tall cell rispetto agli altri istotipi, suggerendo ulteriormente una peggiore prognosi ^[70].

Questi dati sono confermati da quanto si evidenzia nel Cancer Genome Atlas dove le famiglie miR-221 e miR-222 risultano associate a forme tumorali meno differenziate ^[80].

2.2.5 Indicazioni e scelte chirurgiche

Le linee guida ATA 2015 suggeriscono il seguente management chirurgico per i carcinomi tiroidei differenziati:

Per i pazienti con carcinoma tiroideo > 4 cm o con estensione extratiroidea (T4 intraoperatorio) o apparente interessamento linfonodale o metastasi a distanza, la procedura chirurgica iniziale dovrebbe comportare, in assenza di controindicazioni, la tiroidectomia totale con rimozione di tutto il tumore primitivo macroscopicamente evidente.

Per i pazienti con carcinoma tiroideo compreso tra 1 cm e 4 cm senza estensione extra ghiandolare e senza evidenza clinica di metastasi linfonodali (cN0), il trattamento chirurgico può essere una tiroidectomia bilaterale (tiroidectomia quasi totale o totale) o una tiroidectomia monolaterale (lobectomia). La sola lobectomia tiroidea può essere un trattamento iniziale sufficiente per i carcinomi papillari e follicolari a basso rischio; tuttavia, il team multidisciplinare che si occupa del trattamento, può scegliere la tiroidectomia totale al fine di permettere nel post-operatorio l'esecuzione della terapia radiometabolica con I131 (RAI), o per migliorare il follow-up in base alle caratteristiche della malattia e alle preferenze espresse dal paziente.

Se si sceglie un intervento chirurgico per pazienti con carcinoma tiroideo <1 cm senza estensione extratiroidea e cN0, sarebbe indicata la lobectomia tiroidea, a meno che non vi siano chiare indicazioni per rimuovere il lobo controlaterale (contemporanea presenza di noduli indeterminati, gozzo tossico ecc.). La sola lobectomia tiroidea è un trattamento sufficiente per carcinomi intratiroidei piccoli, singoli, in assenza di precedente storia di irradiazione della regione testa collo, carcinoma familiare della tiroide o metastasi cervicali rilevabili clinicamente ^[23].

Nel 2018 grazie al lavoro congiunto di sei delle maggiori società scientifiche italiane dedicate all'endocrinologia, alla medicina nucleare, all'endocrinochirurgia ed alla citopatologia (AIT, AME, SIE, AIMN, SIUEC e SIAPEC) è stata pubblicata una Consensus sulla diagnosi ed il trattamento del carcinoma della tiroide che ha riconfermato l'approccio conservativo per la classe TIR 3A (AUS/FLUS a basso rischio) con indicazione alla ripetizione della citologia e alla valutazione clinica ed ecografica in caso di conferma della citologia indeterminata, per porre indicazione alla chirurgia o al follow up. La consensus suggerisce la chirurgia per la maggior parte dei noduli in classe TIR 3B (AUS/FLUS ad alto rischio) previa rivalutazione clinica ed ecografica, e quando possibile dopo uno studio molecolare (mutazione BRAF e RAS) ^[81].

Tale differenziazione tra TIR3A e TIR3B non è presente nelle ultime linee guida ATA che comunque pongono indicazione allo studio molecolare nelle

citologie AUS/FLUS e FN/SFN con eventuale ripetizione della FNAC nelle prime ^[23].

Le stesse linee guida suggeriscono invece il seguente management chirurgico per i noduli a citologia indeterminata.

Per i pazienti con nodulo solitario citologicamente indeterminato, la lobectomia tiroidea è l'approccio chirurgico iniziale raccomandato. Questo approccio può essere modificato in base alle caratteristiche cliniche o ecografiche, alle preferenze del paziente e ai test molecolari.

La tiroidectomia totale può essere preferita in pazienti presentanti noduli indeterminati che risultano citologicamente sospetti per malignità, positivi per mutazioni specifiche per carcinoma, ecograficamente sospetti o grandi (> 4 cm), o ancora in pazienti con carcinoma tiroideo familiare o anamnesi personale di esposizione alle radiazioni.

I pazienti con noduli indeterminati che mostrino una malattia nodulare bilaterale, quelli con significative comorbidità o quelli che preferiscano sottoporsi a tiroidectomia bilaterale per evitare la possibile necessità di un futuro intervento chirurgico sul lobo controlaterale, possono decider per una tiroidectomia totale ^[23].

2.2.6 Classificazione istopatologica e prognosi delle neoplasie tiroidee

- NIFTP

Ben differenziati

- Carcinoma Papillare
 - Variante classica
 - Variante follicolare
 - Varianti aggressive: hobnail, tall cells, solid, columnar cells, diffuse sclerosing
- Carcinoma Follicolare
 - Minimamente invasivo
 - Fortemente invasivo

Scarsamente differenziati

- Oncocitico (a cellule di Hurtle)
- Scarsamente differenziato (insulare)
- Anaplastico
- Midollare
- Linfoma tiroideo
- Sarcoma tiroideo

Fattori istopatologici che influenzano sulla prognosi tumorale

- Invasione capsulare
- Invasione vascolare (più di 4 vasi)
- Minima invasione muscolare
- Invasione extratiroidea: tessuto sottocutaneo, laringe, trachea, esofago, nervo ricorrente, fascia pre-vertebrale, muscoli del collo, grossi vasi
- Analisi immunoistochimica e molecolare

Fattori di valutazione dell'impegno linfonodale

- Numero totale
- Numero dei linfonodi metastatici
- Dimensioni della maggiore area metastatica intra-linfonodale (< 2 mm): micro-macro-metastasi
- Invasione extra-linfonodale

L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha pubblicato nel 2016 l'ottava edizione del sistema di stadiazione TNM per i carcinomi tiroidei differenziati, scarsamente differenziati, a cellule di Hürtle e anaplastici ^[82].

T1

- T1a tumore < 1cm
- T1b 1cm < tumore < 2 cm, limitato alla tiroide

T2 2cm < tumore < 4 cm, limitato alla tiroide

T3

- T3a tumore > 4 cm, limitato alla tiroide
- T3b qualsiasi dimensione, con grossolana invasione muscolare

T4

- T4a qualsiasi dimensione, invasione tessuti molli, laringe, trachea, esofago, nervo ricorrente

- T4b qualsiasi dimensione, invasione fascia prevertebrale, carotide, vasi mediastinici

Rispetto alla precedente classificazione TNM, il termine “limitato alla tiroide” include anche la minima estensione nel connettivo peritiroideo e la microscopica infiltrazione dei muscoli peritiroidei.

Nx Linfonodi locoregionali non valutati

N0 Non evidenza di metastasi linfonodali

- N0a Uno o più linfonodi confermati negativi alla citologia/ istologia
- N0b non evidenza radiologica o clinica di linfonodi metastatici

N1 Presenza di metastasi linfonodali

- N1a Metastasi al livello VI o VII
- N1b Metastasi ai linfonodi laterali del collo o ai linfonodi retrofaringei

M0 Assenza di metastasi a distanza

M1 Presenza di metastasi a distanza

Per la definizione N ed M devono essere considerati tutti i dati pre, intra- e post-operatori fino ai primi 4 mesi dalla tiroidectomia: non serve più la conferma cito-istologica, ma basta la negatività radiologica, clinica preoperatoria e clinica intraoperatoria.

Sulla base del TNM è stata valutata la prognosi tumorale del carcinoma tiroideo secondo la FIG.4.

Età alla diagnosi	T	N	M	Stadio	sopravvivenza a 10 anni tumore-specifica
<55	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M0	I	98-100%
	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	II	85-95%
>55	T1-T2	N0-Nx	M0	I	98-100%
	T1-T2	N1	M0	II	85-95%
	T3a-T3b	Qualsiasi N	M0	II	85-95%
	T4a	Qualsiasi N	M0	III	60-70%
	T4b	Qualsiasi N	M0	IVA	<50%
	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1	IVB	<50%

FIG. 4 *Prognosi del carcinoma tiroideo rapportato al TNM*

Le linee guida ATA hanno invece stilato il rischio di recidiva di malattia suddividendo i pazienti in basso intermedio e alto rischio secondo i criteri riportati in FIG.5 ^[23].

TABLE 11. ATA 2009 RISK STRATIFICATION SYSTEM WITH PROPOSED MODIFICATIONS

ATA low risk	Papillary thyroid cancer (with all of the following): • No local or distant metastases; • All macroscopic tumor has been resected • No tumor invasion of loco-regional tissues or structures • The tumor does not have aggressive histology (e.g., tall cell, hobnail variant, columnar cell carcinoma) • If ^{131}I is given, there are no RAI-avid metastatic foci outside the thyroid bed on the first posttreatment whole-body RAI scan • No vascular invasion • Clinical N0 or ≤ 5 pathologic N1 micrometastases (<0.2 cm in largest dimension)^a Intrathyroidal, encapsulated follicular variant of papillary thyroid cancer^a Intrathyroidal, well differentiated follicular thyroid cancer with capsular invasion and no or minimal (<4 foci) vascular invasion^a Intrathyroidal, papillary microcarcinoma, unifocal or multifocal, including <i>BRAF</i>^{V600E} mutated (if known)^a
ATA intermediate risk	Microscopic invasion of tumor into the perithyroidal soft tissues RAI-avid metastatic foci in the neck on the first posttreatment whole-body RAI scan Aggressive histology (e.g., tall cell, hobnail variant, columnar cell carcinoma) Papillary thyroid cancer with vascular invasion Clinical N1 or >5 pathologic N1 with all involved lymph nodes <3 cm in largest dimension^a Multifocal papillary microcarcinoma with ETE and <i>BRAF</i>^{V600E} mutated (if known)^a
ATA high risk	Macroscopic invasion of tumor into the perithyroidal soft tissues (gross ETE) Incomplete tumor resection Distant metastases Postoperative serum thyroglobulin suggestive of distant metastases Pathologic N1 with any metastatic lymph node ≥ 3 cm in largest dimension^a Follicular thyroid cancer with extensive vascular invasion (> 4 foci of vascular invasion)^a

FIG. 5 *Rischio di recidiva secondo le linee guida ATA 2015*^(a) *modifiche proposte rispetto all'edizione 2009)*

3 RAZIONALE DELLO STUDIO

I più recenti orientamenti chirurgici in tema di tiroidectomia dopo diagnosi citologica di nodulo tiroideo a rischio di malignità (cosidette forme indeterminate), e per alcuni autori anche per i noduli citologicamente definiti come maligni, tendono a proporre sempre più frequentemente atteggiamenti di minore invasività. D'altra parte, è importante sottolineare come, in determinati casi, l'istologia possa mostrare uno stato del tumore tale da rendersi necessario un trattamento chirurgico radicale. In tali condizioni, se l'intervento che ha condotto alla diagnosi è stato quello di un'emitiroidectomia, si dovrà reintervenire chirurgicamente per una tiroidectomia di completamento. Allo stesso modo la conoscenza della prognosi e della tendenza alla recidiva di certi istotipi tumorali potrebbe guidare il team multidisciplinare che tratta il paziente a optare per un trattamento maggiormente aggressivo anche in condizioni che secondo la sola citologia non lo richiederebbero. È quindi indubbio che una conoscenza delle caratteristiche del nodulo che oltrepassino i limiti della citologia e meglio caratterizzino malignità ed aggressività, possano elettivamente guidare la prospettiva chirurgica di tali pazienti. Allo stato attuale delle conoscenze, queste informazioni possono derivare dai marker biomolecolari su agoaspirato tiroideo. In tale ottica quindi, eventuali miglioramenti nella diagnostica biomolecolare prechirurgica dei noduli tiroidei, porterebbero ad

una sempre più corretta soluzione chirurgica evitando i rischi di un potenziale overtreatment. Ciò include anche il valore che marker biomolecolari di significato prognostico potrebbero dare alla decisione circa il tipo di intervento chirurgico più opportuno. Quindi, nel caso di noduli tiroidei che siano già stati citologicamente definiti come a rischio (indeterminati) o maligni, la combinazione tra il sospetto ecografico e le indagini biomolecolari potrebbero notevolmente migliorare lo stato di conoscenza ed influenzare le scelte chirurgiche.

3.1 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è quello di valutare il profilo biomolecolare di malignità ed aggressività di noduli tiroidei citologicamente sospetti o maligni, candidati all'intervento chirurgico, confrontando i dati derivati dalla biologia molecolare con i referti istologici e la prognosi a distanza.

L'analisi molecolare del presente studio prevede la individuazione delle mutazioni: B-RAF V600E, TERT-p, e dell'espressione di miRNA 146b e miRNA 222.

Qui di seguito vengono presentati i risultati di un'analisi ad interim dello studio dopo valutazione di miRNA 146b e miRNA 222 su esame da citoaspirazione in noduli tiroidei a citologia indeterminata e maligna, effettuando una valutazione della loro associazione con il referto istologico dopo intervento chirurgico. Inoltre, allo scopo di individuare un valore prognostico dei suddetti miRNA, è stata valutata la loro possibile associazione con l'outcome del paziente con istologia maligna durante il follow-up post-tiroidectomia.

4 MATERIALI E METODI

4.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Il presente studio è di tipo sperimentale, prospettico, monocentrico, condotto su pazienti con nodulo/noduli tiroideo/i già sottoposti ad agoaspirazione diagnostica con ago sottile e con riscontro di diagnosi citologica indeterminata o maligna in attesa di essere sottoposti ad intervento di tiroidectomia totale o emitiroidectomia.

4.2 POPOLAZIONE IN STUDIO

4.2.1 Criteri di inclusione

Pazienti affetti da nodulo/i tiroideo/i appartenenti alle seguenti classi citologiche secondo la classificazione Bethesda ^[48]:

- Classe III: atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato (Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance, AUS/FLUS)

- Classe IV: neoplasia follicolare o sospetto per neoplasia follicolare (Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm, FN/SFN)
- Classe V: sospetto di malignità (Suspicious for Malignancy, SM).
- Classe VI: malignità (Malignant, M)

Consenso informato scritto a partecipare allo studio.

4.2.2 Criteri di esclusione

- ✓ Nodulo iperfunzionante (nodulo “caldo” alla scintigrafia tiroidea)
- ✓ Storia di ridotta compliance o patologia psichiatrica rilevante o qualsiasi altra condizione che renda il paziente inappropriato per lo studio.

Tutti i pazienti inseriti nello studio hanno soddisfatto i criteri di inclusione e non presentavano nessuno dei criteri di esclusione. Ogni singolo nodulo, appartenente o meno allo stesso soggetto, è stato considerato, e ad esso è stato associato un codice univoco corrispondente. Su tale nodulo sono state quindi eseguite: ecografia con elastografia e nuovo agoaspirato con ago sottile per indagine molecolare.

Successivamente ogni paziente è stato sottoposto ad intervento chirurgico di tiroidectomia (totale, pressoché totale o lobectomia). Tutte le procedure

diagnostiche (ecografia, indagine biomolecolare su citoaspirato) sono state effettuate in cieco cosiccome è risultata in cieco l'indagine istologica. I pazienti nei quali i noduli siano risultati maligni all'istologia sono stati seguiti in follow-up (FU) semestralmente come da linee guida e per essi è stata effettuata, ove indicato, la terapia radiometabolica

4.2.3 Visita di screening (V0)

Durante la visita:

- Il paziente è stato informato circa gli obiettivi dello studio e le procedure previste, sono state inoltre accuratamente illustrate le procedure cui il paziente sarebbe stato in seguito sottoposto. È stato consegnato al paziente apposito documento informativo verificando che il paziente avesse ben compreso le informazioni fornite.
- Sono stati valutati i criteri di inclusione/esclusione
- È stata programmata visita di arruolamento.

Tali visite sono state eseguite c/o le seguenti strutture:

- UO Clinica Chirurgica Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

- SSD Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ed indirizzo Onco-endocrinologico, Azienda Ospedaliero- Universitaria di Parma.

4.2.4 Visita di arruolamento (V1)

Tali visite sono state eseguite presso la SSD Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ed indirizzo Onco-endocrinologico, Azienda Ospedaliero- Universitaria di Parma.

Durante la visita:

- È stata confermata eleggibilità del paziente allo studio.
- Lo sperimentatore ha verificato che il paziente avesse ben compreso gli obiettivi dello studio e le procedure previste. È stato consegnato al paziente apposito documento informativo.
- Il paziente e lo sperimentatore che ha informato il paziente hanno datato e firmato il modulo di consenso informato.

I pazienti eleggibili sono stati inviati alla successiva visita. I pazienti non eleggibili sono stati considerati come “screening failure” uscendo pertanto dallo studio. Tali visite sono state eseguite c/o la seguente struttura:

- SSD: Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ad indirizzo onco-endocrinologico, Azienda Ospedaliero- Universitaria di Parma.

4.2.5 Ecografia e successiva nuova agoaspirazione dei noduli

Tutte le ecografie e le successive agoaspirazioni sono state eseguite presso la SSD Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ed indirizzo Onco-endocrinologico, Azienda Ospedaliero- Universitaria di Parma

Ogni singolo nodulo, appartenente o meno allo stesso soggetto, con citologia indeterminate o maligna all'agoaspirazione di routine precedentemente eseguita, è stato considerato e ad esso è stato associato un codice univoco corrispondente. La procedura è avvenuta come segue:

- esecuzione di ecografia tiroidea dedicata su nodulo/i già diagnosticato/i come a citologia indeterminata o maligna e rivalutazione dei caratteri ecografici precedentemente descritti.

L'ecografia è stata eseguita mediante l'utilizzo di ecografo apposito (X-Vision MyLab 70 Esaote, Milano, Italy) con sonda lineare da 5-13 MHz. Per ogni nodulo sono state valutate le seguenti caratteristiche ecografiche, in accordo con le linee guida di riferimento nazionali e internazionali ^[23,26]:

- dimensioni del nodulo (diametri ecografici)

- disomogeneità, forma (in particolare se “taller than wide”, ossia con diametro anteroposteriore maggiore rispetto al diametro laterolaterale nelle scansioni trasversali)
- aspetto dei margini
- ecogenicità
- struttura
- presenza di microcalcificazioni
- vascolarizzazione
- caratteristiche elastosonografiche

4.2.6 Citoaspirazione con ago sottile per indagine biomolecolare

Tale procedura è stata effettuata c/o la SSD: Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ed indirizzo Onco-endocrinologico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Ogni paziente è stato sottoposto ad agoaspirazione del nodulo. L'agoaspirazione è stata effettuata in eco-assistenza mediante metodo di capillarità utilizzando aghi mandrinati con lunghezza pari a 90 mm e calibro

pari a 27 Gauge (Artsana, Grandate, Italy). Una volta che la punta dell'ago, visualizzata mediante l'immagine B-mode, ha raggiunto il nodulo, il mandrino è stato rimosso e si è proceduto a raccolta del materiale citologico. Tale materiale è stato quindi raccolto all'interno di una provetta di 1,5 ml e stoccato a -80°C in attesa dell'esecuzione delle analisi molecolari. Anche il liquido di lavaggio dell'ago, effettuato con soluzione fisiologica, è stato raccolto e stoccato in modo analogo. I campioni citologici sono stati quindi processati secondo le procedure descritte in seguito.

4.2.7 Intervento chirurgico

Tutti gli interventi chirurgici sono stati eseguiti presso UO Clinica Chirurgica Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

4.2.8 Visita di follow up (FU)

Nelle visite di follow-up di questo studio sono stati considerati solamente i pazienti trovati affetti da nodulo con istologia maligna. Dopo il trattamento chirurgico, i pazienti sono stati sottoposti a visite di controllo routinarie come da linee guida

Le visite hanno compreso:

- Ecografia di controllo post-intervento
- Titolazione della terapia ormonale sostitutiva e /o tireosoppressiva ove indicato
- Valutazione post-operatoria dei parametri di laboratorio come indicato nei rispettivi casi
- Eventuale indicazione all'esecuzione di radio-iodio terapia
- Valutazione della presenza di recidive o metastasi

Tali visite sono state eseguita c/o la seguente struttura:

- SSD Coordinamento delle funzioni di Medicina Interna ed indirizzo Onco-endocrinologico, Azienda Ospedaliero- Universitaria di Parma

4.2.9 Valutazioni biomolecolari su agoaspirato dei noduli tiroidei

Tutte le valutazioni biomolecolari sono state effettuate presso il Laboratorio di Tossicologia Industriale e Metodiche Analitiche Avanzate dell'Università di Parma

Estrazione miRNA

Tutte le molecole di RNA, compresi i miRNA, sono state estratte dal materiale proveniente da agoaspirazione utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen, CA, USA), soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato.

In breve, il materiale è stato lisato in 1 ml di Trizol ed incubato 5 minuti a temperatura ambiente. A ciascun campione sono stati quindi aggiunti 0,2 ml di cloroformio (Carlo Erba Reagenti) e ogni campione è stato successivamente agitato vigorosamente per 15 secondi ed incubato a temperatura ambiente per 2-3 minuti. Le provette sono state centrifugate a 12000 g per 15 minuti a 4°C.

Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo (Carlo Erba Reagenti). I campioni sono stati incubati 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C.

Il sovranatante è stato quindi rimosso ed il pellet di RNA è stato lavato con etanolo al 75%, agitato e centrifugato a 7500 g x 5 minuti a 4 °C.

Il sovranatante è stato quindi eliminato, il pellet di RNA lasciato ad asciugare per 10 minuti e risospeso in 50 µl di RNA Storage Solution (Ambion TX, USA), incubato 10 minuti a 60°C e successivamente congelato a -80°C.

Digestione RNA totale con DNasi

L'RNA totale è stato successivamente digerito con la DNasi I. La digestione è stata effettuata utilizzando il kit DNA-free (Ambion, Life Technologies, CA, USA) che ha come scopo l'eliminazione di eventuali contaminazioni da parte del DNA, responsabile della formazione di amplificati aspecifici durante le reazioni di amplificazione.

A 30 µl di ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di 10X DNase I Buffer e 1 µL rDNase I (2 U/ µl). I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti.

Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 0,1 µl di DNase Inactivation Reagent al fine di inattivare l'enzima e rimuovere i cationi bivalenti come magnesio e calcio, che potrebbero portare ad una degradazione dell'RNA.

I campioni sono stati poi incubati 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 10000 g per 1,5 minuti.

Il sovranatante è stato prelevato, posto in una nuova provetta e quantificato con spettrofotometro Varioskan (Thermo Scientific, DE, USA).

Digestione con DNaseI

L'RNA totale è stato successivamente digerito con la DNase I. La digestione è stata effettuata utilizzando il *kit* DNA-free (Ambion, Life Technologies, CA, USA) che ha come scopo l'eliminazione di eventuali contaminazioni da parte del DNA, responsabile della formazione di amplificati aspecifici durante le reazioni di amplificazione.

A 30 µl di ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di 10X DNase I Buffer e 1 µL rDNase I (2 U/ µl). I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti.

Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 0,1 µl di DNase Inactivation Reagent al fine di inattivare l'enzima e rimuovere i cationi bivalenti come magnesio e calcio, che potrebbero portare ad una degradazione dell'RNA.

I campioni sono stati poi incubati 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 10000 g per 1,5 minuti.

Il sovranatante è stato prelevato, posto in una nuova provetta e quantificato con spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, DE, USA).

Retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA

Per retrotrascrivere l'RNA totale estratto dai campioni è stato utilizzato il kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, DE, USA) che prevede i successivi steps.

Poly(A) tailing reaction

All'estremità 3' dei miRNA è stata legata una coda di Poly(A) secondo il seguente protocollo:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
10X Poly(A) Buffer	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
ATP	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
Poly(A) Enzyme	0.3 µL	1.3 µL	3.3 µL
RNase-free water	1.7 µL	7.5 µL	18.7 µL
Total Poly(A) Reaction Mix volume	3.0 µL	13.2 µL	33 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

3 µl della mix e 2 µl di campione contenente i 2.5 ng/µl di RNA totale sono stati distribuiti in ogni provetta.

Le provette sono state quindi incubate ai seguenti cicli termici:

Step	Temperature	Time
Polyadenylation	37°C	45 minutes
Stop reaction	65°C	10 minutes
Hold	4°C	Hold

Al termine si è proseguito con la reazione di legame dell'adattatore.

Adattatore ligation reaction

All'estremità 5' è stato legato un adattatore, che funzionerà da primer forward nella successiva reazione di preamplificazione, secondo il seguente protocollo

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
5X DNA Ligase Buffer	3 µL	13.2 µL	33 µL
50% PEG 8000 ^[2]	4.5 µL	19.8 µL	49.5 µL
25X Ligation Adaptor	0.6 µL	2.6 µL	6.6 µL
RNA Ligase	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
RNase-free water	0.4 µL	1.8 µL	4.4 µL
Total Ligation Reaction Mix volume	10 µL	44 µL	110 µL

10 µl di Ligation Reaction Mix sono stati aggiunti ad ogni provetta contenente i precedenti prodotti di reazione.

Le provette sono state quindi incubate ai seguenti cicli termici:

Step	Temperature	Time
Ligation	16°C	60 minutes
Hold	4°C	Hold

Reazione di retrotrascrizione

È stata allestita la reazione di retrotrascrizione secondo il seguente protocollo:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
5X RT Buffer	6 µL	26.4 µL	66 µL
dNTP Mix (25 mM each)	1.2 µL	5.3 µL	13.2 µL
20X Universal RT Primer	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
10X RT Enzyme Mix	3 µL	13.2 µL	33 µL
RNase-free water	3.3 µL	14.5 µL	36.3 µL
Total RT Reaction Mix volume	15 µL	66 µL	165 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

15 µl dell'RT Reaction Mix sono stati aggiunti alle provette contenente i precedenti prodotti di reazione ed incubate con il seguente ciclo termico:

Step	Temperature	Time
Reverse transcription	42°C	15 minutes
Stop reaction	85°C	5 minutes
Hold	4°C	Hold

Al termine è stata svolta la reazione di pre-amplificazione dei miRNA (miR-amp Reaction).

Reazione di pre-amplificazione dei miRNA

È stato preparato il seguente mix:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
2X miR-Amp Master Mix	25 µL	110 µL	275 µL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 µL	11 µL	27.5 µL
RNase-free water	17.5 µL	77 µL	192.5 µL
Total miR-Amp Reaction Mix volume	45 µL	198 µL	495 µL

45 µl della mix sono stati distribuiti in nuove provette a cui sono stati aggiunti 5 µl dei prodotti di retrotrascrizione.

Le provette così allestite sono state sottoposte ai seguenti cicli termici:

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 minutes	1
Denature	95°C	3 seconds	14
Anneal/Extend	60°C	30 seconds	
Stop reaction	99°C	10 minutes	1
Hold	4°C	Hold	1

I campioni così ottenuti sono stati congelati a -20 °C.

Quantificazione miRNA-222-3p e miRNA-146b-5p in RealTime PCR

La reazione di Real-Time PCR quantitativa è stata eseguita sul termociclatore QuantStudio7 Flex RealTime PCR System (Thermo Scientific, DE, USA) con l'utilizzo del kit TaqMan Advanced miRNA Assay (Thermo Scientific, DE, USA).

Il protocollo di reazione è stato preparato secondo la seguente tabella:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]
TaqMan [®] Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	44.0 µL
TaqMan [®] Advanced miRNA Assay (20X)	1 µL	4.4 µL
RNase-free water	4 µL	17.6 µL
Total PCR Reaction Mix volume	15 µL	66 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

Per ogni campione, a 15 µl di mix sono stati aggiunti 5 µl di cDNA diluito 1:10.

Il protocollo di amplificazione prevedeva i seguenti cicli termici:

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	20 seconds	1
Denature	95°C	1 second	40
Anneal / Extend	60°C	20 seconds	

Per ogni reazione di amplificazione i campioni sono stati valutati in doppio e la validità della reazione è stata valutata attraverso il controllo negativo, dove al posto del cDNA è stata aggiunta l'H₂O.

Per la normalizzazione dell'espressione dei miRNA in esame è stato utilizzato come housekeeping il miRNA-191-5p.

5 ANALISI STATISTICA

Le variabili quantitative sono riportate come media (DS) o mediana (intervallo interquartile) a seconda della normalità dei dati. Pertanto, per confrontare due gruppi è stato usato, secondo la distribuzione, il t test per dati indipendenti o il test di Mann Whitney. Le variabili qualitative sono rappresentate come frequenza assoluta ed in percentuale. Il confronto tra gruppi è stato fatto, in base alla frequenza nelle singole caselle della tavola di contingenza, con il test di chi-quadro o di Fisher. La soglia di significatività (alfa) è stata posta a 0,05. È stato usato il software IBM SPSS STATISTICS v 27 (IBM, Amork, NY).

6 RISULTATI

Le caratteristiche generali della popolazione in esame sono elencate nella TAB

1. Sono stati valutati 29 pazienti, 19 femmine e 10 maschi, di età $51,9 \pm 12,4$ anni (media $\pm$ deviazione standard). Secondo la Classificazione di Bethesda 2017 ^[48], 19 dei noduli esaminati (65%) all'esame citologico appartenevano a classi di rischio indeterminate rispettivamente così suddivise: classe III AUS/FLUS, N. 3 noduli; classe IV FN/FSN, N.15 noduli; classe V (SUSP) N. 1 nodulo. I restanti 10 noduli valutati (34%) appartenevano alla classe di rischio VI, indicativa di malignità. Tutti i noduli considerati sono stati portati a chirurgia e all'esame istologico definitivo sul pezzo operatorio 9 noduli (47%) citologicamente indeterminati sono risultati maligni. Tutti i 10 noduli risultati di classe VI alla citologia sono stati provati essere maligni all'istologia.

TAB. 1

Caratteristiche demografiche della popolazione in esame (N= 29)

Età (anni), M $\pm$ DS		51,9 $\pm$ 12,4
Sesso (F), n (%)		19 (65)
Citologia, n (%)		
	Indeterminata	19 (65)
	Maligna	10 (34)
Classe di rischio indeterminata, n (%)		
	Classe 3	3
	Classe 4	15
	Classe 5	1
Istologia maligna da citologico indeterminato (tot=19), n (%)		9 (47)
Istologia maligna da citologico maligno (tot=10), n (%)		10 (100)

L'istologia maligna era suddivisa come segue:

Carcinoma papillare variante classica: N. 8 casi; Carcinoma papillare variante follicolare: N. 8 casi; Neoplasia follicolare tiroidea non invasiva con aspetti nucleari simil-papillari (NIFTP): N, 2 casi; Carcinoma follicolare: N. 1 caso.

La prevalenza dei miRNA su esame citologico nell'intera popolazione dei noduli è riportata nella TAB 2. La prevalenza di miRNA 146b sui noduli a citologia indeterminata era del 32% mentre nei noduli a citologia maligna era 80%. Il miRNA 222 presentava una prevalenza del 95 % nei noduli appartenenti alle classi indeterminate e del 90% nei noduli a citologia maligna.

TAB. 2

Prevalenza di miRNA146b e miRNA 222 per citologia

	Citologia indeterminata (n=19)	Citologia maligna (n=10)	P*
miRNA 146b, n (%)	6 (32)	8 (80)	0,01
miRNA 222, n (%)	18 (94,7)	9 (90)	0,63

* Test Chi square

In TAB 3 si evidenziano le caratteristiche generali dei 29 noduli valutati, stratificati per classe citologica (indeterminata vs maligna). L'età dei pazienti era di 51 ± 12 (M $\pm$ DS) nei noduli a citologia indeterminata e di $54 \pm 14,0$ nei noduli a citologia maligna con una prevalenza del sesso femminile in entrambi i gruppi rispettivamente del 63 % e del 70%. Il diametro medio dei noduli è risultato significativamente più elevato nei noduli a citologia indeterminata rispetto ai noduli a citologia maligna (21 ± 13 mm nei noduli indeterminati vs 11 ± 3 mm nei noduli a citologia maligna, $P= 0.005$). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra noduli a citologia indeterminata e noduli a citologia maligna riguardo a: ipoecogenicità, tipo di struttura (solida o non solida), struttura, margini (regolari o irregolari), disomogeneità, microcalcificazioni, aspetto taller than wide ed elasticità all'elastografia.

TAB. 3

Caratteristiche dei noduli stratificati per citologia indeterminata e maligna

	Citologia Indeterminata (N 19)	Citologia Maligna (N10)	P*
Diametro medio (mm), M±DS	21 ± 13	11 ± 3	0,005
Età (anni), M±DS	51± 12	54 ± 14,0	0,56
Sesso (F), n (%)	12 (63,2)	7 (70)	0,71
Ipoecogenicità, n (%)	13 (68,4)	9 (90)	0,19
Struttura solida, n (%)	15 (78,9)	10 (100)	0,12
Margini irregolari, n (%)	7 (36,8)	6 (60)	0,23
Disomogeneità, n (%)	10 (52,6)	8 (80)	0,15
Microcalcificazioni, n (%)	6 (31,6)	4 (40)	0,65
Aspetto TTW, n (%)	5 (26,3)	4 (40)	0,45
Anelasticità all'elastografia, n (%)	11 (57,9)	7 (70)	0,52

* Chi square test

Quando i 19 noduli risultati maligni all'esame istologico sono stati suddivisi a seconda della loro iniziale citologia, indeterminata o maligna, nessuna differenza significativa è stata riscontrata riguardo a sesso e caratteristiche ecografiche. Anche la frequenza di miRNA 146b o 222 non differiva tra i due gruppi di noduli maligni. Tuttavia, la frequenza di miRNA 146b risultava più elevata nei noduli maligni (55% vs 90% nei noduli maligni citologicamente indeterminati vs noduli citologicamente maligni), mentre quella del miRNA 222 risultava pari al 100% in entrambi i tipi di noduli (TAB 4).

TAB. 4

Caratteristiche dei noduli ad istologia maligna stratificati per citologia indeterminata vs maligna

	Citologia indeterminata (n=9)	Citologia maligna (n=10)	P*
Sesso (F), n (%)	6 (66,6)	7 (70)	1,0
Ipoecogenicità, n (%)	6 (66,6)	9 (90)	0,3
Struttura solida, n (%)	8 (88,8)	10 (100)	1,0
Microcalcificazioni, n (%)	4 (44,4)	4 (40)	1,0
Aspetto TTW, n (%)	3 (33,3)	4 (40)	1,0
Anelasticità all'elastografia, n (%)	5 (55,5)	9 (90)	0,65
Vascolarizzazione, n (%)§	8 (88,8)	8 (88,8)	0,13
Disomogeneità, n (%)	4 (44,4)	8 (88,8)	0,17
miRNA 146b, n (%)	5 (55,5)	9 (90)	0,14
miRNA 222, n (%)	9 (100)	10 (100)	1,0

§Calcolata intra e perinodulare

*Test di Fisher

Considerando i noduli maligni all'istologia, sono inoltre stati calcolati i valori assoluti di miRNA 146b e 222 nei noduli a citologia indeterminata (TAB 5) ed i noduli a citologia maligna (TAB 6). I risultati sono anche riportati nella FIG 7. Il confronto dei valori assoluti di miRNA 146b e 222 tra queste due tipologie citologiche di noduli, non ha prodotto risultati significativi (P= 0,095 e 0,60 rispettivamente per miRNA 146b e 222) (TAB 7)

TAB. 5

Valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 nei noduli ad istologia maligna con citologia indeterminata all'agoaspirato (n=9)

		2 ^{-ΔCt} miR-146b-5p	2 ^{-ΔCt} miR-222-3p
Percentili			
	25°	0,00000	0,0010895
	50°	0,00005	0,003773
	75°	0,000531	0,061852

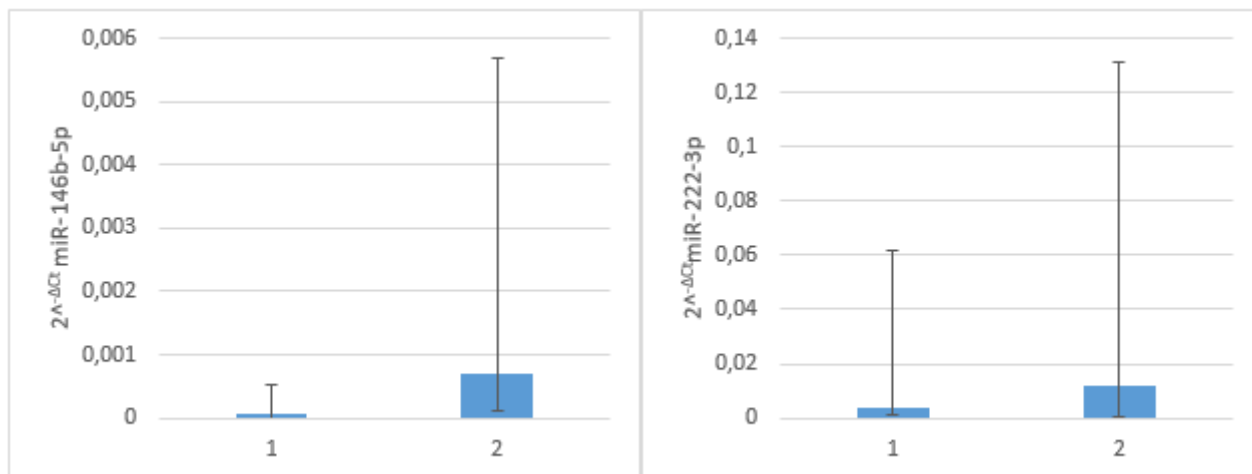
TAB. 6

Valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 nei noduli ad istologia maligna con citologia maligna all'agoaspirato (n=10)

		2 ^{-ΔCt} miR-146b-5p	2 ^{-ΔCt} miR-222-3p
Percentili			
	25°	0,000101	0,00046525
	50°	0,00703	0,011642
	75°	0,005743	0,13078425

FIG. 7

Espressione di miRNA 146b e miRNA 222 in noduli maligni a citologia indeterminata (1) e maligna (2). Mediana, 25°-75° percentile



TAB. 7

Confronto dei valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 tra noduli istologicamente maligni a citologia indeterminata e noduli istologicamente maligni a citologia maligna

	2 ^{-ΔCt} miR-146b-5p	2 ^{-ΔCt} miR-222-3p
U di Mann-Whitney	24,500	38,000
Sign. asintotica (a due code)	0,091	0,568
Sign. esatta [2*(sig. a una coda)]	0,095	0,604

Considerando solamente i noduli a citologia indeterminata, sono stati presi in esame i valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 in quelli che poi sono risultati maligni e benigni all'istologia (TAB 8 e TAB 9), FIG 8. Il confronto tra questi due gruppi di noduli non ha mostrato alcuna differenza dei valori assoluti di miRNA ($P= 0,18$ e $0,21$ rispettivamente per miRNA 146b e 222) (TAB 10).

Nessuna associazione è stata identificata tra miRNA 146b o 222 ed i caratteri ecografici di rischio (dati non riportati).

TAB. 8

Valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 nei noduli a citologia indeterminata risultati benigni all'istologia

		2 ^{-ΔCt} miR-146b-5p	2 ^{-ΔCt} miR-222-3p
Percentili	25°	0,000000	0,000376
	50°	0,000000	0,0018495
	75°	0,000048	0,0113905

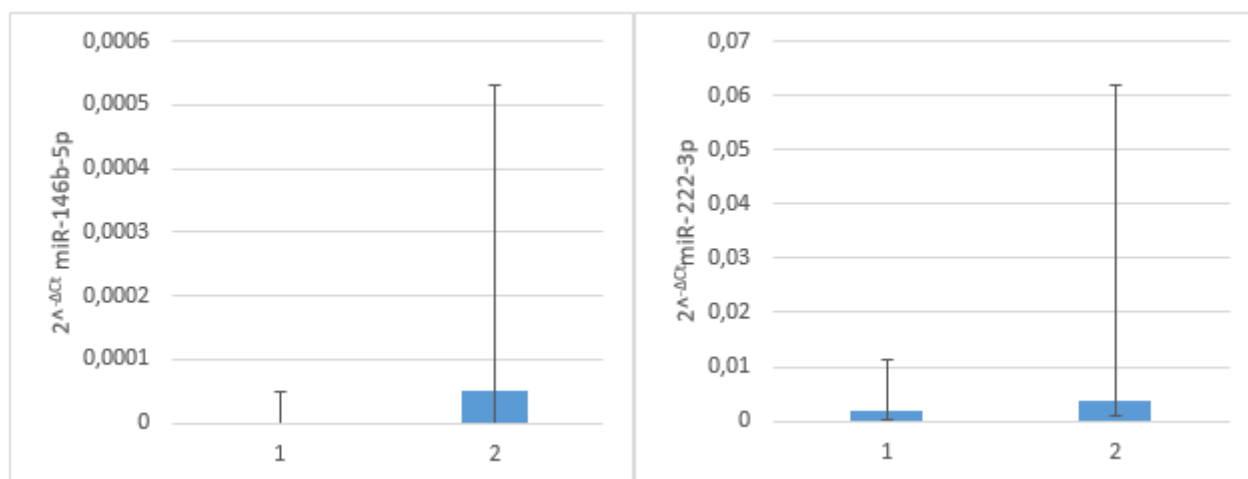
TAB. 9

Valori assoluti di miRNA 146b e 222 nei noduli a citologia indeterminata risultati maligni all'istologia

		2 ^{^-ΔCt} miR-146b-5p	2 ^{^-ΔCt} miR-222-3p
Percentili	25°	0,00000	0,0010895
	50°	0,00005	0,003773
	75°	0,000531	0,061852

FIG. 8

Espressione di miRNA 146b e miRNA 222 in noduli indeterminati con istologia benigna (1) e maligna (2). Mediana, 25°-75° percentile



TAB. 10

Confronto dei valori assoluti di miRNA 146b e miRNA 222 tra noduli a citologia indeterminata e successiva istologia benigna e noduli indeterminati e successiva istologia maligna

	2⁻ΔCt miR-146b-5p	2⁻ΔCtmiR-222-3p
U di Mann-Whitney	28,00	29,50
Sign. asintotica (a due code)	0,109	0,205
Sign. esatta [2*(sig. a una coda)]	0,182	0,211

Nella TAB 11 sono stati riportati i valori di espressione di miRNA 146b e 222 nei noduli che sono risultati maligni all'istologia ed il successivo outcome del paziente al FU.

Dei 19 noduli originariamente appartenenti a questo gruppo, 4 sono stati persi al FU mentre un paziente non aveva ancora raggiunto i 6 mesi di FU. Pertanto, la valutazione è stata possibile solo per 14 pazienti. Di questi, 9 sono stati sottoposti a terapia radiometabolica (RAI) mentre in 5 di essi non sussistevano le indicazioni per tale terapia. Il FU è stato espresso in mesi e valutato come mediana + range interquartile (IQR). Nel gruppo RAI, la mediana di FU è stata di 18 mesi mentre nel gruppo non-RAI la mediana è stata di 24 mesi. Nella tabella sono descritti i valori assoluti dell'espressione dei miRNA 146b e miRNA 222 nel gruppo RAI e nel gruppo non-RAI. I valori assoluti

dell'espressione di miRNA non presentavano alcuna differenza significativa tra i due gruppi (P=0,6 e 0,08 rispettivamente per miRNA146b e miRNA 222), sebbene miRNA 222 risultasse tendenzialmente più basso nei soggetti che non necessitavano di RAI. Un solo soggetto tra i 14 analizzati è risultato non libero da malattia a 24 mesi di FU. Nel nodulo di tale soggetto il valore di miRNA 146b era indosabile ed il valore di miRNA 222 era comparabile a quello osservato nella maggior parte dei rimanenti noduli.

TAB. 11

Pazienti con istologia maligna: Valori assoluti dell'espressione di miRNA 146b e 222 valutati su agoaspirato del nodulo e follow-up dei pazienti

	2⁻ΔCtmiR-146b-5p percentili		2⁻ΔCtmiR-222-3p percentili		Follow up mesi mediana (IQR)	Pazienti liberi da malattia
RAI (n 9)	25°	0,0000005	25°	0,0065320	18 (9)	8
	50°	0,0006220	50°	0,0824690		
	75°	0,0072410	75°	0,1374315		
Non RAI (n 5)	25°	0,0000610	25°	0,0018410	24 (18)	5
	50°	0,0004400	50°	0,0049440		
	75°	0,0007030	75°	0,0298725		

IQR= interquartile range

Mann-Whitney test:

miRNA 146b in RAI vs non-RAI P= 0,6

miRNA 222 in RAI vs non-RAI P= 0,08

7 DISCUSSIONE

In questo studio è stato valutato se l'utilizzo di marcatori biomolecolari, quali il miRNA 146b ed il miRNA 222, possa migliorare la stima di rischio dei noduli tiroidei e se vi sia una relazione tra positività di tali marcatori ed outcome post-chirurgico nei noduli ad istologia maligna, pur con la limitazione dovuta alla bassa numerosità campionaria.

Nella casistica considerata nel presente studio, è stata riscontrato una percentuale di malignità in noduli indeterminati pari al 47%. Considerando che la maggior parte dei noduli indeterminati era costituito da noduli di classe IV sec Bethesda, la percentuale di malignità risulta tendenzialmente più elevata rispetto ai dati della letteratura. Va comunque considerato che, data la bassa numerosità campionaria, l'inclusione della classe V Bethesda negli indeterminati ha indubbiamente innalzato il tasso di malignità in tale popolazione di noduli. Infatti, considerando solamente classi 3 e 4 tra i noduli indeterminati compresi nello studio, il tasso di malignità sarebbe del 42%.

Considerando tutti i noduli a citologia indeterminata e confrontandoli con tutti i noduli a citologia maligna, è stata documentata una prevalenza più bassa del miRNA 146b nei noduli a citologia indeterminata rispetto ai noduli a citologia maligna, mentre la prevalenza di positività del miRNA 222 è sovrapponibile tra queste due tipologie di noduli.

Nel complesso, i noduli a citologia indeterminata presentavano un diametro maggiore rispetto ai noduli a citologia maligna. Questi dati sono in linea con altri report della letteratura. Deve essere infatti considerato che noduli a citologia indeterminata (in passato definita come “follicolare”) sono stati documentati essere in genere di diametro maggiore rispetto a noduli con altre tipologie di cellularità [83].

Inoltre, la citologia indeterminata dei noduli tiroidei è associata alla presenza di carcinomi follicolari o a cellule di Hurthle [48] che secondo alcuni report presentano diametro maggiore rispetto ai carcinomi papillari [84,85].

In questo studio non è stato identificato un ruolo per i miRNA 146b e 222 nella stima del rischio di malignità dei noduli a citologia indeterminata. Questi dati non appaiono in linea con quelli di Sponziello e collaboratori i quali hanno mostrato alta specificità e PPV per miRNA 146 in noduli tiroidei indeterminati, anche se gli stessi autori ne identificano l’uso ottimale insieme con un’analisi mutazionale che invece mostra alta sensibilità e NPV [86].

Quando abbiamo considerato i noduli ad istologia maligna, i due miRNA considerati in questo studio non hanno mostrato una diversa prevalenza. Tuttavia, il miRNA 146b ha mostrato una tendenza verso una minore frequenza nei noduli istologicamente maligni, ma a citologia indeterminata, rispetto ai noduli istologicamente maligni a citologia maligna (rispettivamente 55 e 90%), mentre il miRNA 222 è stato riscontrato nel 100% dei noduli maligni

indipendentemente dalla loro citologia. Deve comunque essere considerato che una larga proporzione di noduli benigni erano positivi per la ricerca di miRNA, soprattutto il 222 e nessuna correlazione è stata riscontrata tra positività di miRNA 146b o miRNA 222 ed istologia maligna nei noduli a citologia indeterminata (Chi-square test $p= 0,69$ e $1,17$ rispettivamente per miRNA 146b e 222, dati non riportati). Tali risultati sono stati confermati anche considerando, per ciascuno dei due miRNA, i valori assoluti di espressione.

L'uso dei miRNA nella stima del rischio di malignità dei noduli tiroidei è stato oggetto di diversi studi. In particolare, Mazeh e collaboratori hanno analizzato l'espressione di 6 miRNA (miR-21, -31, -146b, -187, -221 e -222) in 11 agoaspirati tiroidei indeterminati con una prevalenza di malignità di 63%, sensibilità 89%, specificità 100%, PPV 100% NPV 66% [87].

Sono anche stati effettuati studi di accorpamento di valutazioni mutazionali e di miRNA. Un incremento della stima di rischio in noduli indeterminati è stato proposto, con tale metodica da alcuni autori [73,74,86]. Un altro esempio è costituito da un test commerciale denominato, ThyGeNEXT®, un cosiddetto targeted next-generation sequencing test che valuta mutazioni in 10 geni (BRAF, H-, K-, and N-RAS, TERT, ALK, GNAS, RET, PTEN, and PIK3CA) and 38 diverse fusioni geniche che coinvolgono ALK, BRAF, NTRK-1, -2, e -3, PPARG, RET e THADA [64].

Al fine di incrementare la sensibilità ed il NPV, del pannello di genotipizzazione, la ditta che commercializza questo test lo ha appaiato ad un cosiddetto complementary miRNA expression classifier, denominato ThyraMIR®. Campioni per i quali non sono identificate mutazioni o fusioni geniche attraverso il suddetto test di genotipizzazione, vengono ulteriormente processati mediante ThyraMIR® che è basato sul pattern di espressione di 10 miRNA (miR-29b-1-5p, miR31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, miR-551b-3p). I risultati di tale metodica sono promettenti nell'ottica di individuazione di quei noduli indeterminati per i quali può essere evitato il ricorso a terapia chirurgica [88,89]. Anche per quanto riguarda noduli già maligni alla citologia, si sta prospettando un contenimento dell'invasività chirurgica ed alcuni studi sono stati effettuati con l'intento di monitorare il paziente senza ricorrere all'intervento chirurgico per noduli citologicamente maligni [23, 90-93].

In tale ambito risulta molto opportuno poter disporre di marker che possano predire l'outcome di tali pazienti in modo da poter meglio definire il rischio connesso al mantenimento in sede del nodulo citologicamente maligno. Come già precedentemente accennato alcuni marker biomolecolari, quali il BRAF V600E ed il TERT-p, sono considerati utili marcatori biomolecolari di outcome^[56-60]. In aggiunta, alcuni autori hanno sottolineato un possibile analogo ruolo per alcuni tipi di miRNA. In merito a quest'ultimo argomento, sono stati effettuati numerosi studi. Tuttavia, diversi miRNA sono stati

proposti, anche se uno di quelli più indicati come marker significativo è stato il miRNA 146b con valutazioni effettuate, tuttavia, principalmente nel carcinoma papillare [72,75,79]. L'argomento riguardante il rapporto tra miRNA e diagnosi e prognosi del carcinoma tiroideo differenziato merita quindi ancora ulteriori delucidazioni. Recentemente, miRNA 146b e miRNA 222, dosati su plasma del paziente, sono stati proposti come fattori predittivi di outcome negativo in pazienti affetti da carcinoma tiroideo differenziato nei suoi diversi istotipi [70]. Indubbiamente, la valutazione su plasma o siero del paziente può comportare diversi bias di campionamento. Pertanto, basandoci su tali dati, in questo studio è stato considerato il dosaggio di miRNA 146b e miRNA 222 su materiale da agoaspirazione dei noduli tiroidei verificando la possibilità che tali marcatori biomolecolari possano rivestire un ruolo nella definizione diagnostica pre-chirurgica di noduli indeterminati e nella stima di outcome al FU del paziente con carcinoma differenziato della tiroide nei suoi vari istotipi. I dati del presente studio non permettono un'analisi completa su questo argomento. Con una mediana di FU di 18 mesi nei soggetti sottoposti a RAI post-tiroidectomia e di 24 mesi nei soggetti non sottoposti a RAI, solo un paziente, su 14 per i quali era disponibile il FU, mostrava persistenza di malattia, ancora evidente a 24 mesi.

Il presente studio si differenzia dalle succitate esperienze poiché nel presente protocollo i miRNA in esame sono stati dosati su citoaspirato. Non si può quindi escludere che differenze tra i risultati di questo studio rispetto allo studio

precedente possano derivare dalla diversa metodologia di valutazione dei miRNA.

Indubbiamente il periodo di FU del presente studio è breve; inoltre, i pazienti per cui era possibile avere i dati di FU erano pochi e la maggior parte di essi presentavano assenza di malattia al FU. Dati più solidi potranno essere ottenuti con l'ampliamento della casistica e l'allungamento del periodo di FU.

Il rapporto tra citologia e scelta di un successivo intervento chirurgico rappresenta uno degli argomenti più attuali nella condotta terapeutica del nodulo tiroideo.

Nel presente studio, il counseling pre-chirurgico dei noduli citologicamente indeterminati o maligni è stato condotto nel rispetto dei suggerimenti derivanti dalle Linee Guida ATA 2015 ^[23] esponendo chiaramente al paziente il rischio di malignità previsto dalla classe citologica del nodulo e concordando il tipo di intervento con il paziente stesso.

Tutti i 10 pazienti che presentavano noduli a citologia maligna sono stati sottoposti a tiroidectomia totale, con successivo riscontro istologico di malignità nel 100% dei casi.

Nel gruppo dei 19 pazienti che presentavano noduli a citologia indeterminata, 9 (47%) sono stati sottoposti a tiroidectomia totale. In 5 di tali pazienti è stata riscontrata un'istologia maligna. Dieci pazienti (53%) dello stesso gruppo sono invece stati sottoposti ad emitiroidectomia. Di tali pazienti, 4 presentavano una diagnosi di malignità all'istologico e 2 di essi hanno dovuto subire una

tiroidectomia di totalizzazione al fine di poter essere poi sottoposti a terapia radiometabolica, prevista per il quadro istologico, configurandosi di fatto, per questi pazienti, una condizione di undertreatment al primo intervento.

Questi dati confermano la difficoltà, ben nota in letteratura, a stabilire un approccio chirurgico ottimale nei noduli tiroidei, soprattutto a quelli citologicamente indeterminati, facendo riferimento solamente alla categoria citologica. La possibilità che ne deriva è quella di un overtreatment (riscontrato in questo studio nel 21% dei soggetti con citologia indeterminata) o, all'opposto, di un trattamento chirurgico che necessita di totalizzazione.

Per questo motivo, diversi gruppi di ricerca stanno cercando di identificare pannelli biomolecolari che possano migliorare la stima di malignità di noduli tiroidei ed anche la stima di outcome del paziente dopo l'intervento chirurgico. Altri gruppi hanno cercato di verificare la possibilità di accorpare indagini molecolari con i caratteri ecografici di sospetto ^[94].

L'intento comune è sempre quello di limitare l'invasività dell'atto chirurgico. È infatti importante ricordare che la scelta di un intervento di tiroidectomia totale, rispetto ad un'emitiroidectomia, può avere un importante impatto sulla qualità di vita del paziente, soprattutto relativamente alla necessità della terapia ormonale sostitutiva ed all'aumento di complicanze operatorie con possibilità di ipoparatiroidismo e disfonia permanenti.

Il punto di forza di questo studio è rappresentato dal disegno prospettico, dal fatto di essere monocentrico riguardo all'esecuzione di ecografia tiroidea,

dell'agoaspirato, della lettura citologica, dell'esame istologico e del dosaggio dei miRNA.

Il principale punto di debolezza è rappresentato dalla scarsa numerosità campionaria, anche se lo studio in oggetto deve essere considerato come una valutazione ad interim.

In conclusione, i risultati di questo studio, pur rappresentando una valutazione preliminare, non mostrano un ruolo significativo di miRNA 146b e miRNA 222, valutati su agoaspirato tiroideo, nel migliorare la stima di rischio dei noduli tiroidei o la predizione dell'outcome di pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide.

Indubbiamente, l'aumento della casistica e l'accorpamento del dosaggio di tali miRNA con pannelli mutazionali potrà meglio affrontare la problematica oggetto del presente studio.

Tutto ciò, nella prospettiva di individuare marker molecolari che possano avere un valore prognostico. Ciò permetterebbe di stratificare i pazienti in diversi gruppi di rischio con conseguente miglioramento del programma chirurgico che potrebbe essere in tal modo meglio ritagliato sul singolo paziente.

8 BIBLIOGRAFIA

- 1 Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019 Mar;48(1):23-35.
- 2 Reiners C, Wegscheider K, Schicha H, Theissen P, Vaupel R, Wrbitzky R, Schumm-Draeger PM. Prevalence of thyroid disorders in the working population of Germany: ultrasonography screening in 96,278 unselected employees. *Thyroid*. 2004;14:926-32.
- 3 Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:699-706.
- 4 Bartolotta T, Midiri M, Runza G, et al. Incidentally discovered thyroid nodules: incidence, and greyscale and colour Doppler pattern in an adult population screened by real-time compound spatial sonography. *Radiol Med* 2006;111(7):989–98.
- 5 Laurberg P, Jørgensen T, Perrild H, et al. The Danish investigation on iodine intake and thyroid disease, DanThyr: status and perspectives. *Eur J Endocrinol* 2006;155(2):219–28.
- 6 Schneider AB, Ron E, Lubin J, et al. Dose-response relationships for radiation-induced thyroid cancer and thyroid nodules: evidence for the prolonged effects of radiation on the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(2):362–9.
- 7 Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295(18):2164–7.
- 8 Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, et al. Thyroid incidentalomas: prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994;154(16):1838–40.
- 9 Yousem D, Huang T, Loevner LA, et al. Clinical and economic impact of incidental thyroid lesions found with CT and MR. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997;18(8):1423–8.

- 10 Steele SR, Martin MJ, Mullenix PS, et al. The significance of incidental thyroid abnormalities identified during carotid duplex ultrasonography. *Arch Surg* 2005;140(10):981–5.
- 11 Cohen MS, Arslan N, Dehdashti F, et al. Risk of malignancy in thyroid incidentalomas identified by fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Surgery* 2001;130(6):941–6.
- 12 Smith-Bindman R, Lebda P, Feldstein VA, et al. Risk of thyroid cancer based on thyroid ultrasound imaging characteristics: results of a population-based study. *JAMA Intern Med* 2013;173(19):1788–95.
- 13 Yoon DY, Chang SK, Choi CS, et al. The prevalence and significance of incidental thyroid nodules identified on computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 2008;32(5):810–5.
- 14 Hoang JK, Grady AT, Nguyen XV. What to do with incidental thyroid nodules identified on imaging studies? Review of current evidence and recommendations. *Curr Opin Oncol* 2015;27(1):8–14.
- 15 Nguyen X, Choudhury KR, Eastwood J, et al. Incidental thyroid nodules on CT: evaluation of 2 risk-categorization methods for work-up of nodules. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34(9):1812–7.
- 16 Grady A, Sosa J, Tanpitukpongse T, et al. Radiology reports for incidental thyroid nodules on CT and MRI: high variability across subspecialties. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36(2):397–402.
- 17 Mortensen J, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1955;15(10):1270–80.
- 18 Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A “normal” finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer* 1985;56(3):531–8.
- 19 Furuya-Kanamori L, Bell KJL, Clark J, et al. Prevalence of differentiated thyroid cancer in autopsy studies over six decades: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2016;34(30):3672–9.
- 20 Hoang JK, Riofrio A, Bashir MR, Kranz PG, Eastwood JD. High variability in radiologists' reporting practices for incidental thyroid nodules detected on CT and MRI. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014 Jun;35(6):1190-4.

- 21 Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140:317-22.
- 22 Sosa JA, Hanna JW, Robinson KA, et al. Increases in thyroid nodule fine-needle aspirations, operations, and diagnoses of thyroid cancer in the United States. *Surgery* 2013;154(6):1420–7.
- 23 Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 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 Jan;26(1):1-133.
- 24 Pacini F, Vorontsova T, Demidchik EP, Molinaro E, Agate L, Romei C, Shavrova E, Cherstvoy ED, Ivashkevitch Y, Kuchinskaya E, Schlumberger M, Ronga G, Fi lesi M, Pinchera A. Post –Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3563-69.
- 25 Curtis RE, Rowlands PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, Fraumeni JF, Boice JD, Jr. Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997;336:897-904.
- 26 Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, Paschke R, Valcavi R, Vitti P; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association Of Clinical Endocrinologists, American College Of Endocrinology, And Associazione Medici Endocrinologi, Medical Guidelines For Clinical Practice For The Diagnosis And Management Of Thyroid Nodules 2016 Update. *Endocr Pract* . 2016 May;22(5):622-39.
- 27 Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and metaanalysis. *Eur J Endocrinol*. 2014;170:R203-11.
- 28 Papini E, Guglielmi R, Bianchini A. Risk of malignancy in non palpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1941-6.

- 29 Moon WJ, Jung SL, Lee JH. Benign and malignant thyroid nodules: US differentiation multicenter retrospective study. *Radiology*. 2008;247:762-70.
- 30 Kim EK, Park CS, Chung WY. New sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *AJR Am J Roentgenol* . 2002;178:687-91.
- 31 Choi YJ, Shin JH, Kim JH, Jung SL, Son EJ, Oh YL. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: sonographic and clinical findings. *J Ultrasound Med*. 2011;30: 853-58.
- 32 Yoon JH, Kim EK, Hong SW, Kwak JY, Kim MJ. Sonographic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2008;27:1431-37.
- 33 Kwak JY, Kim EK, Hong SW. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: ultrasound features with histopathological correlation. *Clin Radiol* . 2007;62:382-86.
- 34 Shin JH, Han BK, Ko EY, Oh YL, Kim JH. Differentiation of widely invasive and minimally invasive follicular thyroid carcinoma with sonography. *Eur J Radiol*. 2010;74:453-57.
- 35 Trimboli P, Giovanella L, Crescenzi A, Romanelli F, Valabrega S, Spriano G, Cremonini N, Guglielmi R, Papini E. Medullary thyroid cancer diagnosis: an appraisal . *Head Neck*. 2014;36:1216-23.
- 36 Maizlin ZV, Wiseman SM, Vora P. Hurthle cell neoplasms of the thyroid: sonographic appearance and histologic characteristics. *J Ultrasound Med*. 2008;27:751-57.
- 37 Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P. Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2917-22.
- 38 Russ G, Royer B, Bigorgne C, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M, Leenhardt L. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. *Eur J Endocrinol* . 2013; 168:649-55.
- 39 Azizi G, Keller J, Lewis M, Puett D, Rivenbark K, Malchoff C. Performance of elastography for the evaluation of thyroid nodules: a prospective study. *Thyroid*. 2013;23:734-40.

- 40 Perros P, Boelaert K, Colley S, Evans C, Evans RM, Gerrard Ba G, Gilbert J, Harrison B, Johnson SJ, Giles TE, Moss L, Lewington V, Newbold K, Taylor J, Thakker RV, Watkinson J, Williams GR; British Thyroid Association. Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Jul;81 Suppl 1:1-122.
- 41 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 Sep;6(5):225-237.
- 42 Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132:658-65.
- 43 Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a metaanalysis. *Acta cytologica*. 2012;56:333-39.
- 44 Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, Vielh P, DeMay RM, Sidawy MK, Frable WJ. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* . 2008;36:425-37
- 45 Del Rio P, Cozzani F, Corcione L, Viani L, Loderer T, Rossini M. Correlation between cytological and histological findings in patients who underwent thyroidectomy. Predictive value and confounders. *Minerva Endocrinol*. 2019 Dec;44(4):357-362. doi: 10.23736/S0391-1977.18.02845-6.
- 46 Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, Fadda G, Frasoldati A, Orlandi F, Palombini L, Papini E, Zini M, Pontecorvi A, Vitti P. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest* . 2014 Jun;37(6):593-9.
- 47 Cross PA, Chandra A, Giles T, et al. Guidance on the reporting of thyroid cytology specimens. Royal College of Pathologists, 2009
- 48 Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol*. 2017 Nov-Dec;6(6):217-222.
- 49 Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of “follicular neoplasm”: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.

- 50 Decaussin-Petrucci M, Descotes F, Depaepe L, et al. Molecular testing of BRAF, RAS and TERT on thyroid FNAs with indeterminate cytology improves diagnostic accuracy. *Cytopathology*. 2017;28:482-487
- 51 Otori NP, Nikiforova MN, Schoedel KE, LeBeau SO, Hodak SP, Seethala RR, Carty SE, Ogilvie JB, Yip L, Nikiforov YE. Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of “follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance.” *Cancer Cytopathol* 2010;118:17-23.
- 52 Macerola E, Rago T, Proietti A, Basolo F, Vitti P. The mutational analysis in the diagnostic work-up of thyroid nodules: the real impact in a center with large experience in thyroid cytopathology. *J Endocrinol Investig* 2019 Feb;42(2):157-166.
- 53 Nikiforov YE, OtoriNP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3390- 7.
- 54 Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer *Nat. Rev. Endocrinol*. 2011; 7, 569–580
- 55 Bongiovanni M, Trimboli P, Rossi ED, Fadda G, Nobile A, Giovanella L. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: High-yield thyroid fine-needle aspiration cytology: an update focused on ancillary techniques improving its accuracy. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(2):R53-63.
- 56 Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, et al. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and metanalysis. *Medicine (Baltimore)* 2012;91:274- 286.
- 57 Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a metanalysis. *Cancer* 2012;118:1764- 1773.
- 58 Penna GC, Pestana A, Cameselle JM et al. TERTp mutation is associated with a shorter progression free survival in patients with aggressive histology subtypes of follicular-cell derived thyroid carcinoma. *Endocrine* 2018;61(3):489-498
- 59 Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA. 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.

60 Kim TH, Kim YE, Ahn S, Kim JY, Ki CS, Oh YL, Kim K, Yun JW, Park WY, Choe JH, Kim JH, Kim JS, Kim SW, Chung JH. TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(10):813-23.

61 Colombo C, Muzza M, Pogliaghi G, Palazzo S, Vannucchi G, Vicentini L, Persani L, Gazzano G, Fugazzola L. The thyroid risk score (TRS) for nodules with indeterminate cytology. *Endocr Relat Cancer.* 2021 Apr;28(4):225-235

62 Nicholson KJ, Roberts MS, McCoy KL, Carty SE, Yip L. Molecular Testing Versus Diagnostic Lobectomy in Bethesda III/IV Thyroid Nodules: A Cost-Effectiveness Analysis. *Thyroid.* 2019 Sep;29(9):1237-1243.

63 Sciacchitano S, Lavra L, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, Salehi LB, Trovato M, Drago C, Bartolazzi A. Comparative analysis of diagnostic performance, feasibility and cost of different test-methods for thyroid nodules with indeterminate cytology. *Oncotarget.* 2017 Jul 25;8(30):49421-49442

64 Muzza M, Colombo C, Pogliaghi G, Karapanou O, Fugazzola L. Molecular markers for the classification of cytologically indeterminate thyroid nodules. *J Endocrinol Invest.* 2020 Jun;43(6):703-716.

65 Santos MTD, Buzolin AL, Gama RR, Silva ECAD, Dufloth RM, Figueiredo DLA, Carvalho AL. Molecular Classification of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Development and Validation of a Highly Sensitive and Specific New miRNA-Based Classifier Test Using Fine-Needle Aspiration Smear Slides. *Thyroid.* 2018 Dec;28(12):1618-1626.

66 Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 2007 Sep 25;6:60.

67 Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Taheri M. The role of microRNAs in the pathogenesis of thyroid cancer. *Noncoding RNA Res.* 2020 Jun 20;5(3):88-98.

68 Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1600-8. doi: 10.1210/jc.2007-2696.

- 69 Marini F, Luzi E, Brandi ML. MicroRNA Role in Thyroid Cancer Development. *J Thyroid Res*. 2011;2011:407123.
- 70 Gómez-Pérez AM, Cornejo Pareja IM, García Alemán J, Coín Aragüez L, Sebastián Ochoa A, Alcaide Torres J, Molina Vega M, Clu Fernández C, Mancha Doblas I, Tinahones FJ. New molecular biomarkers in differentiated thyroid carcinoma: Impact of miR-146, miR-221 and miR-222 levels in the evolution of the disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019 Jul;91(1):187-194.
- 71 Xiang D, Tian B, Yang T, Li Z. miR-222 expression is correlated with the ATA risk stratifications in papillary thyroid carcinomas. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Jun;98(25):e16050.
- 72 Kondrotienė A, Daukša A, Pamedytė D, Kazokaitė M, Žvirblienė A, Daukšienė D, Simanavičienė V, Klimaitė R, Golubickaitė I, Stakaitis R, Šarauskas V, Verkauskienė R, Žilaitienė B. Papillary Thyroid Carcinoma Tissue miR-146b, -21, -221, -222, -181b Expression in Relation with Clinicopathological Features. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Mar 2;11(3):418.
- 73 Rosignolo F, Memeo L, Monzani F, Colarossi C, Pecce V, Verrienti A, Durante C, Grani G, Lamartina L, Forte S, Martinetti D, Giuffrida D, Russo D, Basolo F, Filetti S, Sponziello M. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2017 May;50(5):1767-1777.
- 74 Rosignolo F, Sponziello M, Giacomelli L, Russo D, Pecce V, Biffoni M, Bellantone R, Lombardi CP, Lamartina L, Grani G, Durante C, Filetti S, Verrienti A. Identification of Thyroid-Associated Serum microRNA Profiles and Their Potential Use in Thyroid Cancer Follow-Up. *J Endocr Soc*. 2017 Jan 12;1(1):3-13.
- 75 Chou CK, Yang KD, Chou FF, Huang CC, Lan YW, Lee YF, Kang HY, Liu RT. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Feb;98(2):E196-205
- 76 Wójcicka A, Kolanowska M, Jazdzewski K. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol*. 2016 Mar;174(3):R89-98. doi: 10.1530/EJE-15-0647.
- 77 Wei WJ, Wang YL, Li DS, Wang Y, Wang XF, Zhu YX, Yang YJ, Wang ZY, Ma YY, Wu Y, Jin L, Ji QH, Wang JC. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-Mir-146a sequence and thyroid carcinogenesis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56638.

- 78 Guo Z, Hardin H, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Righi A, Maletta F, Sapino A, Lloyd RV. In Situ Hybridization Analysis of miR-146b-5p and miR-21 in Thyroid Nodules: Diagnostic Implications. *Endocr Pathol*. 2015 May;26(2):157-63
- 79 Acibucu F, Dökmetaş HS, Tutar Y, Elagoz S, Kilicli F. Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Mar;122(3):137-43
- 80 Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):676-91.
- 81 Pacini F, Basolo F, Bellantone R, et al Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six Italian societies. 2018 Jul;41(7):849-876
- 82 Lamartina L, Grani G, Arvat E, Nervo A, Zatelli MC, Rossi R, Puxeddu E, Morelli S, Torlontano M, Massa M, Bellantone R, Pontecorvi A, Montesano T, Pagano L, Daniele L, Fugazzola L, Ceresini G, Bruno R, Rossetto R, Tumino S, Centanni M, Meringolo D, Castagna MG, Salvatore D, Nicolucci A, Lucisano G, Filetti S, Durante C. 8th edition of the AJCC/TNM staging system of thyroid cancer: what to expect (ITCO#2). *Endocr Relat Cancer*. 2018 Mar;25(3):L7-L11.
- 83 Raparia K, Min SK, Mody DR, Anton R, Amrikachi M. Clinical outcomes for “suspicious” category in thyroid fine-needle aspiration biopsy: patient’s sex and nodule size are possible predictors of malignancy. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(5):787–790
- 84 Kamran SC, Marqusee E, Kim MI, et al. Thyroid nodule size and prediction of cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2): 564–570
- 85 Marina M, Ceda GP, Corcione L, Sgargi P, Michiara M, Silini EM, Ceresini G. Size of thyroid carcinoma by histotype and variants: A population-based study in a mildly iodine-deficient area. *Head Neck*. 2017 Oct;39(10):2095-2103.
- 86 Sponziello M, Brunelli C, Verrienti A, Grani G, Pecce V, Abballe L, Ramundo V, Damante G, Russo D, Lombardi CP, Durante C, Rossi ED, Straccia P, Fadda G, Filetti S. Performance of a dual-component molecular assay in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Endocrine*. 2020 May;68(2):458-465.

- 87 Mazeh H, Deutch T, Karas A, Bogardus KA, Mizrahi I, Gur-Wahnon D, Ben-Dov IZ. Next-Generation Sequencing Identifies a Highly Accurate miRNA Panel That Distinguishes Well-Differentiated Thyroid Cancer from Benign Thyroid Nodules. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018 Aug;27(8):858-863.
- 88 Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andruss B, Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jul;100(7):2743-50.
- 89 Banizs AB, Silverman JF. The utility of combined mutation analysis and microRNA classification in reclassifying cancer risk of cytologically indeterminate thyroid nodules. *Diagn Cytopathol*. 2019 Apr;47(4):268-274.
- 90 Ito Y, Miyauchi A, Oda H. Low-risk papillary microcarcinoma of the thyroid: A review of active surveillance trials. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Mar;44(3):307-315.
- 91 Ito Y, Miyauchi A, Kudo T, Oda H, Yamamoto M, Sasai H, Masuoka H, Fukushima M, Higashiyama T, Kihara M, Miya A. Trends in the Implementation of Active Surveillance for Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinomas at Kuma Hospital: Gradual Increase and Heterogeneity in the Acceptance of This New Management Option. *Thyroid*. 2018 Apr;28(4):488-495.
- 92 Saravana-Bawan B, Bajwa A, Paterson J, McMullen T. Active surveillance of low-risk papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Surgery*. 2020 Jan;167(1):46-55. doi: 10.1016/j.surg.2019.03.040.
- 93 Patrone R, Velotti N, Masone S, Conzo A, Flagiello L, Cacciatore C, Filardo M, Granata V, Izzo F, Testa D, Avenia S, Sanguinetti A, Polistena A, Conzo G. Management of Low-Risk Thyroid Cancers: Is Active Surveillance a Valid Option? A Systematic Review of the Literature. *J Clin Med*. 2021 Aug 13;10(16):3569.
- 94 Marina M, Zatelli MC, Goldoni M, Del Rio P, Corcione L, Martorana D, Percesepe A, Bonatti F, Mozzoni P, Crociara A, Ceresini G. Combination of ultrasound and molecular testing in malignancy risk estimate of Bethesda category IV thyroid nodules: results from a single-institution prospective study. *J Endocrinol Invest*. 2021 Dec;44(12):2635-2643.