

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Corso di laurea magistrale in Medicina e Chirurgia**

Dipartimento di Medicina – DIMED

*Direttore: Prof. Roberto Vettor*

U.O.C di Endocrinologia

*Responsabile: Prof.ssa Carla Scaroni*

**TESI DI LAUREA**

**Caratterizzazione molecolare del carcinoma  
midollare della tiroide sporadico: associazione con  
il *grading* istologico**

**Relatore:** Ch.ma Prof.ssa Caterina Mian

**Correlatore:** Dott.ssa Simona Censi

**Laureanda**

Sara Corvaglia

Matricola 1171039

Anno accademico: 2022/2023



## SOMMARIO

<b>1</b>	<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
3.1	Diagnosi e valutazione preoperatoria .....	6
3.2	Eziologia.....	9
3.2.1	MTC sporadico .....	10
3.2.2	MEN2A .....	11
3.2.3	MEN2B .....	12
3.3	Clinica .....	13
3.3.1	Clinica MTC sporadico .....	13
3.3.2	Clinica MEN2A .....	14
3.3.3	Clinica MEN2B.....	15
3.4	Anatomia patologica.....	16
3.5	Il nuovo sistema internazionale di <i>grading</i> del MTC (IMTCGS).....	18
3.6	Stadiazione TNM: AJCC, <i>American Joint Committee on Cancer</i> – 8 <sup>a</sup> edizione .....	20
3.7	Intervento chirurgico .....	23
3.8	Monitoraggio post-operatorio e terapia del MTC in fase avanzata.....	25
3.9	Prognosi.....	27
<b>4</b>	<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>30</b>
5.1	Pazienti .....	30
5.2	Analisi molecolare.....	30
5.3	Analisi statistica .....	32
<b>6</b>	<b>RISULTATI</b> .....	<b>33</b>
6.1	Caratterizzazione clinico-patologica e molecolare dei casi di studio.....	33
6.1.1	Caratterizzazione clinico-patologica.....	33
6.1.2	<i>Grading</i> istologico .....	34
6.1.3	<i>Outcome</i> .....	34
6.1.4	Caratterizzazione molecolare.....	34

6.2	Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con <i>RET wild-type</i> e <i>RET</i> mutato .....	37
6.3	Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con <i>RAS wild-type</i> e <i>RAS</i> mutato .....	41
6.4	Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei 4 stati mutazionali analizzati .....	44
6.5	Associazione tra il <i>grading</i> istologico e caratteristiche clinico-patologiche e molecolari .....	48
<b>7.</b>	<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>57</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>58</b>

## 1 RIASSUNTO

**Presupposti dello studio:** Il carcinoma midollare della tiroide (MTC) è una rara neoplasia neuroendocrina che origina dalle cellule C parafollicolari della tiroide. Nel 75% dei casi si presenta in forma sporadica, mentre nel restante 25% in forma ereditaria. L'MTC sporadico presenta principalmente mutazioni a carico dell'oncogene *RET* oppure a carico del gene *RAS*. Nell'ultima classificazione del *World Health Organization* (WHO, 2022) dei tumori tiroidei, è stato introdotto un nuovo sistema di *grading* (IMTCGS, *International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System*) che classifica i tumori in *high-grade* e *low-grade* secondo caratteristiche istologiche quali la conta mitotica, la presenza di necrosi e l'indice proliferativo Ki67.

**Scopo dello studio:** Analizzare l'eventuale associazione tra la presenza di mutazione somatica di *RAS/RET* e le caratteristiche clinico-patologiche e istopatologiche del MTC sporadico. A tal fine si considerano, ad esempio, lo stadio di malattia alla diagnosi, il grado di espressione di marcatori di malattia, quali calcitonina e CEA, l'*outcome* clinico, e la mortalità malattia-correlata. Lo studio ha altresì lo scopo di indagare l'associazione tra il genotipo e il grado di malattia, definito dal sistema IMTCGS, dato ancora assente in Letteratura.

**Materiali e metodi:** Sono stati selezionati retrospettivamente 143 pazienti affetti da MTC sporadico. Per ciascuno di questi sono stati raccolti e analizzati lo stato alla diagnosi, i marcatori di malattia, precedenti e successivi l'intervento, le mutazioni somatiche di *RET* o *RAS*, e l'andamento clinico post-operatorio. Inoltre, i tumori sono stati classificati in *high-grade* e *low-grade* secondo il nuovo sistema IMTCGS. L'analisi statistica dei dati è stata poi condotta tramite l'utilizzo del software R.

**Risultati:** La mutazione di *RET*, e in particolare la mutazione M918T, ha un significato prognostico negativo nei casi di MTC sporadico. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative tra i pazienti con *RET* mutato e quelli con *RET wild-type*, con riferimento allo stadio avanzato di malattia alla diagnosi ( $p=0,006$ ), agli aumentati livelli di calcitonina preoperatori ( $p<0,001$ ), e all'aumentata mortalità malattia-correlata ( $p=0,007$ ). Il gene *RAS* non risulta avere, invece, un significato prognostico. È stata individuata un'associazione tra tumori *high-grade*

e stadio avanzato alla diagnosi ( $p < 0,001$ ) e peggiore *outcome* clinico ( $p = 0,001$ ). Inoltre, si dimostra un'associazione significativa tra il *grading* istologico e lo stato mutazionale: i pazienti *high-grade* presentano con maggior frequenza la mutazione di *RET*, specialmente la mutazione M918T ( $p < 0,001$ ).

**Conclusioni:** Lo studio, condotto in un'estesa coorte di 143 pazienti con MTC sporadico, ha confermato il significato prognostico sfavorevole della mutazione di *RET* e dello stato istologico *high-grade* nell'MTC sporadico. Per la prima volta, è stata osservata un'associazione significativa tra la mutazione di *RET* e *high-grade*. L'individuazione del grado istologico nell'MTC sporadico può quindi contribuire a identificare pazienti ad alto rischio e di conseguenza intraprendere una terapia tempestiva e uno stretto monitoraggio.

## 2 ABSTRACT

**Background:** Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare neuroendocrine neoplasm that originates from the parafollicular C-cells of the thyroid gland. It occurs in a sporadic form and in a hereditary form for 75% and 25% of cases respectively. Sporadic MTC is mainly characterized by *RET* or *RAS* mutations. The World Health Organization's latest classification of thyroid cancers (WHO, 2022) introduced a new grading system (IMTCGS, *International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System*), which classifies tumors into high- and low-grade according to histological features such as mitotic count, presence of necrosis and Ki67 proliferative index.

**Aim of the study:** Analyze the possible association between the presence of somatic *RAS/RET* mutation and the clinicopathological and histopathological features of sporadic MTC. The stage of disease at diagnosis, the degree of expression of disease markers such as calcitonin and CEA, clinical outcome, and disease-related mortality are considered. The study also aims to investigate the association between genotype and tumour grade, based on the IMTCGS system, which has not yet been observed in the literature.

**Materials and methods:** 143 patients affected by sporadic MTC were retrospectively selected. For each of these, status at diagnosis, pre- and postoperative disease markers, somatic *RET* or *RAS* mutations, and post-operative clinical course were collected and analyzed. In addition, the tumours were classified into high-grade and low-grade according to the new IMTCGS system. Statistical analysis of the data was then conducted using R software.

**Results:** *RET* mutation, especially the M918T mutation, has a negative prognostic significance in cases of sporadic MTC. The statistical analysis showed significant differences between patients with mutated *RET* and those with *RET* wild-type with regard to advanced disease stage at diagnosis ( $p=0.006$ ), increased preoperative calcitonin levels ( $p<0.001$ ), and increased disease-related mortality ( $p=0.007$ ). The *RAS* gene, instead, does not have a prognostic significance. An association was found between high-grade tumours, advanced stage at diagnosis ( $p<0.001$ ) and worse clinical outcome ( $p=0.001$ ). Furthermore, a significant association between histological grading and mutational status was demonstrated: high-grade patients

have a higher frequency of *RET* mutation, especially the M918T mutation ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** This research confirmed the unfavorable prognostic significance of *RET* mutation and high-grade histological status in sporadic medullary thyroid carcinoma, by analyzing an extended cohort of 143 patients with sporadic MTC. For the first time, a significant association between *RET* mutation and high-grade patients was observed. Identifying the histological grade in sporadic MTC can therefore help to identify high-risk patients and consequently undertake timely treatment and close monitoring.



### 3 INTRODUZIONE

Il carcinoma midollare della tiroide (MTC) è un tumore neuroendocrino raro che origina dalle cellule C parafollicolari della tiroide. Le cellule C secernono calcitonina (Ct), ormone coinvolto nei meccanismi di mantenimento dell'equilibrio del calcio nell'organismo. Esse costituiscono la minoranza delle cellule tiroidee e si trovano tra le strutture follicolari, appoggiate sulla lamina basale [1].

Nel 1959, per la prima volta, Hazard e i suoi colleghi hanno descritto a livello istologico l'MTC e dato questa denominazione [2]. Rappresenta, secondo gli studi dell'*American Thyroid Association* (ATA), l'1-2% di tutti i tumori tiroidei negli Stati Uniti [3].

Il carcinoma midollare della tiroide può presentarsi in forma sporadica (sMTC) o ereditaria (hMTC), rispettivamente nel 75% e nel 25% dei casi [1]. Nella forma ereditaria si presenta come componente delle sindromi Neoplasie Endocrine Multiple (MEN) di tipo 2A o 2B [3].

Numerosi studi hanno dimostrato che le forme ereditarie presentano mutazioni germinali del proto-oncogene *RET*, e circa il 50% dei MTC sporadici presentano mutazioni somatiche a carico dello stesso gene [10,11].

Le pratiche relative alla diagnosi e alla terapia del carcinoma midollare della tiroide sono diverse rispetto a quelle utilizzate nel carcinoma differenziato della tiroide (DTC). Dal 2015, le linee guida pubblicate dall'*American Thyroid Association* per la diagnosi e il trattamento del MTC, incluse le linee guida del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) e della *European Society for Medical Oncology* (ESMO), sono state aggiornate adattandosi ai recenti progressi nella gestione del MTC [1].

Nel 2022, è stata pubblicata la quinta edizione della classificazione WHO (*World Health Organization*) dei tumori tiroidei, in cui sono state apportate modifiche importanti riguardo la categorizzazione delle neoplasie tiroidee. In particolare, per quanto riguarda l'MTC, la novità più importante è stata l'introduzione di un nuovo sistema di *grading* (IMTCGS) che definisce come *high-grade* i tumori che hanno

almeno una delle seguenti tre caratteristiche: necrosi tumorale, conta mitotica  $\geq 5$  per  $2 \text{ mm}^2$ , e/o un indice proliferativo Ki67  $\geq 5\%$  [12].

L'MTC sporadico viene spesso diagnosticato ad uno stadio avanzato, in quanto si presenta solitamente come un nodulo tiroideo solitario senza sintomi. La diagnosi di MTC sporadico avviene, nella maggior parte dei casi, tramite biopsia, con la tecnica di *fine-needle aspiration* (FNA), e con la colorazione immunohistochimica per la calcitonina [1]. Spesso, però, la diagnosi preoperatoria è meno immediata, motivo per cui la diagnosi avviene spesso in seguito a tiroidectomia, eseguita per risultato sospetto dell'agoaspirato. La resezione chirurgica completa è l'unica possibilità curativa per il carcinoma midollare della tiroide locoregionale [1]. Per questo motivo, una diagnosi precoce è dirimente per una prognosi favorevole [9].

Le opzioni terapeutiche nel caso di MTC ricorrente o metastatico includono la resezione chirurgica, radioterapia o terapie sistemiche. In ogni caso, il trattamento dei pazienti con MTC ricorrente o con metastasi a distanza rimane controverso, in quanto molti pazienti con metastasi hanno un decorso indolore per lungo tempo [1,4].

### **3.1 Diagnosi e valutazione preoperatoria**

Il carcinoma midollare della tiroide è caratterizzato dal rilascio di calcitonina (Ct), CEA (*Carcino-Embryonic Antigen*), e altri prodotti di secrezione. I livelli sierici di calcitonina (Ct) e CEA sono importanti marcatori diagnostici, prognostici e predittivi, data la loro diretta correlazione con il carico della massa tumorale [6]. Numerosi studi hanno dimostrato che la Ct pre-operatoria, oltre ad essere un indicatore dello stadio di malattia alla diagnosi, ha un rilevante significato prognostico di cura e sopravvivenza. Uno *screening* pre-operatorio della calcitonina ha per questo contribuito a migliorare l'*outcome* del MTC sporadico negli ultimi anni [5].

La Ct è un peptide monomero costituito da 32 amminoacidi avente origine dal clivaggio della procalcitonina, la quale deriva dalla preprocalcitonina [40]. Il dosaggio sierico della Ct viene effettuato tramite test immunochemoluminometrici, altamente sensibili e specifici, che eliminano la cross-reattività con altri peptidi come la procalcitonina, che aumenta in condizione di infiammazione sistemica [3,

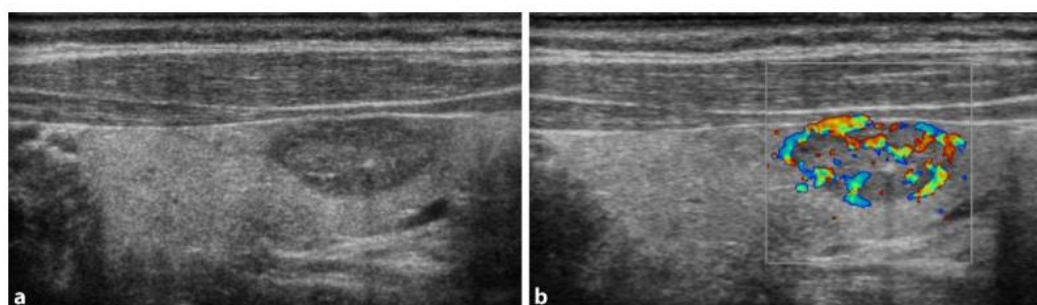
41]. La Ct è il marcatore più sensibile per la diagnosi del carcinoma midollare della tiroide. Il range normale di riferimento della calcitonina è  $\leq 10$  pg/ml, mentre livelli di calcitonina basale di 60-100 pg/ml sono altamente indicativi di MTC [4, 42]. Nello specifico, livelli di Ct inferiore a 20 pg/ml si associano ad un rischio quasi nullo di metastasi linfonodali, valori superiori ai 20 pg/ml si associano a rischio di coinvolgimento linfonodale ipsilaterale del collo, mentre livelli superiori ai 200 pg/ml si associano a rischio di metastasi nel compartimento linfonodale controlaterale. Infine, valori  $> 500$  pg/ml si associano a metastasi a distanza [4, 37]. La Ct sierica potrebbe risultare alterata in altre condizioni, come ad esempio: terapia con inibitori di pompa protonica, insufficienza renale, ipercalcemia, carcinoma papillare della tiroide e tiroidite linfocitica, anche se su queste ultime entità i dati sono meno omogenei in Letteratura. In passato venivano spesso usati test di stimolo con calcio o pentagastrina, in quanto essi determinano un aumento della Ct solo in presenza di MTC, mentre in condizioni patologiche diverse dal MTC non c'è risposta allo stimolo. Oggi, grazie alla disponibilità di tecniche di dosaggio più sensibili della Ct, si cerca, ove possibile di evitare il test di stimolo [42].

Inoltre, i livelli di Ct possono risultare falsamente alterati anche per errori di dosaggio: la presenza di anticorpi eterofili determina una sovrastima, mentre un carico elevato tumorale può sottostimare i livelli di Ct a causa dell'aggregazione di peptidi [3].

Nel carcinoma midollare della tiroide, il CEA non è uno specifico marcatore di diagnosi, ma è utile nel monitorare la progressione di malattia [42]. Il CEA può aumentare in diverse condizioni, patologiche e non, come fumo, malattie infiammatorie intestinali, neoplasie non tiroidee [3]. Questo marcatore, insieme alla Ct viene utilizzato principalmente nel *follow-up* dei pazienti tiroidectomizzati, poiché un aumento progressivo di CEA e Ct, in pazienti con MTC, è indicativo di progressione di malattia. Un aumento isolato di CEA, invece, con livelli stabili di Ct, indica un MTC scarsamente differenziato [43]. Infine, il carcinoma midollare della tiroide può associarsi alla secrezione di altri peptidi, come ACTH, prostaglandine, peptide intestinale vasoattivo (VIP), e serotonina, i quali possono causare sintomi quali *flushing* o diarrea [4].

Nel caso in cui la diagnosi di MTC sia confermata con l'agoaspirato, si effettua un controllo ecografico, al fine di osservare il nodulo e rilevare eventuale massa

metastatica a livello linfonodale [1]. Sebbene non esista un pattern ecografico patognomonico o caratteristico di MTC, la valutazione ecografica del paziente con nodulo tiroideo permette di evidenziare alcune caratteristiche di sospetto: la presenza di un nodulo tiroideo solido, ipoecogeno, intensamente vascolarizzato, con margini ben definiti, o la presenza di spots iperecogeni al suo interno (riferibili a microcalcificazioni o depositi di amiloide), possono infatti suggerire la presenza di un carcinoma midollare (*Figura 1*) [73].



*Figura 1. Ecografia di un nodulo sospetto, ipoecogeno, con spots iperecogeni (a), dotato di vascolarizzazione periferica e centrale (b) [73].*

Se viene rilevato un esteso coinvolgimento linfonodale a livello cervicale, con livelli di Ct superiori ai 500 pg/ml, segno di metastasi a distanza, si indirizza il paziente ad un'indagine più approfondita dello stadio di metastasi [3]. In tal caso si consiglia la tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto del collo e del torace, e la risonanza magnetica (MRI) con mezzo di contrasto del fegato e dello scheletro. Le linee guida NCCN (2022) raccomandano di approfondire le indagini nel caso di Ct sopra i 400 pg/ml o elevati livelli di CEA [7]. Le linee guida ESMO, invece, danno indicazione di  $^{18}\text{F}$ -DOPA (18-F-fluoro-di-idrossi-fenil-alanina)-PET/TC in pazienti con MTC e livelli di Ct  $\geq 500$  pg/ml [4]. Metastasi a distanza non sono, comunque, una controindicazione all'intervento chirurgico [7].

La ricerca genetica delle mutazioni germinali più frequenti del proto-oncogene *RET* viene sempre effettuata in caso di carcinoma midollare della tiroide sia nei casi di MTC apparentemente sporadico, sia per MTC ereditario (ereditarietà autosomica dominante), e viene raccomandata nello screening di bambini e adulti che hanno un parente con MTC ereditario [3,4]. Specifiche mutazioni di *RET* sono strettamente correlate con il fenotipo e con l'aggressività del tumore. Ad esempio, la mutazione

M918T di *RET* è dimostrata essere associata a maggiori caratteristiche aggressive e a metastasi [8]. È importante che, prima dell'intervento chirurgico, venga esclusa la presenza di feocromocitoma o di iperparatiroidismo primario, tramite dosaggio sierico di calcio e metanefrine, in quanto potrebbero scatenare una crisi ipertensiva durante l'intervento [3]. Nel caso si presentasse un feocromocitoma, esso andrebbe trattato tramite un alpha-bloccante e asportato tramite laparoscopia prima dell'intervento alla tiroide [3,4,7].

L'osservazione dei livelli di Ct e CEA è raccomandata anche per il monitoraggio post-operatorio in quanto i marcatori sierici sono indicativi di malattia residua. Purtroppo, non c'è uniformità nelle linee guida, sia riguardo il *cut-off* di Ct che identifica la guarigione, sia per quanto riguarda il tempo necessario a Ct e CEA per raggiungere il loro *nadir* [3]. Secondo le ultime linee guida NCCN (2022), i livelli di Ct e CEA devono essere misurati tra i 2 e 3 mesi dopo aver effettuato la tiroidectomia. I pazienti con Ct dosabile o con livelli elevati di CEA vengono sottoposti ad ecografia del collo e analisi più approfondite, mentre i pazienti con Ct indosabile e livelli di CEA fisiologici, vengono sottoposti a monitoraggio annuale [7].

### 3.2 Eziologia

Come precedentemente citato, l'eziologia del carcinoma midollare della tiroide vede per la maggior parte un coinvolgimento del proto-oncogene *RET*.

Il gene *RET* (*REarranged during Transfection*) è un proto-oncogene costituito da 21 esoni e localizzato sul cromosoma 10 (locus 10q11.2), che codifica per un recettore a singolo passaggio transmembrana della famiglia delle tirosin chinasi [13, 20]. Il recettore è espresso in varie cellule di derivazione neuroectodermica, tra cui le cellule C tiroidee e la midollare surrenalica [21].

La struttura del recettore Ret è composta da una porzione extracellulare che contiene 4 domini caderina-like e un dominio ricco di cisteine, un segmento transmembrana, e infine un segmento intracellulare ad attività tirosin-chinasica ligando-dipendente [14]. Ret è il recettore di un gruppo di fattori di crescita della famiglia dei GDNF (*glial cell line derived neurotrophic factors*), i GFL (*GDNF family ligands*), che comprendono GDNF, neurturina, persepina e artemina [15, 16].

Essi determinano, tramite il co-recettore  $GFR\alpha$  1-4, l'attivazione e quindi la dimerizzazione di Ret, a cui segue l'autofosforilazione dei residui di tirosina e la trasmissione del segnale intracellulare con promozione di proliferazione e crescita cellulare [17]. Inoltre, in assenza di ligando, è stato descritto come Ret eserciti un'attività pro-apoptotica mediata dal taglio da parte della caspasi-3 della porzione intra-citoplasmatica, che rilascia un segmento C-terminale in grado di determinare la morte cellulare programmata [19].

I target intracellulari di Ret sono numerosi e coinvolgono diverse vie di segnalazione intracellulare. Ret fosforilato funge da sito di ancoraggio per diverse proteine (Shc, ShcC, IRS1/2, FRS2, DOK4/5 ed Enigma) che mediano l'attivazione delle vie di segnalazione intracellulare della fosfolipasi C (PLC) /Ras /ERK, della fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3K) /AKT, p38MAPK e JNK. Il risultato finale è la trascrizione di geni implicati nella progressione del ciclo cellulare e nella proliferazione [18].

L'oncogene *RET* non è solamente centrale nello sviluppo del carcinoma midollare della tiroide, ma è responsabile della formazione di altre entità tumorali, come del 20-30% dei casi di carcinoma papillare della tiroide [30].

### 3.2.1 MTC sporadico

Nel carcinoma midollare della tiroide sporadico le mutazioni a carico dell'oncogene *RET* sono approssimativamente il 50%, mentre per circa il 10-30% coinvolgono il gene *RAS*, in particolare *HRAS* e *KRAS*, o raramente *NRAS* [27, 28]. Le mutazioni somatiche di *RAS* e di *RET* sono mutuamente esclusive [74]. La maggioranza delle mutazioni somatiche di *RET* sono state trovate a livello degli esoni 11, 13 e 16, di cui la più frequente è la mutazione M918T (esone 16), a cui segue per frequenza la mutazione a carico del codone 634 [7]. In particolare, la mutazione M918T si associa a maggior rischio di metastasi linfonodali e correla con decorso clinico più aggressivo e prognosi sfavorevole per il paziente, rispetto al quadro associato a mutazioni *RAS* [27, 29]. La maggior parte delle mutazioni *RAS* nel MTC sporadico si trovano sui codoni 12 e 13 nell'esone 2, o sul codone 61 nell'esone 3. A differenza delle mutazioni *RET*, non ci sono associazioni tra le varianti *RAS* e uno status clinico-patologico più aggressivo [27].

Una recente metanalisi ha identificato nuove mutazioni, diverse da *RET* e *RAS*, in una piccola percentuale di MTC sporadici. Questi geni includono *TP53*, *APC*, *TSHR*, *BRAF*, *p.K601N*, *E1F1AX*, *EPHA3*, *KIT* [75].

### 3.2.2 MEN2A

Mutazioni di *RET* associate alla sindrome MEN2A sono per lo più identificate a livello del dominio extracellulare ricco di cisteina, in particolare, esoni 10, 11 e 13 [7]. La più frequente (85% dei casi di MEN2A) è la mutazione a carico del codone 634 dell'esone 11, a seguire i codoni 609, 611, 618 e 620 dell'esone 10 [31]. C'è una forte associazione genotipo-fenotipo. Ad esempio, la presenza di feocromocitoma e iperparatiroidismo compare spesso in soggetti con mutazione del codone 634 [23, 24]. Alla stessa mutazione del codone 634 di *RET*, si associa raramente il lichen amiloidosico cutaneo, una lesione dermatologica a livello della regione interscapolare che si manifesta con prurito intenso. Rari casi della lesione sono stati descritti in Letteratura in associazione con la mutazione V804M (esone 14) [32]. Il morbo di Hirschsprung si manifesta in pazienti MEN2A con mutazioni a carico dell'esone 10: codone 609 (15%), 611 (5%), 618 (30%) e 620 (50%). Il morbo di Hirschsprung si manifesta in circa il 7% dei pazienti con MEN2A [33].

Nella forma familiare FMTC, la più diagnosticata tra le forme ereditarie, le mutazioni si localizzano principalmente sul dominio di cisteina sui codoni 609, 611, 618 (esone 10) e 634 (esone 11) ma anche in domini diversi da quello di cisteina, come il codone 804 (esone 14), codone 891 (esone 15), e altri (vedi *Figura 2*) [20, 34].

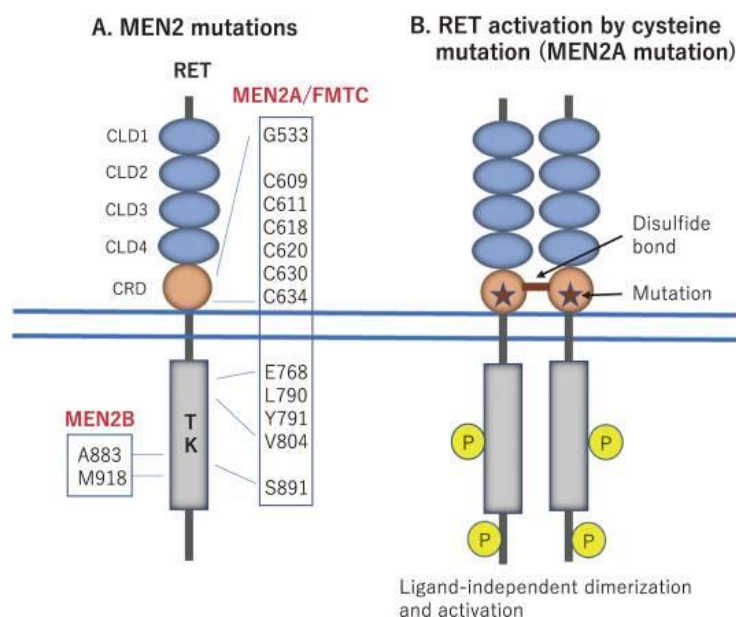


Figura 2. A) Mutazioni germinali di *RET* in *MEN2*. B) Meccanismo di attivazione di *RET* da mutazioni del dominio di cisteine [36].

### 3.2.3 MEN2B

I pazienti *MEN2B* presentano nel 95% la mutazione *RET* M918T dell'esone 16 nella porzione intracellulare, caratterizzata da un comportamento aggressivo e insorgenza già durante l'infanzia [7, 20]. Altre rare mutazioni del dominio intracellulare sono state riportate a carico dell'esone 15, come la mutazione A883F, che sembra avere però un comportamento meno aggressivo [25]. Inoltre, in quasi il 95% dei casi *MEN2B*, la mutazione germinale di *RET* è riconducibile ad una mutazione *de novo*, come dimostra il risultato negativo dell'analisi genetica di *RET* nei genitori di questi pazienti [22].

Circa il 50% dei pazienti con *MEN2B* sviluppano feocromocitoma, oltre a manifestazioni extra-endocrine come ganglioneuromatosi intestinale, *habitus* marfanoide e alterazioni muscolo-scheletriche e oftalmologiche, come l'alacrimia [35].

Nei rari casi in cui gli MTC ereditari sono "orfani" di mutazioni, ossia che non sono state trovate mutazioni germinali negli 8 esoni più frequentemente colpiti (5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16), nonostante la storia familiare sia particolarmente suggestiva di una forma ereditaria, allora in questi casi bisognerebbe cercare di identificare una possibile associazione con rare e sconosciute mutazioni germinali di *RET* [20, 26].



Molti studi hanno dimostrato che il 7-10% delle forme apparentemente sporadiche sono invece casi non diagnosticati di forme ereditarie. In ogni caso, le linee guida ritengono che, se un paziente, sospetto per MTC sporadico, risulta negativo alle mutazioni germinali più frequenti, può essere considerato come sporadico, con una minima probabilità di errore [20].

Un ulteriore ruolo nell'eziologia del carcinoma midollare della tiroide lo rivestono le modificazioni epigenetiche, come la metilazione a carico di DNA e RNA, la modificazione degli istoni e gli RNA non codificanti. Modifiche epigenetiche determinano un'alterazione dell'espressione genetica e possono contribuire alla carcinogenesi [56]. Due geni che codificano per due istone-metiltransferasi (EZH2 e SMYD3) sono stati ritrovati sovra-espressi in MTC più aggressivi [76]. Inoltre, nel carcinoma midollare della tiroide è stata individuata un'alterazione dell'espressione di miRNA (RNA non codificanti), tra cui i più comuni sono miR-21, miR-183 e miR-375. In particolare, la sovraespressione di quest'ultimi ha dimostrato avere un significato prognostico sfavorevole, essendo i loro elevati livelli di espressione legati alla presenza di metastasi ai linfonodi laterocervicali, malattia residua, metastasi a distanza e mortalità [77,78].

### **3.3 Clinica**

#### **3.3.1 Clinica MTC sporadico**

L'MTC sporadico solitamente compare tra la quarta e la sesta decade di vita. Il 70% dei pazienti con un nodulo tiroideo palpabile presenta contemporaneamente metastasi ai linfonodi cervicali: in ordine, vengono interessati i linfonodi del compartimento centrale (VI e VII livello), seguiti dall'interessamento dei linfonodi laterali (II-V livello), sia ipsilaterali che controlaterali [44]. Il coinvolgimento di linfonodi dei comparti centrali è presente nel 14% dei pazienti con T1 e nel 86% dei pazienti con tumori T4, mentre le metastasi ai linfonodi laterali sono presenti nell'11% dei pazienti T1 e nel 93% dei pazienti T4 [3].

Il 10% dei casi presenta invece metastasi a distanza, che interessa il mediastino, il fegato, i polmoni e le ossa, con un *pattern* miliare, difficile da visualizzare con TC o altre tecniche di imaging. Il tumore allo stadio avanzato può presentare sindrome

diarroica e *flushing*. Come precedentemente accennato, livelli di calcitonina basale al momento della diagnosi sono indicativi della diffusione della patologia [3, 44].

### 3.3.2 Clinica MEN2A

La sindrome MEN2A è la forma ereditaria più frequente (95% delle MEN2) e può presentarsi in 4 quadri clinici: la forma classica MEN2A, che si presenta con MTC e feocromocitoma e/o iperparatiroidismo; la forma MEN2A con lichen amiloidosico cutaneo; MEN2A con malattia di Hirschsprung; e infine la forma familiare (FMTC), che presenta MTC con mutazioni germinali di *RET* ma senza feocromocitoma né iperparatiroidismo [3].

È stata dimostrata un'associazione genotipo-fenotipo nelle mutazioni di *RET* germinali nel contesto della MEN2A: ad esempio, le mutazioni sul codone 634 sono associate ad elevata penetranza di feocromocitoma, che aumenta con l'età [45]. I feocromocitomi sono solitamente benigni e spesso bilaterali, confinati nella ghiandola surrenalica.

L'iperparatiroidismo si presenta solitamente senza sintomi o con sintomi lievi nei pazienti con MEN2A, e può coinvolgere da una a tutte le ghiandole paratiroidi. Anche l'iperparatiroidismo dimostra essere più spesso associato alle mutazioni sul codone 634 [46].

Il lichen amiloidosico cutaneo può presentarsi nella MEN2A ed è caratterizzato da lesioni dermatologiche, particolarmente presenti a livello della regione scapolare, e causanti intenso prurito che aumenta con l'esposizione al sole e durante i periodi di stress. Si manifesta solitamente in giovane età, motivo per cui potrebbe costituire un segno precursore della sindrome [47]. Il lichen amiloidosico cutaneo si manifesta quasi esclusivamente in pazienti con la mutazione sul codone 634 o 804 di *RET* [48]. Anche in questo quadro si manifestano feocromocitoma e iperparatiroidismo, con la stessa frequenza con cui si presentano nella forma classica MEN2A [47].

La malattia di Hirschsprung si manifesta, invece, in alcuni pazienti con MEN2A che presentano mutazioni puntiformi sui codoni dell'esone 10 (in particolare il codone 620) [49]. Il 2-5% dei pazienti con la malattia di Hirschsprung presenta MEN2A. Dunque, il paziente con malattia e mutazioni sull'esone 10 di *RET* deve

essere valutato per approfondire eventuale MEN2A. La malattia di Hirschsprung si manifesta quasi sempre poco dopo la nascita [50].

### 3.3.3 Clinica MEN2B

La sindrome MEN2B insorge frequentemente durante l'infanzia ed è molto aggressiva. Come detto precedentemente, la maggioranza dei casi MEN2B presenta mutazioni *de novo* di RET, mentre una minoranza ha familiarità per la sindrome. Il 95% dei pazienti con MEN2B presenta la mutazione M918T dell'esone 16, associata ad un quadro particolarmente aggressivo, mentre il 5% possiede la mutazione A883F dell'esone 15, correlata con un MTC meno aggressivo [25, 51]. Il quadro clinico di MEN2B può manifestarsi con feocromocitoma (50%), un aspetto di *habitus* marfanoide con faccia tipica, malformazioni oftalmologiche (es. alacrimia), neuromi mucosi multipli specialmente alle labbra e alla lingua, e malformazioni scheletriche come il petto scavato. Il quadro MEN2B presenta anche ganglioneuromatosi intestinali [54]. I pazienti lamentano sintomi addominali come diarrea, costipazione e meteorismo. Occorre diagnosticare precocemente MEN2B affinché la tiroidectomia sia curativa, anche se la maggior parte dei casi vengono identificati in fase avanzata [52, 53].

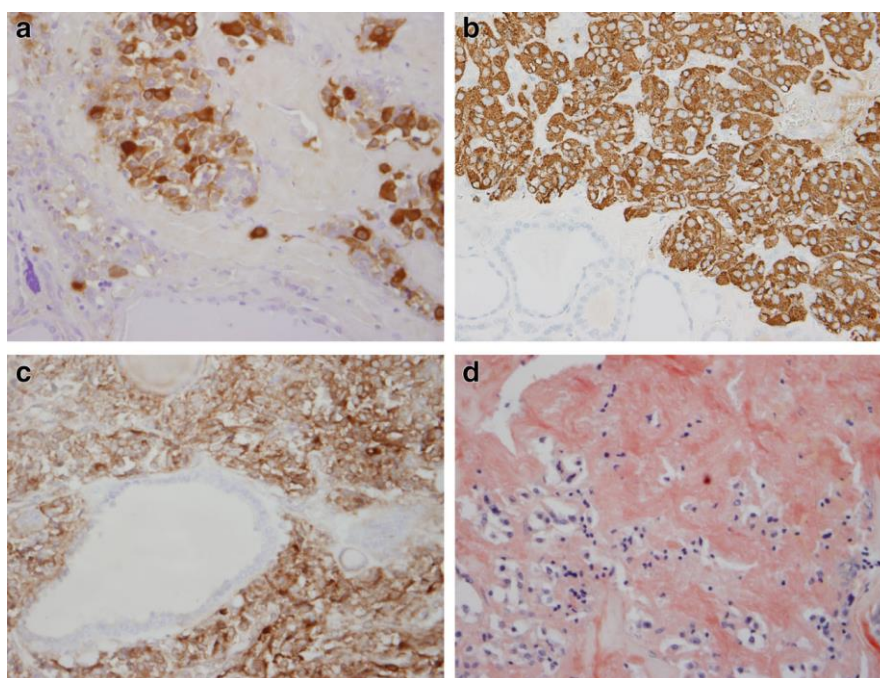
I differenti fenotipi delle forme MEN2A, MEN2B e FMTC sono riassunti nella *Tabella I*.

*Tabella I. Differenti fenotipi nelle tre forme MEN2A, MEN2B, FMTC (FEO: feocromocitoma, PHPT: iperparatiroidismo, CLA: lichen amiloidosico cutaneo) [20].*

	MTC	FEO	PHPT	CLA	neurinomi	megacolon	<i>Habitus marfanoide</i>
<b>MEN2A</b>	98%	50%	25-30%	10-15%	0	0	0
<b>MEN2B</b>	98%	45%	0	0	100%	60%	100%
<b>FMTC</b>	100%	0	0	0	0	0	0

### 3.4 Anatomia patologica

L'MTC si presenta, a livello macroscopico, con noduli di consistenza aumentata e di colore bianco-rossastro. È composto, a livello istologico, da cellule pallide con aspetto allungato, rotondeggiante o poligonale, nucleo eccentrico e abbondante citoplasma. Esse hanno una crescita poco coesiva e sono separate da stroma fibroso [55]. Tramite indagine immunohistochimica si indaga l'espressione tumorale di citochine (principalmente CK7 e CK18), TTF1, cromogranina A, Calcitonina e CEA (*Figura 3*) [3]. Questi ultimi due sono i marcatori tumorali più importanti.



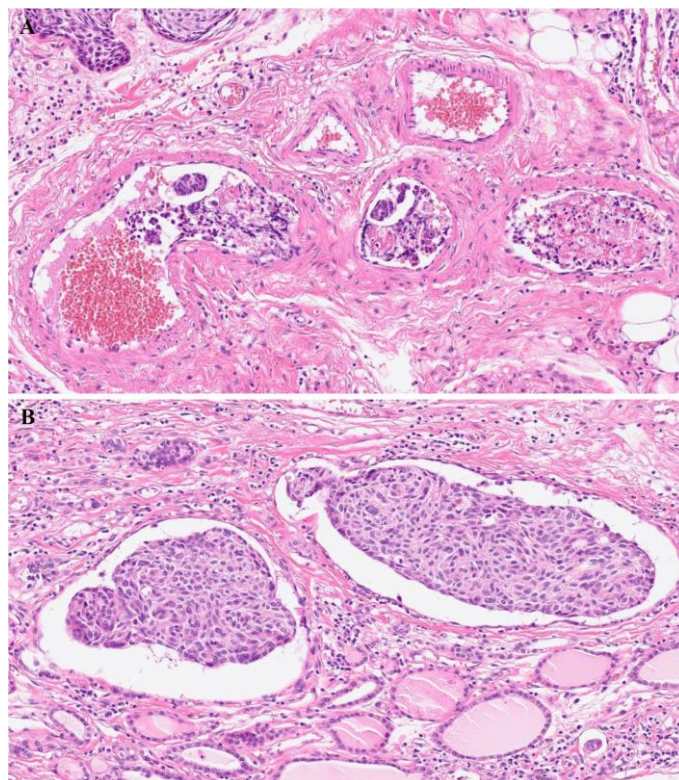
*Figura 3. Il carcinoma midollare della tiroide dimostra reattività immunohistochimica per la calcitonina (a), cromogranina A (b), e antigene carcinoembrionario (c) con adiacenti follicoli non reagenti. La colorazione Rosso Congo evidenzia i depositi di amiloide (d) [57].*

La biopsia con ago aspirato (*fine-needle aspiration*) è uno strumento utile e sicuro per la diagnosi della patologia tiroidea. La citologia del carcinoma midollare della tiroide appare in modo variabile, in quanto le cellule del MTC sono spesso poco coese e di forma variabile, per cui può essere confusa con altre lesioni. I criteri citologici principali per l'MTC sono: un pattern di cellule poco coese di forma poligonale o triangolare, granuli citoplasmatici azzurrofilici, nucleo eccentrico con cromatina granulare e amiloide, identificazione immunohistochimica della Ct,

cromogramina o CEA, e l'assenza di colorazione della tireoglobulina. L'agoaspirato permette di diagnosticare l'MTC nel 89% dei casi, e indirizza alla chirurgia nel 99% dei casi [3].

L'indagine della Ct con l'immunoistochimica varia di intensità ed estensione, per questo in sua assenza non deve essere esclusa la diagnosi di MTC.

Spesso l'MTC è preceduto da un'iperplasia delle cellule C parafollicolari, osservabile a livello istologico, nonostante i criteri per definirla non siano stati chiaramente stabiliti. Un fattore predittivo di aggressività/ricorrenza è l'angioinvasione e l'invasione linfatica nel parenchima tiroideo circostante (*Figura 4*). L'angioinvasione è caratterizzata da cellule tumorali intravascolari associate a fibrina e formazione trombotica [56].



*Figura 4. Carcinoma midollare della tiroide con angioinvasione (A) e invasione linfatica (B) nel parenchima tiroideo circostante [56].*

### 3.5 Il nuovo sistema internazionale di *grading* del MTC (IMTCGS)

Nel 2022, la quinta edizione della classificazione WHO dei tumori tiroidei, ha introdotto un nuovo sistema di *grading* per il carcinoma midollare della tiroide con implicazioni prognostiche, che trae origine da due sistemi di *grading* proposti precedentemente.

Nel 2020, due gruppi di ricercatori hanno infatti sviluppato indipendentemente due sistemi di *grading* del MTC, basandosi sull'attività proliferativa (conta mitotica e indice proliferativo Ki67) e necrosi tumorale [58].

Uno degli studi è stato svolto da un gruppo del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) di New York, scritto da Alzumaili *et al.*, il quale propone un *grading* a due livelli che identifica i tumori *high-grade* in quelli aventi necrosi e/o  $\geq 5$  mitosi per dieci campi ad alta potenza (HPF, *high-power fields*), 400 x (equivalente a 2 mm<sup>2</sup> nella maggioranza dei microscopi) [59].

Un secondo studio redatto da Fuchs *et al.* si basa su un sistema a tre livelli (*Sydney grading scheme*), ossia divide i tumori MTC in *low-grade*, *intermediate-grade*, e *high-grade*, in base alla conta mitotica, al tasso proliferativo del Ki67 e alla necrosi tumorale, usando differenti *cut-offs* [60].

Entrambi i due sistemi di *grading* sono stati dimostrati essere degli indicatori indipendenti di prognosi.

Nel 2021 uno studio (Xu *et al.*) considera 327 pazienti con MTC provenienti da 5 grandi centri tra Stati Uniti, Europa e Australia. L'articolo risponde all'esigenza di avere un unico sistema di *grading*, valido a livello internazionale. Hanno introdotto, così, l'“*International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System*” (IMTCGS). Secondo il sistema IMTCGS, i tumori *high-grade* presentano almeno una delle tre seguenti caratteristiche: necrosi tumorale, conta mitotica  $\geq 5$  per 2 mm<sup>2</sup>, e/o un indice proliferativo Ki67  $\geq 5\%$  (Figura 5) [62]. Gli indici di proliferazione, in quanto variabili, dovrebbero essere valutati nell'area tumorale con attività proliferativa più alta.

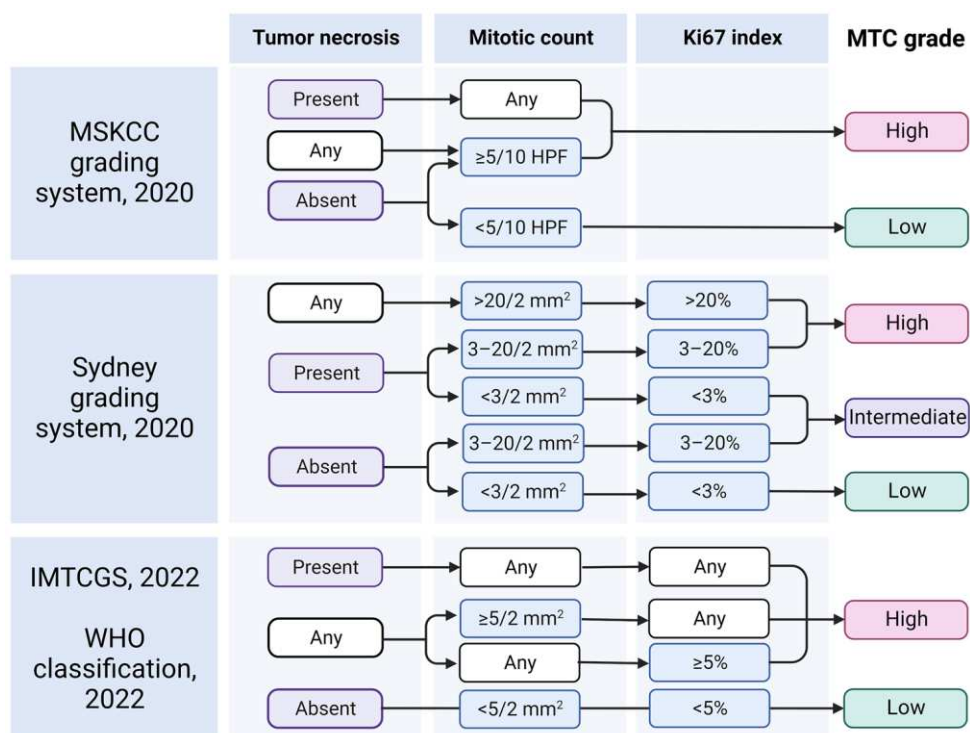


Figura 5. Confronto tra i diversi schemi di grading del MTC [56].

Utilizzando questo schema di *grading*, il 25% dei pazienti dello studio di Xu *et al.* risulta avere un tumore di alto grado (Figura 6) [62].

Questo sistema di *grading* è stato dimostrato essere un indicatore predittivo di *outcome* sfavorevole indipendente da altri fattori predittivi quali età, sesso, grandezza del tumore, stato del margine, livelli sierologici di Ct e CEA, presenza di metastasi e sopravvivenza generale. Inoltre, questo *grading* sembra essere indipendente dallo stato mutazionale, in quanto gli studi non dimostrano finora correlazione tra gli indici istologici e il grado mutazionale di *RET* o *RAS* [61]. Nonostante ciò, studi più ampi sono necessari per indagare una possibile correlazione.

Dato il suo forte valore predittivo indipendente, tale nuovo *grading* istologico può indurre a seguire i pazienti con tumori di alto grado con un monitoraggio più stretto per l'individuazione tempistica di eventuale malattia metastatica. Può essere inoltre utilizzato come indice per considerare la terapia adiuvante nei pazienti con tumore *high-grade*, considerando che questi ultimi sono quelli che trarrebbero più beneficio da essa [62].

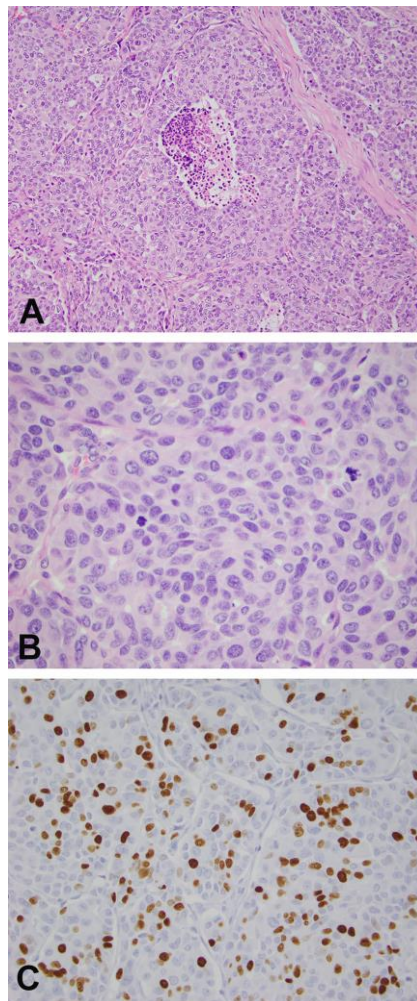


Figura 6. Esempio di MTC di alto grado. È presente necrosi tumorale (A), la conta mitotica è di 16 per circa 2 mm<sup>2</sup> (B), l'indice proliferativo Ki67 è di 35% (C) [58].

### 3.6 Stadiazione TNM: AJCC, *American Joint Committee on Cancer* – 8a edizione

L'ottava edizione del sistema di stadiazione dell'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), pubblicata nel 2016, prevede una stadiazione che, a differenza dei carcinomi tiroidei derivanti dalle cellule follicolari, non include l'età alla diagnosi come un fattore predittivo indipendente di sopravvivenza. L'MTC viene raggruppato in stadi secondo le variabili T (tumore primitivo), N (linfonodi regionali) e M (metastasi a distanza) [56].



Tabella II. Stadiazione TNM per carcinoma midollare della tiroide, AJCC (2016).

**T- tumore primitivo**

<b>Tx</b>	Tumore non valutabile	
<b>T0</b>	Nessuna evidenza di tumore	
<b>T1</b>	<b>T1a</b>	Tumore di $\leq 1$ cm
	<b>T1b</b>	Tumore di $>1$ cm e $\leq 2$ cm
<b>T2</b>	Tumore $> 2$ cm e $\leq 4$ cm, limitato alla tiroide	
<b>T3</b>	<b>T3a</b>	Tumore $\geq 4$ cm, limitato alla tiroide
	<b>T3b</b>	Tumore di qualsiasi dimensione con estensione extratiroidea, evidente macroscopicamente, a carico solo dei muscoli sottoioidei (sternoioideo, sternotiroideo, tiroioideo o omoioideo)
<b>T4</b>	<b>T4a</b>	Tumore di ogni dimensione con estensione extratiroidea macroscopica nei tessuti circostanti del collo, includendo i tessuti molli sottocutanei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente
	<b>T4b</b>	Tumore di ogni dimensione che invade la fascia prevertebrale, la arteria carotide o i vasi mediastinici

**N- Linfonodi (LN) regionali**

<b>Nx</b>	Linfonodi regionali non valutabili	
<b>N0</b>	<b>N0a</b>	Uno o più LN benigni confermati citologicamente o istologicamente
	<b>N0b</b>	Non evidenza clinica e radiologica di metastasi ai LN locoregionali
<b>N1</b>	<b>N1a</b>	Metastasi ai LN del VI o VII livello, omolaterali o bilaterali
	<b>N1b</b>	Metastasi ai LN del collo omolaterale, bilaterale o controlaterale (Livelli I, II, III, IV o V) o LN retrofaringei

**M- Metastasi a distanza**

<b>M0</b>	Assenza di metastasi a distanza
<b>M1</b>	Presenza di metastasi a distanza

**Stadio**

<b>Stadio I</b>	T1a, T1b	N0	M0
<b>Stadio II</b>	T2, T3	N0	M0
<b>Stadio III</b>	T1, T2, T3	N1a	M0
<b>Stadio IVa</b>	T1, T2, T3, T4a	N1b, qualsiasi N	M0
<b>Stadio IVb</b>	T4b	Qualsiasi N	M0
<b>Stadio IVc</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

### 3.7 Intervento chirurgico

L'unica terapia efficace per il carcinoma midollare della tiroide è quella chirurgica, dal momento che è resistente sia alla chemioterapia citotossica, sia alla terapia con radioiodio (Iodio-131) in quanto le cellule C, a differenza delle cellule follicolari, non concentrano lo iodio.

Prima dell'intervento è fortemente raccomandato uno *screening* nei portatori di mutazione germinale di *RET* per escludere la presenza di feocromocitoma e iperparatiroidismo. Inoltre, è consigliato eseguire un'ecografia del collo per identificare metastasi regionali; qualora ci sia sospetto, è indicato svolgere una TC con mezzo di contrasto del collo e del torace. Se i livelli di Ct pre-operatori superano i 500 pg/ml, allora è indicato ricercare metastasi tramite TC del torace, MRI del fegato e dello scheletro e FDOPA-PET [4].

L'invasività dell'intervento chirurgico dipende dal singolo caso e può essere suddiviso in tiroidectomia, tiroidectomia con asportazione linfonodale cervicale centrale e tiroidectomia con asportazione linfonodale centrale e laterale, unilaterale o bilaterale [5]. L'ATA raccomanda sempre l'asportazione del compartimento linfonodale centrale (livello VI) assieme alla tiroidectomia totale. [3].

Secondo le linee guida ESMO (2019), l'approccio dipende dai livelli di Ct pre-operatori, dall'ecografia del collo e dall'esame istologico linfonodale intraoperatorio.

In particolare, se l'ecografia del collo è positiva, è indicata l'asportazione del compartimento linfonodale centrale bilaterale e dei linfonodi ipsilaterali coinvolti (almeno livelli IIA-III-IV), mentre con livelli di Ct >200 pg/ml è indicata anche linfadenectomia laterale controlaterale. Se l'ecografia del collo è invece negativa, l'asportazione profilattica dei linfonodi laterali non ha evidenza di beneficio. Inoltre, se i livelli di Ct pre-operatori sono <20 pg/ml, nemmeno l'asportazione linfonodale centrale pre-operatoria sarebbe necessaria [4, 63].

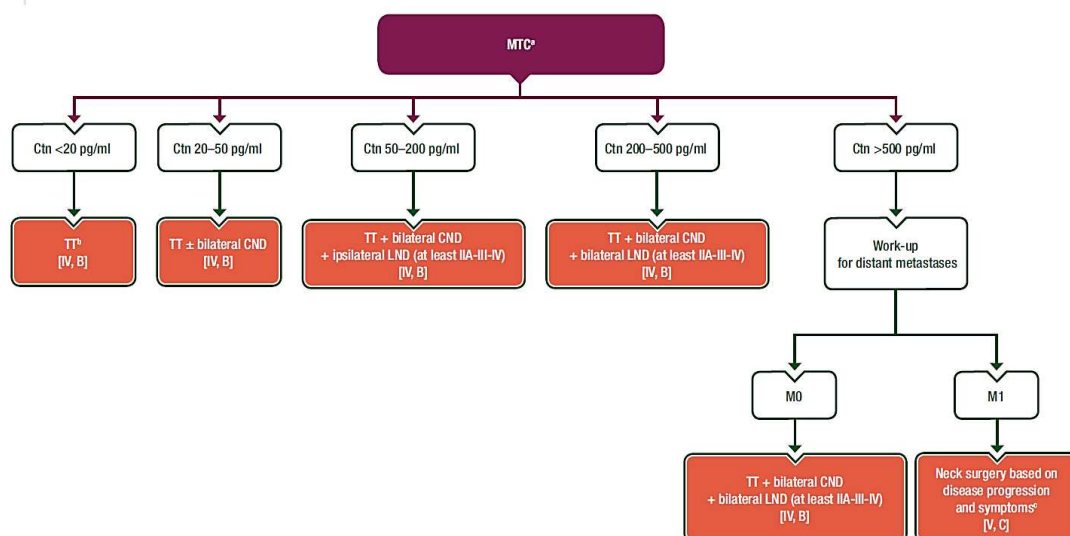


Figura 7. Raccomandazioni per il monitoraggio chirurgico dei pazienti con MTC secondo le linee guida ESMO (2019) [4].

Secondo le ultime linee guida NCCN (2022), è indicata la tiroidectomia totale (TT) con considerazione di possibile asportazione linfonodale centrale nel caso in cui la malattia tiroidea è unilaterale e il tumore è <1 cm. È raccomandata, invece, la tiroidectomia totale e asportazione centrale bilaterale (livello VI) nei pazienti con MTC il cui tumore è  $\geq 1$  cm o per coloro che hanno coinvolgimento tiroideo bilaterale. L'asportazione laterale (livelli II-V) è considerato nei pazienti con MEN2A con tumore maggiore di 1 cm e metastasi dei linfonodi centrali [7].

Per quanto riguarda i pazienti con mutazioni germinali, l'età a cui si raccomanda la tiroidectomia totale (TT) profilattica è basata sulla tipologia di mutazione. Coloro che presentano la mutazione germinale M918T, dovrebbero sottoporsi all'intervento di TT entro il primo anno di vita. Gli individui con mutazioni C634 o A883F, considerate anch'esse ad alto rischio, possono essere sottoposti a chirurgia fino ai 5 anni, a meno che non ci siano aumenti di Ct. Per gli altri portatori di mutazioni si dovrebbe effettuare il monitoraggio della Ct ed ecografia del collo dai 5 anni di età, mentre la chirurgia viene indicata quando i livelli di Ct aumentano, oppure nel caso in cui i genitori la richiedano [3].

### 3.8 Monitoraggio post-operatorio e terapia del MTC in fase avanzata

Il monitoraggio post-operatorio, sia a breve che a lungo termine, avviene tramite controllo ecografico e misurazione dei livelli sierici di Ct e CEA, i quali segnalano un eventuale residuo di malattia. Le linee guida ATA raccomandano la misurazione della Ct 3 mesi dopo l'intervento [3]. Se la Ct è indosabile, o all'interno del range di normalità, il paziente viene rivalutato ogni 6 mesi per il primo anno, e successivamente una volta l'anno con esami ematici e con ecografia. Qualora invece la Ct persista in concentrazioni elevate durante il controllo post-operatorio, è indicata rivalutazione del paziente tramite nuovi esami di *imaging*.

Se l'MTC viene diagnosticato dopo lobectomia, la tiroidectomia totale non è indicata se il paziente non è portatore di una mutazione *RET* germinale [1]. La TT è però indicata nei MTC sporadici se l'ecografia è sospetta e la Ct sierica è misurabile dopo l'intervento [1, 3].

Nei portatori di mutazione germinale di *RET*, la presa in carico del paziente comprende, non solo il *follow-up* per l'MTC, ma anche la ricerca iniziale e la successiva sorveglianza di feocromocitoma e iperparatiroidismo.

Un importante indicatore di prognosi è il tempo di duplicazione della Ct. Uno studio ha preso in considerazione 117 pazienti e ha dimostrato che la maggioranza dei MTC *high-grade* (secondo il nuovo *grading* IMTCGS) presenta un tempo di duplicazione della Ct inferiore ai 2 anni [38]. Per un corretto calcolo del tempo di duplicazione, si raccomanda di misurare la Ct almeno quattro volte consecutive in 2 anni e di svolgere le analisi sempre nello stesso laboratorio [4].

Per l'analisi e l'identificazione di eventuali metastasi locoregionali e/o a distanza è necessario impiegare varie tecniche di *imaging*. La TC con mezzo di contrasto *whole-body* permette di stimare la diffusione della malattia e identificare la posizione delle lesioni. La MRI con mezzo di contrasto è maggiormente sensibile nell'identificare lesioni a livello del fegato, confondibili con lesioni cistiche benigne con TAC o ecografia, oppure a livello dell'encefalo e dello scheletro [4]. Dato che il carcinoma midollare della tiroide ha bassa avidità per 18-F-fluorodesossiglucosio ( $^{18}\text{F}$ -FDG), è sconsigliato il suo utilizzo durante la PET/TAC, ed è preferito il radiofarmaco 18-F-fluoro-di-idrossi-fenil-alanina ( $^{18}\text{F}$ -DOPA), che ha miglior sensibilità e specificità per il MTC [72]. La PET/TC, con

l'analogo della somatostatina marcato Gallio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), non è sensibile e precisa per lo *staging* ma individua l'espressione dei recettori della somatostatina, motivo per cui è utile quando si valuta la possibilità di terapia con radionuclide. Quando si sospetta un'infiltrazione a livello delle vie aeree o del tratto digestivo superiore, è raccomandato svolgere un'esplorazione endoscopica.

Le opzioni terapeutiche per MTC ricorrente o metastatico includono la chirurgia, la terapia locale o terapia sistemica. L'MTC in fase avanzata è associato alla secrezione di vari peptidi (es. prostaglandine, serotonina, istaminasi), i quali possono causare sintomi non tollerati come *flushing* e diarrea. In questi casi, l'obiettivo principale del trattamento è la gestione di tali sintomi [4]. Non ci sono, però, precise indicazioni per i pazienti con malattia avanzata, poiché alcuni di essi presentano sintomi mentre altri un decorso indolente per molti anni. La sorveglianza attiva potrebbe essere la soluzione migliore per tali pazienti, dato che continue operazioni li esporrebbero a rischi e possibili complicazioni chirurgiche, come la lesione del nervo laringeo ricorrente di destra o l'ipoparatiroidismo permanente [3].

Nei casi di metastasi estese al collo e torace, con rischio di ostruzione delle vie aeree, le linee guida ATA consigliano di introdurre una radioterapia esterna adiuvante post-operatoria [3].

Nel caso in cui il carcinoma midollare della tiroide diventasse non resecabile, sintomatico, e con metastasi a distanza, si prende in considerazione la terapia sistemica [65].

La terapia sistemica con inibitori tirosin-chinasici non selettivi, come vandetanib e cabozantinib, è il trattamento sistemico di prima linea e aumenta la sopravvivenza senza progressione di malattia (*progression free survival*, PFS) ma non migliora la sopravvivenza globale [1,4].

Vandetanib inibisce l'attività di vari recettori tirosin-chinasici, come il recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR), Ret, e il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (*epidermal growth factor receptor*, EGFR).

Cabozantinib è un inibitore tirosin-chinasico che agisce su Ret, VEGFR e il fattore di crescita degli epatociti (MET), tre vie biochimiche significative nell'eziologia del MTC [66]. I due farmaci si associano ad una stabilizzazione della malattia e

parziale regressione nel 30% dei casi. Essi possono dare effetti collaterali, per la maggior parte gestibili, come diarrea, *rash*, nausea, ipertensione o allungamento dell'intervallo QT [4, 56].

Le ultime linee guida NCCN (2022) introducono l'utilizzo degli inibitori selettivi di Ret, selpercatinib e pralsetinib, che sono meno tossici e più efficaci [7]. Essi sono un'opzione terapeutica nei pazienti con mutazioni di *RET*. Selpercatinib è un inibitore altamente selettivo per il recettore Ret, e agisce efficacemente sia su mutazioni puntiformi che su fusioni, inclusa la mutazione V804M, resistente agli altri inibitori tirosin-chinasici non selettivi [67]. Recentemente, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato l'uso di selpercatinib nei pazienti con MTC e mutazione di *RET*, in stadio avanzato o metastatico [68]. Alcuni *trial* clinici stanno attualmente comparando gli effetti di selpercatinib e pralsetinib con gli effetti di vandetanib e cabozantinib, nei pazienti con mutazioni di *RET*.

Inoltre, sono state proposte varie alternative terapeutiche, con risultati parziali, come l'immunoterapia, vaccini, anticorpi anti-CEA monoclonali radiomarcati, e la terapia radiorecettoriale (*peptide receptor radionuclide therapy*, PRRT) con analoghi della somatostatina marcati ( $^{177}\text{Lu}$ - o  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE/TOC) [69,70, 71].

In definitiva, l'opzione migliore per la gestione del carcinoma midollare della tiroide rimane un approccio individualizzato, che consideri i singoli *status* mutazionali.

### **3.9 Prognosi**

La prognosi del carcinoma midollare della tiroide è intermedia rispetto a quella delle neoplasie tiroidee differenziate e del tumore anaplastico, con una sopravvivenza a 10 anni tra il 61% e l'88% dei casi [5, 39]. Secondo un'analisi multivariata, l'età e lo stato alla diagnosi sono fattori prognostici indipendenti e significativi, motivo per cui è auspicabile che la diagnosi venga effettuata il più precocemente possibile [39].

Il nuovo sistema di *grading* IMTCGS costituisce, inoltre, un fattore prognostico significativo. Esso suddivide il tumore in *high-grade* e *low-grade*, in base alle caratteristiche istologiche quali necrosi, Ki67% e conta mitotica.

Alti livelli persistenti di Ct, breve tempo di raddoppiamento di Ct e CEA (inferiore a 6-12 mesi), e incremento rapido di CEA associato a livelli di Ct stabili, segno di tumore scarsamente differenziato, sono importanti indicatori clinici di prognosi infausta [4, 7].

L'analisi delle mutazioni del proto-oncogene *RET* permette, inoltre, di prevedere l'aggressività del tumore, specialmente nel caso in cui sia presente una mutazione del gene stesso a carico dell'esone 16.

È stato dimostrato, infine, che un tempo di raddoppiamento del volume tumorale inferiore a 1 anno nei pazienti con MTC e metastasi polmonari, correla con prognosi particolarmente infausta [64].



#### 4 SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio ha come obiettivo quello di analizzare una coorte estesa di 143 pazienti con carcinoma midollare della tiroide sporadico e di individuare, tramite l'osservazione di parametri clinico-patologici, molecolari e istologici, possibili correlazioni tra di essi.

Sulla base delle mutazioni *RET* e *RAS*, si ricerca innanzitutto la presenza di differenze significative riguardanti lo stadio alla diagnosi, il grado di espressione di marcatori di malattia, quali Ct e CEA, l'*outcome* clinico e la mortalità malattia-correlata dei pazienti.

Lo studio pone poi particolare attenzione alla nuova classificazione istologica, ossia l'ultimo sistema di *grading* IMTCGS. Anche in questo caso, si confrontano i casi *low-grade* e *high-grade* ricercando differenze significative nei parametri clinico-patologici.

La ricerca ha poi come scopo finale quello di individuare un'associazione tra il genotipo e il grado del tumore, sulla base del sistema IMTCGS, dato ancora assente in Letteratura.

## 5 MATERIALI E METODI

### 5.1 Pazienti

Sono stati selezionati retrospettivamente 143 pazienti con diagnosi di MTC sporadico. I pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia totale, tra il 2000 e il 2022, presso l'U.O.C di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Ai pazienti è stato chiesto di firmare il consenso informato che li ha messi a conoscenza dell'utilizzo dei campioni per scopi di ricerca. Sono stati esclusi i pazienti che presentavano mutazione germinale dell'oncogene *RET* e quindi MTC familiare. Per ciascun paziente sono state ricostruite la storia clinica e l'andamento di malattia, tramite l'utilizzo di vari parametri: l'età alla diagnosi, i marcatori tumorali (Ct e CEA) prima e dopo l'intervento, le dimensioni e lo stadio TNM del tumore secondo l'ottava edizione del sistema di stadiazione dell'AJCC. A livello istologico, è stata individuata la percentuale di casi *high-grade*, tramite i criteri del nuovo sistema di *grading* (IMTCGS). Inoltre, è stata svolta l'analisi molecolare sugli oncogeni *RAS* e *RET*, con particolare attenzione alla mutazione M918T. Durante il *follow-up* è stato analizzato l'andamento della Ct fino all'ultimo dosaggio plasmatico disponibile.

### 5.2 Analisi molecolare

L'estrazione del DNA dal tessuto patologico tumorale viene eseguita tramite il protocollo del kit QIAmp DNA tissue mini Kit (Qiagen). La procedura di estrazione e purificazione prevede quattro fasi: lisi del campione biologico, assorbimento e legame del DNA alla membrana di silicio presente nella colonna QIAamp, lavaggio e rimozione dei residui contaminati, eluizione del DNA.

La concentrazione di DNA estratto viene misurata attraverso uno spettrofotometro, il quale è in grado di determinare la concentrazione di acidi nucleici valutando la densità ottica alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Il campione da analizzare tramite lo spettrofotometro viene ottenuto miscelando 20 microlitri di DNA con 980 microlitri di acqua milliQ. La soluzione ottenuta è diluita 50 volte rispetto a quella madre.

In seguito, questa soluzione viene analizzata a tre lunghezze d'onda: 260, 280 e 320 nm. La concentrazione di DNA nel campione può essere individuata considerando

l'assorbanza a 260 nm. La lunghezza d'onda a 280 nm rappresenta il picco di assorbimento delle proteine, la principale causa di contaminazione del campione. L'assorbimento a 320 nm significa, invece, che c'è una contaminazione del DNA da parte di solventi organici.

Il grado di purezza del campione può essere determinato dal rapporto tra le assorbanze a 260 e 280 nm. Viene considerato accettabile un risultato compreso tra 1,8 e 2,0. In caso di risultati inferiori si consiglia di ripetere l'estrazione.

È inoltre necessario considerare la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), che è una tecnica che permette l'amplificazione selettiva in vitro di una determinata sequenza di cDNA, precedentemente ottenuta con reazione di retrotrascrizione. L'amplificazione necessita di due inneschi (*primers*) oligonucleotidici che riconoscono le estremità della sequenza da amplificare.

La soluzione che contiene DNA, buffer, enzimi e primer viene inserita nel termociclatore, dove subiscono cicli di riscaldamento e raffreddamento ripetuti. Ciò consente l'amplificazione del DNA attraverso l'azione della DNA polimerasi. In teoria, con questa tecnica la quantità delle sequenze bersaglio nel campione raddoppia ad ogni ciclo.

Con la PCR sono stati amplificati l'esone 11, 13, 16 del gene *RET* e i geni *KRAS*, *NRAS* e *HRAS*.

Il materiale ottenuto dalla PCR viene sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% (P/V) in TAE (50X).

La purificazione dei prodotti della PCR serve per eliminare possibili residui di primer, sali, proteine e viene eseguita tramite le colonnine Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore).

Per la PCR di sequenza del prodotto purificato viene utilizzato il protocollo Big-Dye Terminator. Alla fine del processo, viene fatta una nuova purificazione da sali, dNTP e molecole a basso peso molecolare mediante colonnine AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare).

Il sequenziatore automatico ABI PRISM (Applied Biosystem) processa infine, tramite metodo di Sanger, i risultati della nuova purificazione per determinare le specifiche sequenze di interesse.

### 5.3 Analisi statistica

L'elaborazione statistica è stata svolta tramite il *software* R.

Le variabili qualitative sono state presentate come frequenze e percentuali, mentre le variabili quantitative sono state rappresentate tramite la mediana e il *range* interquartile (IQR). Tramite test di Mann-Whitney e test del  $\chi^2$  vengono confrontate rispettivamente le variabili quantitative e qualitative.

Il *follow-up* è stato calcolato dalla data dell'intervento chirurgico. Le probabilità di sopravvivenza sono state stimate utilizzando il metodo Kaplan-Meier e le risultanti curve di sopravvivenza sono state confrontate e valutate tramite log-rank test.

Tutti i test sono bilaterali ed è stato considerato statisticamente significativo un p-value <0,05.

## **6 RISULTATI**

### **6.1 Caratterizzazione clinico-patologica e molecolare dei casi di studio**

#### **6.1.1 Caratterizzazione clinico-patologica**

I pazienti, di cui 89 di sesso femminile (62,24%) e 54 di sesso maschile (37,76%), presentavano età mediana alla diagnosi di circa 61 anni. IQR: 52,72-70,01 anni.

Il diametro mediano del tumore primitivo nei pazienti analizzati era di 1,5 cm, IQR: 1,1-2,5 cm. Il minimo valore rilevato era di 0,2 cm, mentre il massimo era di 7 cm.

Analizzando la stadiazione T del tumore primitivo, è emerso che 74 pazienti (52,85%) presentavano stadio T1, 26 (18,57%) stadio T2, 36 (25,71%) stadio T3, e 4 (2,86%) stadio T4. Nel complesso risultava che 100 pazienti (71,43%) rientravano nello stadio T1 o T2, mentre 40 (28,57%) nello stadio T3 o T4.

Per quanto riguarda la stadiazione linfonodale N, sono stati individuati 87 pazienti (61,26%) in N0, 52 pazienti (36,61%) in N1, mentre i restanti 3 pazienti (2,11%) presentavano linfonodi non valutabili (Nx).

Lo stadio metastatico M contava 126 pazienti (90%) senza metastasi (M0), mentre 14 (10%) con metastasi (M1).

Lo stadio complessivo di malattia dei pazienti, secondo i criteri della VIII edizione della classificazione TNM, si distribuiva come segue: 61 pazienti (44,20%) allo stadio I, 25 (18,12%) allo stadio II, 15 (10,87%) allo stadio III, mentre 37 pazienti (26,81%) allo stadio IV.

La Ct pre-operatoria nei pazienti selezionati presentava una mediana di 458,00 pg/ml, IQR: 88,00-1367,00 pg/ml. Il valore minimo di calcitonina rilevato era di 1,2 pg/ml, mentre il massimo era di 42300 pg/ml.

Il CEA pre-operatorio aveva un valore mediano di 11,10 ng/ml, IQR: 2,60-50,90 pg/ml. Il valore minimo di CEA pre-operatorio era di 0,10 ng/ml, mentre quello massimo era di 1625,00 ng/ml.

### 6.1.2 *Grading istologico*

Secondo i criteri del nuovo sistema di *grading* istologico, sono stati classificati 32 pazienti (22,70%) come *high-grade* e 109 pazienti (77,30%) come *low-grade*.

### 6.1.3 *Outcome*

Il *follow-up* mediano era di 80 mesi (7 anni circa), IQR: 41,5-122,5 mesi.

Durante lo studio è stata effettuata un'analisi dell'andamento di malattia utilizzando differenti categorizzazioni.

Una prima suddivisione classificava l'*outcome* dei pazienti in base ai livelli di Ct rilevati durante il *follow-up*. Sulla base del range di laboratorio, con valore di riferimento  $Ct \leq 10$  pg/ml, 84 pazienti (59,57%) sono in remissione con  $Ct \leq 10$  pg/ml, mentre 57 pazienti (40,43%) non sono in stato di remissione, ossia con  $Ct > 10$  pg/ml. La Ct risultava indosabile ( $Ct < 1$  pg/ml) in 62 pazienti (43,97%), mentre in 79 pazienti (56,03%) risultava dosabile.

Un'ulteriore suddivisione categorizzava l'*outcome* dei pazienti sulla base dei fattori biochimici (Ct) e clinici (guarigione/decesso). Si rilevavano 61 pazienti (43,26%) con calcitonina indosabile ( $Ct < 1$  pg/ml), 63 non guariti (44,68%), e 17 deceduti (12,06%) a causa della malattia. Considerando invece il range di laboratorio per la calcitonina ( $Ct \leq 10$  pg/ml), si classificavano invece 84 pazienti (59,57%) con calcitonina  $\leq 10$  pg/ml, 40 pazienti (28,37%) non guariti e 17 decessi correlati alla malattia (12,05%).

Nel complesso si contavano 17 decessi malattia-correlati (11,89%).

### 6.1.4 *Caratterizzazione molecolare*

In 54 pazienti (39,41%) sono state individuate mutazioni somatiche a carico di *RET*, mentre il gene *RET* è risultato *wild type* (WT) in 83 pazienti (60,58%).

In particolare, la specifica mutazione M918T sul gene *RET* è stata trovata in 30 (21,90%) pazienti, mentre nei restanti 107 casi (78,10%) è risultata negativa.

La mutazione a carico del gene *RAS* è stata trovata, invece, in 12 pazienti (8,76%). I restanti 125 pazienti (91,24%) presentavano il gene *RAS wild type*.

Categorizzando i pazienti in base alla mutazione genetica identificata, risultavano: 70 pazienti (51,47%) *wild type* in cui non sono state individuate mutazioni genetiche, 12 pazienti (8,82%) con mutazioni *RAS*, 24 pazienti (17,65%) con mutazione di *RET*, escluse le specifiche mutazioni M918T, e 30 pazienti (22,06%) con la specifica mutazione M918T sul gene *RET*.

Le caratteristiche clinico-patologiche dei casi di studio sono riassunte nella *Tabella III*.

*Tabella III: caratteristiche clinico-patologiche e molecolari dei casi di studio.*

<b>Variabile</b>	<b>Casi (n=143)</b>
<b>Caratteristiche cliniche</b>	
<b>Sesso, F:M (%)</b>	89 (62,24): 54 (37,76)
<b>Età alla diagnosi, anni</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	61,26 52,72-70,01
<b>Dimensione, cm</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	1,5 1,1-2,5
<b>T (%)</b>	
1	74 (52,85)
2	26 (18,57)
3	36 (25,71)
4	4 (2,86)
<b>N (%)</b>	
X	3 (2,11)
0	87 (61,26)
1	52 (36,61)
<b>M (%)</b>	
0	126 (90,00)
1	14 (10,00)
<b>Stadio (%)</b>	
I	61 (44,20)
II	25 (18,12)
III	15 (10,87)
IV	37 (26,81)
<b>Calcitonina pre-op., pg/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	458 88,0-1367,0
<b>CEA pre-op., ng/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	11,10 2,6-50,9

<b>Grading istologico</b>	
<b>High-grade (%)</b>	
<i>Low-grade</i>	109 (77,30)
<i>High-grade</i>	32 (22,70)
<b>Outcome</b>	
<b>Follow-up, mesi</b>	
<i>Mediana</i>	80
<i>IQR</i>	41,50-122,50
<b>Outcome 1 (%)</b>	
<i>Ct ≤10</i>	84 (59,57)
<i>Ct &gt;10</i>	57 (40,43)
<b>Outcome 2 (%)</b>	
<i>Ct indosabile (Ct &lt;1)</i>	62 (43,97)
<i>Ct dosabile</i>	79 (56,03)
<b>Outcome 1 bis (%)</b>	
<i>Guariti (Ct ≤10)</i>	84 (59,57)
<i>Non guariti</i>	40 (28,37)
<i>Deceduti malattia-correlati</i>	17 (12,05)
<b>Outcome 2 bis (%)</b>	
<i>Guariti (Ct indosabile)</i>	61 (43,26)
<i>Non guariti</i>	63 (44,68)
<i>Deceduti malattia-correlati</i>	17 (12,06)
<b>Decessi malattia-correlati (%)</b>	
<i>Sì</i>	17 (11,89)
<i>No</i>	126 (88,11)
<b>Status mutazionale</b>	
<b>RET mutazione somatica (%)</b>	
<i>RET presenza mutazione somatica</i>	54 (39,41)
<i>RET wild type</i>	83 (60,58)
<b>RET M918T (%)</b>	
<i>Presente</i>	30 (21,90)
<i>Assente</i>	107 (78,10)
<b>RAS mutazione (%)</b>	
<i>Presente</i>	12 (8,76)
<i>Assente</i>	125 (91,24)
<b>Suddivisione secondo 4 mutazioni (%)</b>	
<i>WT</i>	70 (51,47)
<i>RAS+</i>	12 (8,82)
<i>RET no M918T</i>	24 (17,65)
<i>RET M918T</i>	30 (22,06)



## 6.2 Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con *RET wild-type* e *RET* mutato

La mutazione somatica di *RET* era presente in 54 pazienti (39,42%) mentre il gene *RET* era *wild-type* in 83 pazienti (60,58%).

Dal confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche dei soggetti con mutazione di *RET* e *RET wild-type* sono emerse differenze significative.

Innanzitutto, le dimensioni del tumore erano notevolmente maggiori nei pazienti con *RET* mutato in cui il diametro mediano è di 1,90 cm e IQR di 1,30-2,80 cm, rispetto ai tumori *RET wild-type* con diametro mediano di 1,45 cm e IQR di 1,00-2,20 cm ( $p=0,020$ ).

I pazienti con mutazione di *RET* presentavano inoltre uno stadio significativamente più avanzato alla diagnosi: gli stadi I-II e III-IV si presentavano rispettivamente nel 70,00% e 30,00% dei pazienti *RET wild-type* versus il 45,09% e 54,90% dei pazienti con *RET* mutato ( $p=0,020$ ).

Anche i marcatori tumorali, Ct e CEA erano maggiormente espressi nei pazienti *RET* mutati: in questi la Ct presentava una mediana di 764,00 pg/ml con IQR di 437,25-2064,50 pg/ml, mentre nei pazienti con *RET wild-type* la Ct aveva una mediana di 231,00 pg/ml con IQR di 72,00-824,00 pg/ml ( $p<0,001$ ).

Per quanto riguarda il *grading* istologico, la percentuale di tumore *high-grade* era significativamente maggiore nei pazienti *RET* mutati (44%) rispetto ai pazienti *RET wild-type* (12,3%) ( $p<0,001$ ).

Anche per quanto riguardava l'*outcome*, emergevano significative differenze. L'*outcome* suddiviso per pazienti con Ct  $\leq 10$  pg/ml, o non guariti (Ct  $> 10$  pg/ml), oppure deceduti malattia-correlati, era rappresentativo e dimostrava che i pazienti *RET* mutati presentavano percentuali significativamente maggiori di non guarigione (30,80%) o di decessi malattia-correlati (23,10%), rispetto ai pazienti *RET wild-type* che avevano una percentuale del 27,50% di non guarigione e del 6,20% di decessi malattia correlati ( $p=0,011$ ).

Le caratteristiche dei pazienti con mutazione di *RET* rispetto a quelli *RET wild-type* sono riassunte nella *Tabella IV*.

Tabella IV. Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con *RET* wild-type e *RET* mutato.

Variabile	<i>RET</i> wild-type	<i>RET</i> +	p-value
<b>Caratteristiche cliniche</b>			
<b>n (%)</b>	83 (60,58)	54 (39,42)	
<b>Sesso (%)</b>			0,010
<i>F</i>	60 (72,29)	27 (50,00)	
<i>M</i>	23 (27,71)	27 (50,00)	
<b>Età alla diagnosi</b>			0,009
<i>Mediana</i>	64,41	59,87	
<i>IQR</i>	55,65- 72,81	50,39-64,84	
<b>Dimensione T, cm</b>			0,020
<i>Mediana</i>	1,45	1,90	
<i>IQR</i>	1,00- 2,20	1,30-2,80	
<b>T (%)</b>			0,460
1	44 (54,32)	24 (45,28)	
2	15 (18,52)	11 (20,74)	
3	21 (25,92)	15 (28,31)	
4	1 (1,23)	3 (5,66)	
<b>T dic (%)</b>			0,702
1-2	59 (72,84)	35 (66,04)	
3-4	22 (27,16)	18 (33,96)	
<b>N (%)</b>			0,001
<i>X</i>	0 (0,00)	1 (1,90)	
0	57 (71,20)	22 (42,30)	
1	23 (28,70)	29 (55,80)	
<b>M (%)</b>			0,008
0	76 (95,00)	40 (80,00)	
1	4 (5,00)	10 (20,00)	
<b>Stadio (%)</b>			0,006
I	40 (50,00)	14 (27,50)	
II	16 (20,00)	9 (17,60)	
III	10 (12,50)	5 (9,80)	
IV	14 (17,50)	23 (45,10)	
<b>Stadio dic (%)</b>			0,020
I-II	56 (70,00)	23 (45,09)	
III-IV	24 (30,00)	28 (54,90)	
<b>Calcitonina pre-op., pg/ml</b>			<0,001
<i>Mediana</i>	231,00	764,00	
<i>IQR</i>	72,00-824,00	437,25-2064,50	
<b>CEA pre-op., ng/ml</b>			0,002
<i>Mediana</i>	5,10	50,90	
<i>IQR</i>	1,70-29,92	29,00-69,80	

<b>Grading istologico</b>			
<b>High-grade (%)</b>			<0,001
<i>Low-grade</i>	71 (87,70)	28 (56,00)	
<i>High-grade</i>	10 (12,30)	22 (44,00)	
<b>Outcome</b>			
<b>Follow-up, mesi</b>			0,004
<i>Mediana</i>	98,50	63,50	
<i>IQR</i>	61,25- 142,50	34,00- 103,50	
<b>Outcome 1 (%)</b>			0,045
<i>Ct ≤10</i>	53 (66,20)	24 (47,10)	
<i>Ct &gt;10</i>	27 (33,80)	27 (52,90)	
<b>Outcome 2 (%)</b>			0,206
<i>Ct indosabile (Ct&lt;1)</i>	38 (47,50)	18 (35,30)	
<i>Ct dosabile</i>	42 (52,50)	33 (64,70)	
<b>Outcome 1 bis (%)</b>			0,011
<i>Guariti (Ct ≤10)</i>	53 (66,20)	24 (46,20)	
<i>Non guariti</i>	22 (27,50)	16 (30,80)	
<i>Deceduti malattia-corr.</i>	5 (6,20)	12 (23,10)	
<b>Outcome 2 bis (%)</b>			0,018
<i>Guariti (Ct indosabile)</i>	38 (47,50)	18 (34,60)	
<i>Non guariti</i>	37 (46,20)	22 (42,30)	
<i>Deceduti malattia-corr.</i>	5 (6,20)	12 (23,10)	
<b>Decessi malattia-correlati (%)</b>			0,007
<i>Sì</i>	5 (6,90)	12 (25,50)	
<i>No</i>	67 (93,10)	35 (74,50)	

Tramite l'analisi di Kaplan-Meier abbiamo confrontato le curve di sopravvivenza tra i pazienti con mutazione di *RET* e i pazienti *RET wild-type*, considerando come *outcome* il decesso malattia-correlato. Il log-rank test ha confermato una sopravvivenza malattia correlata maggiore nei pazienti *RET-WT* rispetto ai *RET*-mutati (p al log-rank test = 0,0009) (*Grafico 1*).

Inoltre, all'analisi della sopravvivenza libera da malattia ( $Ct \leq 10$  pg/ml), sempre mediante la curva di Kaplan-Meier, i pazienti *RET-WT* hanno mostrato una sopravvivenza libera da malattia maggiore rispetto ai pazienti *RET*-mutati (p al log-rank test = 0,001) (*Grafico 2*).

Grafico 1. Confronto fra la sopravvivenza nei pazienti con mutazione di RET e pazienti con RET wild-type (WT) ( $p=0,0009$ ).

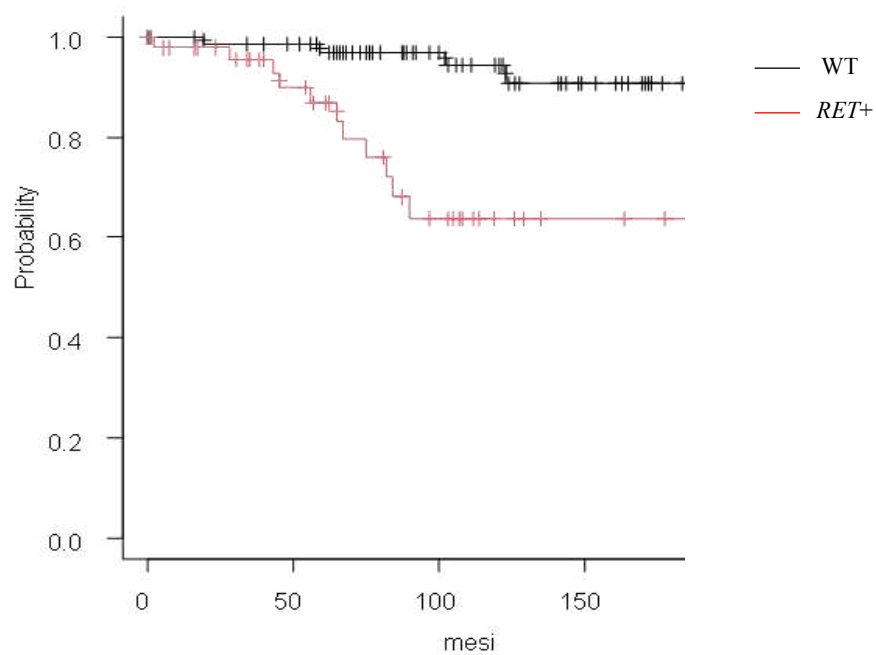
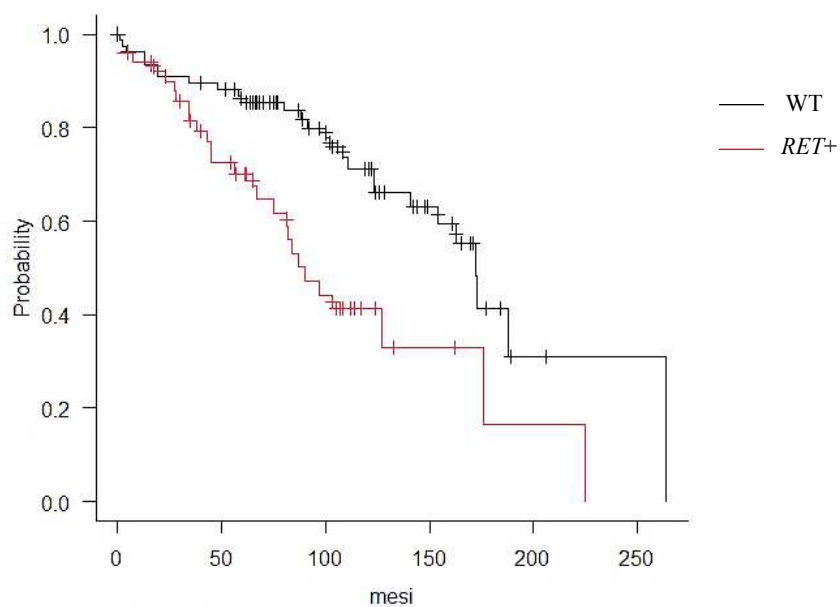


Grafico 2. Confronto fra la sopravvivenza libera da malattia ( $Ct \leq 10$  pg/ml) nei pazienti con mutazione di RET e pazienti con RET wild-type (WT) ( $p=0,001$ ).



### 6.3 Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con *RAS wild-type* e *RAS* mutato

Dall'analisi e confronto tra i parametri clinico-patologici dei pazienti con *RAS wild-type* e *RAS* mutato non emergevano, invece, differenze significative. Al contrario dello stato mutazionale *RET*, infatti, la mutazione *RAS* non si associava con un *outcome* peggiore o con caratteristiche cliniche discordanti rispetto all'assenza della mutazione *RAS*.

I pazienti con mutazione *RAS* presentavano uno stadio alla diagnosi paragonabile, se non migliore, rispetto ai pazienti senza mutazione *RAS*: un basso stadio di malattia (I-II), rispetto ad un più alto stadio (III-IV) si presentava rispettivamente nel 59,60% e 40,40% dei pazienti *RAS wild-type*, *versus* il 72,70% e 27,30% dei pazienti con mutazione di *RAS*.

La differenza rispetto al *grading* istologico tra i pazienti con mutazione *RAS* e quelli *RAS wild-type* risultava essere non significativa, sebbene ai limiti della significatività statistica ( $p=0,068$ ). È infatti interessante notare come i primi fossero per il 100% dei casi *low-grade*, mentre i secondi per il 73,90% *low-grade* e per il 26,10% *high-grade*.

Come precedentemente detto, anche l'*outcome* non era significativamente diverso nei pazienti con mutazione *RAS* rispetto ai pazienti *RAS wild-type*.

Le caratteristiche dei pazienti con mutazione di *RAS* rispetto a quelli *RAS wild-type* sono riassunte nella *Tabella V*.

*Tabella V. Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei pazienti con *RAS wild-type* e *RAS* mutato.*

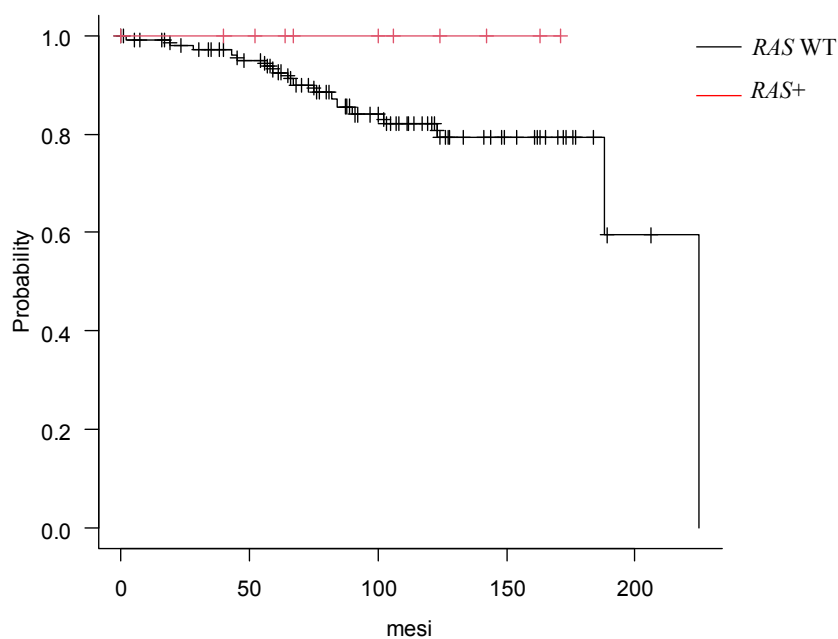
Variabile	<i>RAS</i> wt	<i>RAS</i> +	p-value
<b>Caratteristiche cliniche</b>			
<b>n (%)</b>	125 (91,24)	12 (8,76)	
<b>Sesso (%)</b>			0,209
<i>F</i>	88 (70,40)	10 (83,30)	
<i>M</i>	37 (29,60)	2 (16,70)	

<b>Età alla diagnosi</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	61,28 52,66-70,06	57,83 53,89-66,62	0,652
<b>Dimensione T, cm</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	1,50 1,10-2,50	1,80 1,08-2,33	0,920
<b>T (%)</b> <i>1</i> <i>2</i> <i>3</i> <i>4</i>	59 (50,00) 21 (17,80) 34 (28,80) 4 (3,40)	7 (58,30) 4 (33,30) 1 (8,30) 0 (0,00)	0,313
<b>T dic (%)</b> <i>1-2</i> <i>3-4</i>	80 (66,70) 40 (33,30)	11 (91,70) 1 (8,30)	0,103
<b>N (%)</b> <i>X</i> <i>0</i> <i>1</i>	3 (2,50) 70 (58,30) 47 (39,20)	0 (0,00) 9 (75,00) 3 (25,00)	0,525
<b>M (%)</b> <i>0</i> <i>1</i>	106 (89,83) 12 (10,16)	11 (91,70) 1 (8,30)	1,000
<b>Stadio (%)</b> <i>I</i> <i>II</i> <i>III</i> <i>IV</i>	48 (41,00) 22 (18,80) 12 (10,30) 35 (29,90)	6 (50,00) 3 (25,00) 2 (16,70) 1 (8,30)	0,334
<b>Stadio dic (%)</b> <i>I-II</i> <i>III-IV</i>	62 (59,60) 42 (40,40)	8 (72,70) 3 (27,30)	0,524
<b>Calcitonina pre-op., pg/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	476,00 125,00-1490,00	537,00 134,50-850,00	0,864
<b>CEA pre-op., ng/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	18,80 2,00-53,00	7,00 5,85-15,50	0,778
<b>Grading istologico</b>			
<b>High-grade (%)</b> <i>Low-grade</i> <i>High-grade</i>	88 (73,90) 31 (26,10)	12 (100,00) 0 (0,00)	0,068
<b>Outcome</b>			
<b>Follow-up, mesi</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	84,00 46,50-123,00	83,50 49,00-128,50	0,917
<b>Outcome 1 (%)</b> <i>Ct ≤10</i> <i>Ct &gt;10</i>	71 (57,26) 53 (42,74)	9 (75,00) 3 (25,00)	0,358

<b>Outcome 2 (%)</b> <i>Ct indosabile (Ct &lt;1)</i> <i>Ct dosabile</i>	54 (43,55) 70 (56,45)	6 (50,00) 6 (50,00)	0,765
<b>Outcome 1 bis (%)</b> <i>Guariti (Ct ≤10)</i> <i>Non guariti</i> <i>Deceduti malattia-corr.</i>	71 (57,26) 36 (29,03) 17 (13,70)	9 (75,00) 3 (25,00) 0 (0,00)	0,461
<b>Outcome 2 bis (%)</b> <i>Guariti (Ct indosabile)</i> <i>Non guariti</i> <i>Deceduti malattia-corr.</i>	54 (43,55) 53 (42,74) 17 (13,71)	6 (50,00) 6 (50,00) 0 (0,00)	0,527
<b>Decessi malattia-correlati (%)</b> <i>Sì</i> <i>No</i>	17 (16,00) 89 (84,00)	0 (0,00) 11 (100,00)	0,363

L'analisi della curva di Kaplan-Meier non mostrava differenze significative nella sopravvivenza malattia-correlata tra i pazienti con mutazione *RAS* e i pazienti *RAS wild-type*, ( $p$  al log-rank test di 0,212) (Grafico 3).

Grafico 3. Confronto fra la sopravvivenza nei pazienti con mutazione *RAS* e pazienti con *RAS wild-type (WT)* ( $p=0,212$ ).



#### 6.4 Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei 4 *status* mutazionali analizzati

Confrontando i 4 stati mutazionali (*wild-type*, *RAS* mutato, *RET* mutato esclusa la mutazione M918T, *RET* M918T) sono emerse varie differenze significative tra i parametri analizzati.

Innanzitutto, lo stadio alla diagnosi risultava peggiore nei pazienti con mutazione *RET* M918T. In questi ultimi, lo stadio IV alla diagnosi compariva infatti nel 56,70% dei casi, mentre si trovava solo nel 30,40% dei pazienti con mutazione *RET* esclusa M918T, nel 17,90% dei pazienti WT, e nell'8,30% dei pazienti con mutazione *RAS* ( $p=0,021$ ).

Anche i livelli pre-operatori di Ct e CEA risultavano più alti nei pazienti con mutazione di *RET*. La Ct mediana nei pazienti con mutazione *RET* (esclusa la mutazione M918T) era di 1136,00 pg/ml con IQR di 639,00-2129,00 pg/ml, nei pazienti con mutazione *RET* M918T era di 541,00 pg/ml (IQR: 403,00-2840,00), mentre nei pazienti WT e con mutazione *RAS* la Ct mediana era rispettivamente di 187,00 pg/ml (IQR di 58,85-800,00 pg/ml) e di 537,00 pg/ml (IQR di 134,50-850,00 pg/ml) ( $p=0,001$ ).

Particolarmente significativa era la differenza nel *grading* istologico tra i vari stati mutazionali. La percentuale di *high-grade* era elevata soprattutto nei pazienti con mutazione *RET* M918T, in cui raggiungeva il 53,60% dei casi, mentre era il 14,30% dei pazienti WT, il 0,00% dei pazienti *RAS* mutati e il 29,20% dei pazienti con mutazione *RET* esclusa la mutazione M918T ( $p=0,001$ ).

Nei pazienti con mutazione *RET* M918T, l'*outcome* era peggiore rispetto agli altri stati mutazionali. Nei pazienti con mutazione *RET* M918T la percentuale dei non guariti (Ct >10 pg/ml) era del 63,30%, mentre nei casi WT era del 34,29%, del 25,00% in quelli con *RAS* mutato, e del 41,66% dei pazienti con *RET* mutato esclusa M918T ( $p=0,033$ ).

È da evidenziare, inoltre, che la percentuale di decessi malattia-correlati risultava essere più alta nei pazienti con mutazione di *RET*, sia se si considera la mutazione M918T (33,30%), sia considerando la mutazione di *RET* esclusa la mutazione M918T (15,00%). Nei pazienti WT e nei pazienti con *RAS* mutato, la percentuale di decessi malattia-correlati era rispettivamente solo del 8,20% e del 0% ( $p=0,009$ ).



Le caratteristiche dei pazienti con i 4 stati mutazionali sono riassunte nella *Tabella VI*.

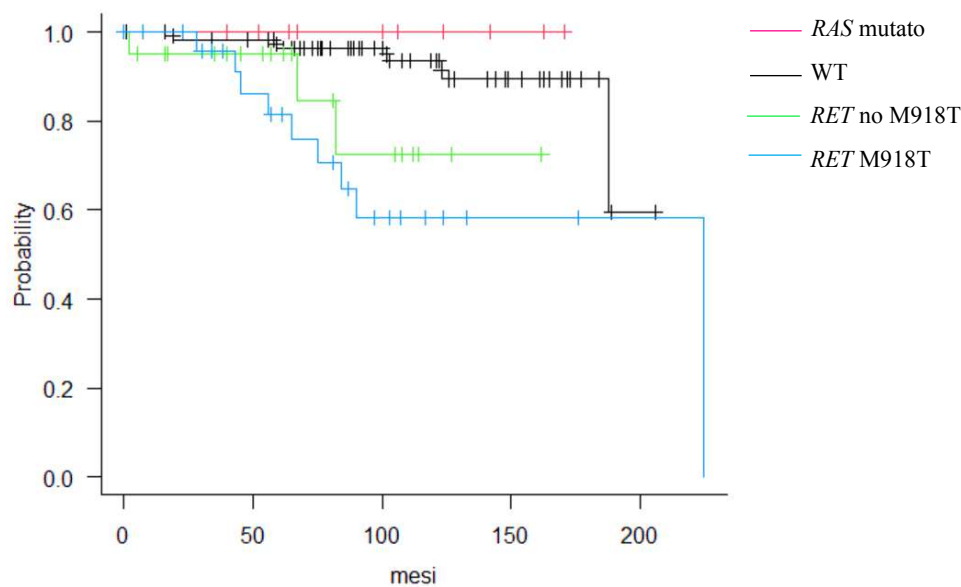
*Tabella VI. Confronto tra le caratteristiche clinico-patologiche e istologiche dei 4 stati mutazionali: wild-type, RAS mutato, RET mutato esclusa la mutazione M918T, RET M918T.*

Variabile	WT	RAS+	RET+ no M918T	RET M918T	p-value
<b>Caratteristiche cliniche</b>					
<b>N (%)</b>	70 (51,47)	12 (8,82)	24 (17,65)	30 (22,06)	
<b>Sesso (%)</b>					0,036
<i>F</i>	50 (71,40)	10 (83,30)	11 (45,80)	16 (53,30)	
<i>M</i>	20 (28,60)	2 (16,70)	13 (54,20)	14 (46,70)	
<b>Età alla diagnosi</b>					0,045
<i>Mediana</i>	64,49	57,83	60,33	56,07	
<i>IQR</i>	55,31-73,27	53,89-66,62	53,39-65,18	47,55-63,38	
<b>Dimensione T, cm</b>					0,104
<i>Mediana</i>	1,40	1,80	1,95	1,50	
<i>IQR</i>	1,00-2,20	1,08-2,39	1,52-2,72	1,25-2,80	
<b>T (%)</b>					0,059
1	37 (54,40)	7 (58,30)	13 (54,20)	11 (37,90)	
2	10 (14,70)	4 (33,30)	7 (29,20)	4 (13,80)	
3	20 (29,40)	1 (8,30)	2 (8,30)	13 (44,80)	
4	1 (1,50)	0 (0,00)	2 (8,30)	1 (3,40)	
<b>T dic (%)</b>					0,032
1-2	46 (66,70)	11 (91,70)	20 (83,30)	16 (53,30)	
3-4	23 (33,30)	1 (8,30)	4 (16,70)	14 (46,70)	
<b>N (%)</b>					0,083
<i>X</i>	2 (2,86)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,30)	
0	48 (69,60)	9 (75,00)	13 (54,20)	10 (33,30)	
1	19 (27,50)	3 (25,00)	11 (45,80)	19 (63,30)	
<b>M (%)</b>					0,060
0	66 (95,70)	11 (91,70)	20 (87,00)	22 (75,86)	
1	3 (4,30)	1 (8,30)	3 (13,00)	7 (24,14)	
<b>Stadio (%)</b>					0,021
I	35 (52,20)	6 (50,00)	9 (39,10)	6 (20,00)	
II	12 (17,90)	3 (25,00)	4 (17,40)	5 (16,70)	
III	8 (11,90)	2 (16,70)	3 (13,00)	2 (6,70)	
IV	12 (17,90)	1 (8,30)	7 (30,40)	17 (56,70)	
<b>Stadio dic (%)</b>					0,052
I-II	40 (69,00)	8 (72,70)	12 (60,00)	10 (38,50)	
III-IV	18 (31,00)	3 (27,30)	8 (40,00)	16 (61,50)	

<b>Calcitonina pre-op., pg/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	187,00 58,85-800,00	537,00 134,50-850,00	1136,00 639,00-2129,00	541,00 403,00-2840,00	0,001
<b>CEA pre-op., ng/ml</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	2,80 1,67-16,30	7,00 5,85-15,50	52,70 45,80-60,00	34,70 18,40-90,59	0,004
<b>Grading istologico</b>					
<b>High-grade (%)</b> <i>Low-grade</i> <i>High-grade</i>	60 (85,70) 10 (14,30)	12 (100,00) 0 (0,00)	17 (70,80) 7 (29,20)	13 (46,40) 15 (53,60)	0,001
<b>Outcome</b>					
<b>Follow-up, mesi</b> <i>Mediana</i> <i>IQR</i>	100,00 65,00-144,00	83,50 49,00-128,50	55,50 24,50-87,75	70,00 35,00-103,00	0,009
<b>Outcome 1 (%)</b> <i>Ct ≤10</i> <i>Ct &gt;10</i>	46 (65,71) 24 (34,29)	9 (75,00) 3 (25,00)	14 (58,33) 10 (41,66)	11 (36,70) 19 (63,30)	0,033
<b>Outcome 2 (%)</b> <i>Ct indosab. (Ct &lt;1)</i> <i>Ct dosabile</i>	35 (50,00) 35 (50,00)	6 (50,00) 6 (50,00)	10 (41,66) 14 (58,33)	9 (30,00) 21 (70,00)	0,304
<b>Outcome 1 bis (%)</b> <i>Guariti (Ct ≤10)</i> <i>Non guariti</i> <i>Deceduti malattia-correlati</i>	46 (65,70) 19 (27,10) 5 (7,10)	9 (75,00) 3 (25,00) 0 (0,00)	14 (58,30) 7 (29,20) 3 (12,50)	11 (36,70) 10 (33,30) 9 (30,00)	0,025
<b>Outcome 2 bis (%)</b> <i>Guariti (Ct indos.)</i> <i>Non guariti</i> <i>Deceduti malattia-correlati</i>	34 (48,60) 31 (44,30) 5 (7,10)	6 (50,00) 6 (50,00) 0 (0,00)	10 (41,70) 11 (45,80) 3 (12,50)	9 (30,00) 12 (40,00) 9 (30,00)	0,052
<b>Decessi malattia-correlati (%)</b> <i>Sì</i> <i>No</i>	5 (8,20) 56 (91,80)	0 (0,00) 11 (100,00)	3 (15,00) 17 (85,00)	9 (33,30) 18 (66,70)	0,009

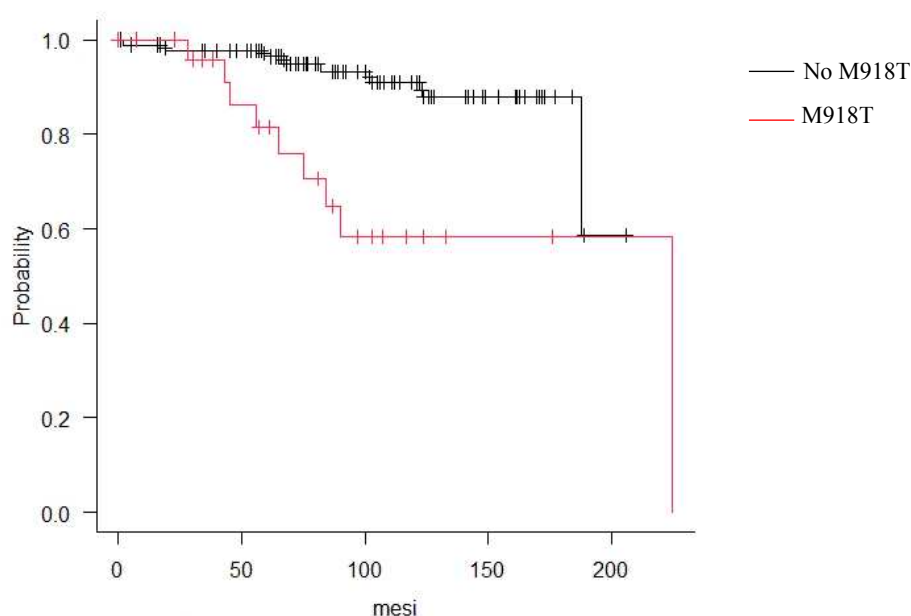
L'analisi della curva di Kaplan-Meier ha rivelato che la sopravvivenza malattia-correlata migliora nei pazienti *RAS*-mutati, seguiti con performance progressivamente peggiori dai pazienti WT, da quelli con mutazioni di *RET* esclusa la M918T e infine dai pazienti portatori di mutazione *RET* M918T, che presentavano la sopravvivenza malattia-correlata peggiore ( $p$  al log-rank = di 0,006) (*Grafico 4*).

*Grafico 4. Confronto fra la sopravvivenza nei pazienti con i 4 status mutazionali: WT, RAS+, RET no M918T, RET M918T ( $p=0,006$ ).*



Infine, è stata analizzata la curva di Kaplan-Meier rispetto alla mutazione *RET* M918T. Sono state confrontate le due curve di sopravvivenza per i pazienti con mutazione M918T rispetto ai pazienti senza la stessa mutazione.  $P$  al log-rank test è di 0,002 (*Grafico 6*).

Grafico 6. Confronto fra la sopravvivenza nei pazienti con mutazione M918T e pazienti con assenza di mutazione M918T ( $p=0,002$ ).



### 6.5 Associazione tra il *grading* istologico e caratteristiche clinico-patologiche e molecolari

Analizzando e classificando i pazienti dello studio secondo il nuovo sistema di *grading* istologico (IMTCGS), sono emerse differenze significative per diversi parametri clinico-patologici e molecolari.

In primo luogo, si è osservato che i tumori *high-grade* si associavano con dimensioni maggiori del tumore primitivo, come dimostra la dimensione mediana dei pazienti *high-grade* di 2,45 cm (IQR: 1,50-3,00 cm) a confronto con la mediana di 1,4 cm (IQR: 1,00-2,10 cm) dei pazienti *low-grade* ( $p<0,001$ ).

Lo stadio era significativamente più avanzato nei pazienti *high-grade*. In questi ultimi lo stadio I-II si presentava nel 33,30% dei casi mentre lo stadio III-IV nel 66,70%. Nei pazienti *low-grade* lo stadio I-II riguardava invece il 72,90% dei casi, mentre lo stadio III-IV solo il 27,10% ( $p<0,001$ ).

La Ct alla diagnosi risultava essere più elevata nei tumori *high-grade* con una mediana di 932,50 pg/ml (IQR: 446,50-2067,00 pg/ml) rispetto ai tumori *low-grade* che presentavano una Ct mediana di 331,50 pg/ml (IQR: 63,45-867,75) ( $p<0,001$ ).

I tumori *high-grade* hanno dimostrato avere un *outcome* peggiore. L'*outcome* suddiviso per pazienti con Ct  $\leq 10$  pg/ml, o non guariti (Ct  $> 10$  pg/ml), oppure deceduti malattia-correlati, era rappresentativo e dimostrava che i pazienti *high-grade* presentavano percentuali significativamente maggiori di non guarigione (31,20%) o di decessi malattia-correlati (34,40%), rispetto ai pazienti *low-grade* che avevano una percentuale del 28,00% di non guarigione e del 3,70% di decessi malattia correlati ( $p < 0,001$ ).

Particolarmente rilevante era la differenza della percentuale di casi *high-grade* nei pazienti con *RET* mutato (68,80%), rispetto a quella nei pazienti *RET wild-type* (31,20%) ( $p < 0,001$ ).

Analizzando i 4 stati mutazionali sono emerse differenze significative. Il 58,80% dei casi *low-grade* erano WT, l'11,80% avevano *RAS* mutato, il 16,70% presentavano mutazione di *RET* (esclusa M918T), e il 12,70% erano pazienti con mutazione *RET* M918T. Tra i casi *high-grade*, invece, il 31,20% erano WT, il 0,00% erano pazienti *RAS* mutato, il 21,90% avevano mutazione di *RET* (esclusa M918T), e il 46,90% presentavano mutazione *RET* M918T ( $p < 0,001$ ).

Le caratteristiche dei pazienti *high-grade* rispetto a quelli *low-grade* sono riassunte nella *Tabella VII*.

*Tabella VII. Correlazione tra il grading istologico e caratteristiche clinico-patologiche e molecolari.*

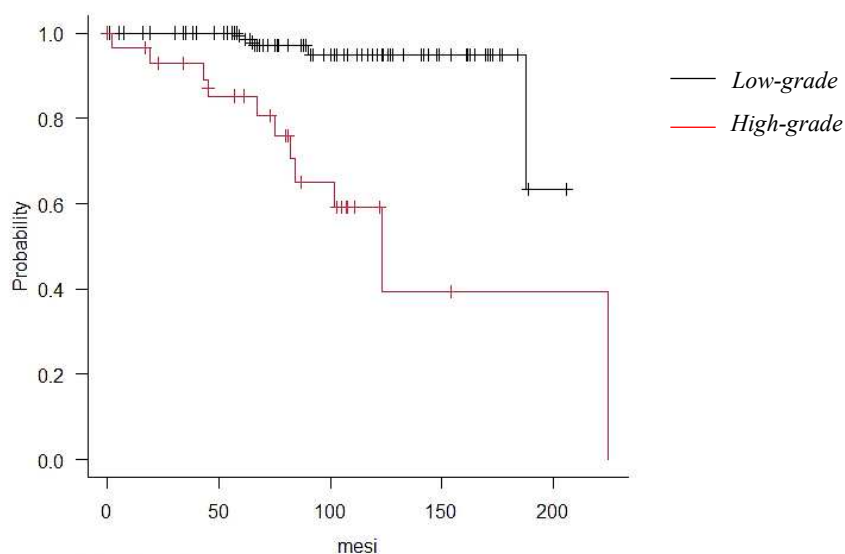
Variabile	<i>Low-grade</i>	<i>High-grade</i>	p-value
<b>Caratteristiche cliniche</b>			
<b>n (%)</b>	109 (77,30)	32 (22,69)	
<b>Sesso (%)</b>			0,038
<i>F</i>	74 (67,90)	15 (46,90)	
<i>M</i>	35 (32,10)	17 (53,10)	
<b>Età alla diagnosi</b>			0,103
<i>Mediana</i>	63,19	58,80	
<i>IQR</i>	53,96-71,93	49,54-66,49	
<b>Dimensione T, cm</b>			<0,001
<i>Mediana</i>	1,40	2,45	
<i>IQR</i>	1,00-2,10	1,50-3,00	

<b>T (%)</b>				<0,001
	<i>1</i>	66 (61,70)	8 (25,00)	
	<i>2</i>	20 (18,70)	6 (18,80)	
	<i>3</i>	21 (19,60)	14 (43,80)	
	<i>4</i>	0 (0,00)	4 (12,50)	
<b>T dic (%)</b>				<0,001
	<i>1-2</i>	86 (79,60)	14 (43,80)	
	<i>3-4</i>	22 (20,40)	18 (56,20)	
<b>N (%)</b>				<0,001
	<i>X</i>	2 (1,80)	1 (3,10)	
	<i>0</i>	78 (72,20)	9 (28,10)	
	<i>1</i>	28 (25,90)	22 (68,80)	
<b>M (%)</b>				<0,001
	<i>0</i>	104 (97,20)	22 (70,97)	
	<i>1</i>	3 (2,80)	9 (29,03)	
<b>Stadio (%)</b>				<0,001
	<i>I</i>	57 (54,80)	4 (12,50)	
	<i>II</i>	19 (18,30)	6 (18,80)	
	<i>III</i>	14 (13,50)	1 (3,10)	
	<i>IV</i>	14 (13,50)	21 (65,60)	
<b>Stadio dic (%)</b>				<0,001
	<i>I-II</i>	62 (72,90)	10 (33,30)	
	<i>III-IV</i>	23 (27,10)	20 (66,70)	
<b>Calcitonina pre-op., pg/ml</b>				<0,001
	<i>Mediana</i>	331,50	932,50	
	<i>IQR</i>	63,45-867,75	446,50-2067,00	
<b>CEA pre-op., ng/ml</b>				0,353
	<i>Mediana</i>	9,35	34,60	
	<i>IQR</i>	2,50-47,07	3,00-53,00	
<b>Outcome</b>				
<b>Follow-up, mesi</b>				0,390
	<i>Mediana</i>	81,00	80,50	
	<i>IQR</i>	40,00-128,00	44,50-105,50	
<b>Outcome 1 (%)</b>				0,001
	<i>Ct ≤10</i>	73 (68,22)	11 (34,37)	
	<i>Ct &gt;10</i>	34 (31,77)	21 (65,63)	
<b>Outcome 2 (%)</b>				0,001
	<i>Ct indosabile (Ct &lt;1)</i>	56 (52,30)	6 (18,75)	
	<i>Ct dosabile</i>	51 (47,70)	26 (81,25)	
<b>Outcome 1 bis (%)</b>				<0,001
	<i>Guariti (Ct ≤10)</i>	73 (68,20)	11 (34,40)	
	<i>Non guariti</i>	30 (28,00)	10 (31,20)	
	<i>Deceduti malattia-corr.</i>	4 (3,70)	11 (34,40)	
<b>Outcome 2 bis (%)</b>				<0,001
	<i>Guariti (Ct indosabile)</i>	55 (51,40)	6 (18,80)	
	<i>Non guariti</i>	48 (44,90)	15 (46,90)	
	<i>Deceduti malattia-corr.</i>	4 (3,70)	11 (34,40)	

<b>Decessi malattia-correlati (%)</b>			<0,001
<i>Si</i>	4 (4,50)	11 (36,70)	
<i>No</i>	84 (95,50)	19 (63,30)	
<b><u>Status mutazionale</u></b>			
<b>RET mutazione somatica (%)</b>			<0,001
<i>RET mutaz. somatica</i>	28 (28,30)	22 (68,80)	
<i>RET wild type</i>	71 (71,70)	10 (31,20)	
<b>Suddivisione secondo 4 mutazioni (%)</b>			<0,001
<i>WT</i>	60 (58,80)	10 (31,20)	
<i>RAS+</i>	12 (11,80)	0 (0,00)	
<i>RET no M918T</i>	17 (16,70)	7 (21,90)	
<i>RET M918T</i>	13 (12,70)	15 (46,90)	

Tramite l'analisi della curva di Kaplan-Meier è stato possibile confrontare le due curve di sopravvivenza, tra i pazienti *low-grade* e *high-grade*, avendo come riferimento l'*outcome* decesso malattia-correlato. La sopravvivenza risultava significativamente peggiore nei pazienti *high-grade* rispetto ai *low-grade* ( $p$  al log-rank test = 0,000007) (Grafico 7).

Grafico 7. Confronto fra la sopravvivenza nei pazienti *high-grade* e pazienti *low-grade* ( $p=0,000007$ ).



## 7. DISCUSSIONE

L'ampia variabilità degli *outcome* dei pazienti affetti da MTC, come descritta nel corso della ricerca, evidenzia l'importanza di una diagnosi tempestiva, cruciale nel determinare la prognosi dei pazienti con MTC. In questo contesto è necessario individuare i pazienti con prognosi peggiore per un monitoraggio e terapia più efficaci, al fine di ridurre la mortalità e migliorarne la qualità della vita [1,3]. Riguardo alla terapia, la chirurgia garantisce, in alcuni casi, la radicalità della malattia, mentre in altri l'MTC è persistente o ricorrente nonostante l'intervento chirurgico. In tal caso l'unica opzione terapeutica rimane la terapia sistemica, la quale però aumenta la PFS (*progression free survival*) ma non migliora la sopravvivenza globale [1,4].

Assume quindi particolare rilevanza lo studio dei parametri molecolari, clinico-patologici e istologici, in quanto fattori predittivi di malattia.

I dati di Letteratura attribuiscono, allo stato attuale, un valore prognostico significativo ai biomarcatori molecolari. Come dimostra infatti una recente metanalisi, che ha incluso 964 MTC sporadici, la mutazione di *RET* è un fattore prognostico negativo in quanto correlato con un alto rischio di stadio avanzato alla diagnosi, peggiore *outcome*, progressione di malattia e mortalità [79].

I risultati del nostro studio sono in linea con la Letteratura, dimostrando che i pazienti con la mutazione di *RET* presentano differenze significative rispetto ai pazienti *RET wild-type*, con riferimento ad alcune caratteristiche clinico-patologiche: maggiori dimensioni del tumore primitivo, stadio di malattia alla diagnosi avanzato, livelli di calcitonina pre-operatoria più elevati e mortalità malattia-correlata. Tramite l'analisi di Kaplan-Meier, sono state inoltre confrontate le curve di sopravvivenza tra i pazienti con *RET* mutato e i pazienti con *RET wild-type*, e il log-rank test ha confermato una sopravvivenza malattia-correlata maggiore nei pazienti *RET wild-type* rispetto ai *RET*-mutati. Sempre tramite l'analisi di Kaplan-Meier, abbiamo riscontrato differenze significative nella sopravvivenza libera da malattia con una sopravvivenza maggiore nei pazienti *RET wild-type*, considerando guariti i pazienti con Ct  $\leq 10$  pg/ml.

Questo studio conferma, dunque, il significato prognostico negativo della mutazione dell'oncogene *RET*.



Come dimostrato in vari studi, alcune specifiche mutazioni che colpiscono gli esoni 15 e 16 del gene *RET*, di cui fa parte la mutazione M918T, hanno prognosi maggiormente negativa [80].

I nostri risultati confermano che la mutazione M918T, rispetto agli altri stati mutazionali categorizzati nello studio (*wild-type*, la mutazione di *RAS*, e la mutazione di *RET* non-M918T), si associa ad uno stadio di malattia alla diagnosi avanzato e un'alta percentuale di decessi malattia-correlati. Tramite l'analisi della curva di Kaplan-Meier è stata confermata una differenza significativa tra i 4 stati mutazionali analizzati: la sopravvivenza malattia-correlata è migliore nei pazienti *RAS*-mutati, seguiti con performance progressivamente peggiori dai pazienti WT, da quelli con mutazioni di *RET* esclusa la M918T, e infine dai pazienti portatori di mutazione *RET* M918T, che presentavano la sopravvivenza malattia-correlata peggiore.

Prendendo invece in considerazione la mutazione di *RAS*, la seconda più frequente nei pazienti con MTC sporadico, lo studio conferma che non assume valore prognostico nel predire l'aggressività del tumore. I dati paiono al contrario suggerire che la mutazione *RAS* abbia una migliore prognosi rispetto ai pazienti *wild-type*, oltre che rispetto ai portatori di mutazione di *RET*. Nel confronto diretto tra i pazienti con *RAS* mutato e *RAS wild-type*, alla curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier, non si confermano tuttavia differenze significative tra i portatori di mutazione e i *wild-type*. Pur presentando, quindi, una minor probabilità di decesso malattia-correlato rispetto agli altri *status* mutazionali, la mutazione non pare di per sé incidere sulla prognosi. Tale risultato è in linea con quello che è stato documentato in Letteratura [79].

Il punto di forza di questo studio è stato quello di prendere in considerazione il nuovo sistema di *grading* dell'MTC sporadico. Come è stato dichiarato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nella quinta edizione della classificazione dei tumori tiroidei, pubblicata nel 2022, un'importante novità per l'MTC è rappresentata dall'introduzione di un nuovo sistema di *grading*.

Inizialmente, erano stati proposti due sistemi di *grading* derivanti da due studi paralleli, entrambi validati. Il primo, condotto da Alzumaili *et al.*, del MSKCC (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*) di New York, ha preso in considerazione 144 casi di MTC e ha proposto uno schema a due livelli di *grading*

[59]. Il secondo, condotto da Fuchs *et al.*, un gruppo di ricerca di Sydney, ha proposto, invece, sulla base di uno studio condotto su 72 pazienti, uno schema con tre gradi istologici (*low-grade*, *intermediate-grade*, *high-grade*) [60]. Per definire il grado istopatologico, entrambi hanno utilizzato gli stessi parametri, ossia l'attività proliferativa (indice proliferativo Ki67 e conta mitotica) e la necrosi tumorale. Sulla base dei due schemi proposti, nel 2021 è stato pubblicato un articolo da Xu *et al.* che proponeva un unico sistema di *grading* a livello internazionale. Lo studio su cui si è basata la proposta di riclassificazione del *grading*, è stato condotto su 327 pazienti con MTC provenienti da 5 grandi centri tra Stati Uniti, Europa e Australia. L'articolo rispondeva, dunque, all'esigenza di avere un unico sistema di *grading* validato a livello internazionale. È stato così introdotto l'"*International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System*" (IMTCGS). Questo sistema di *grading* si è dimostrato efficace nel predire la probabilità di decesso malattia-correlato in modo indipendente da altri fattori quali età, sesso, grandezza del tumore, stato del margine, livelli sierologici di Ct e CEA, presenza di metastasi e sopravvivenza generale [61]. Utilizzando questo schema di *grading*, il 25% dei pazienti dello studio di Xu *et al.* risultava avere un tumore *high-grade* [62].

Secondo il sistema IMTCGS, i tumori *high-grade* presentano almeno una delle tre seguenti caratteristiche: necrosi tumorale, conta mitotica  $\geq 5$  per  $2 \text{ mm}^2$ , e/o un indice proliferativo Ki67  $\geq 5\%$  [62].

Lo studio di Xu *et al.* ha inoltre dimostrato che il grado del tumore, sulla base di quest'ultimo sistema di *grading*, è indipendente dalla mutazione *RET* germinale [62]. Restava aperta invece la possibilità di dimostrare un'associazione tra il grado e il genotipo nei casi di mutazioni somatiche, ossia negli MTC sporadici.

Uno studio condotto da Najdawi *et al.* del 2021 ha provato ad indagare una possibile associazione tra mutazioni somatiche di *RET* e *RAS* e grado del tumore su una coorte di 44 pazienti con MTC sporadici. I risultati confermano la prognosi sfavorevole dei pazienti *high-grade* ma non dimostrano associazioni significative tra il grado e la presenza di mutazioni somatiche di *RET* o *RAS* [61]. Verosimilmente, il limite maggiore dello studio era rappresentato dalla numerosità del campione, motivo per cui era utile rinnovare l'analisi con una coorte di pazienti più ampia.

Il nostro studio si è proposto quindi di studiare casi *high-grade*, e analizzare sia le caratteristiche clinico-patologiche sia quelle molecolari nei pazienti con MTC sporadico.

I risultati dello studio hanno confermato che i casi *high-grade* hanno una prognosi più sfavorevole, in accordo con ciò che è stato affermato negli articoli più recenti presenti in Letteratura. I pazienti *high-grade* del nostro campione presentavano inoltre uno stadio di malattia alla diagnosi più avanzato, livelli di Ct alla diagnosi più elevati, sopravvivenza libera da malattia peggiore e maggior frequenza di decesso malattia-correlato. Anche l'analisi di Kaplan-Meier mostra una differenza altamente significativa tra le curve di sopravvivenza dei pazienti *high-grade* e di quelli *low-grade*.

Dal punto di vista della caratterizzazione molecolare e dell'associazione con il *grading* istologico, lo studio presenta nuovi e importanti risultati. A differenza di quanto emerso dallo studio di Najdawi *et al.*, il nostro studio ha dimostrato, infatti, che è presente un'effettiva associazione tra il grado del tumore e il genotipo. Confrontando i tumori *high-grade* e *low-grade*, la differenza tra casi di *RET* mutato e *RET wild-type* risultava significativa. Altresì, era altamente significativa considerando i 4 stati mutazionali analizzati nello studio (*wild-type*, la mutazione di *RAS*, la mutazione di *RET* M918T, e la mutazione di *RET* non-M918T). I risultati hanno dimostrato, inoltre, un'elevata frequenza (46,90%) della mutazione *RET* M918T nei tumori *high-grade*.

Il principale punto di forza dello studio è rappresentato dalla numerosità del campione di MTC sporadici proveniente da un unico centro.

È necessario, tuttavia, evidenziare alcune limitazioni insite nel presente studio. Esso considera infatti una coorte retrospettiva, che potrebbe costituire un *bias* di selezione.

Alcuni dati raccolti nel *database* potrebbero poi presentare lievi imprecisioni. Per un numero ristretto di casi, è stato infatti necessario contattare telefonicamente il paziente per raccogliere dati aggiornati sull'evoluzione del quadro clinico.

L'assegnazione del *grading* istologico è, inoltre, operatore-dipendente, ed è influenzata dalla variabilità degli indici di proliferazione. A tal fine è indicata la considerazione del campione con più alta attività proliferativa, in quanto meglio rappresentativo del grado istopatologico.

Infine, l'analisi molecolare è stata limitata a *RET* e *RAS*. Pur rappresentando queste le mutazioni *driver* più frequenti e note dell'MTC, vi possono essere una serie di mutazioni rare non indagate nel presente campione.

Nel contesto di future indagini, sarebbe necessario fare ricorso ad un'analisi genetica più estesa, eventualmente anche mediante tecniche di *Next Generation Sequencing*.

## 8. CONCLUSIONI

Grazie alla coorte estesa di 143 pazienti con MTC, lo studio è in grado di contribuire al progresso dell'analisi scientifica riguardante il carcinoma midollare della tiroide sporadico. Avere a disposizione i dati relativi ad un numero così consistente di pazienti è indubbiamente un punto di forza dello studio, anche in considerazione della rarità della malattia.

La presente ricerca conferma con forte evidenza il significato prognostico di alcuni *biomarker* molecolari. I nostri dati dimostrano infatti come la presenza della mutazione *RET* sia un forte predittore di aggressività del tumore e di cattiva prognosi. Ciò risulta essere ancora più evidente se si considera la mutazione *RET* M918T. La mutazione del gene *RAS*, seconda per frequenza, non assume invece un significato prognostico nei casi di MTC sporadico. Il valore prognostico dello *status* mutazionale avvalorava dunque l'importanza di un processo di ricerca che identifichi tempestivamente i genotipi ad alto rischio.

Prendendo come punto di riferimento il nuovo sistema di *grading* IMTCGS per l'analisi dell'intera coorte di 143 pazienti con MTC sporadico, si è innanzitutto riscontrata una sostanziale correttezza della Letteratura riguardo alla definizione di un valore prognostico negativo dei tumori classificati come *high-grade* nel suddetto sistema di *grading*.

In secondo luogo, mentre gli studi precedenti hanno identificato il genotipo e il grado istologico come aventi valore prognostico indipendente, il nostro studio ha per la prima volta dimostrato la presenza di un'associazione tra di essi. Sempre prendendo come riferimento il sistema di *grading* IMTCGS, si è osservato infatti che i tumori *high-grade* si associano alla presenza di una mutazione a carico dell'oncogene *RET*, con una frequenza particolarmente elevata della mutazione M918T, notoriamente associata a maggiore aggressività del tumore.

I risultati dello studio contribuiscono al progresso della ricerca e in modo particolare ad un miglioramento della pratica clinica, in quanto, l'identificazione dei tumori *high-grade* associati alla mutazione di *RET*, permette al clinico di individuare tempestivamente i casi ad alto rischio. Parallelamente, si incrementano le possibilità di garantire ai pazienti un'adeguata terapia e uno stretto *follow-up*, con conseguenti maggiori possibilità di successo del percorso di cura.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Kim M, Kim BH. Current Guidelines for Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021 Jun;36(3):514-524. doi: 10.3803/EnM.2021.1082. Epub 2021 Jun 22. PMID: 34154310; PMCID: PMC8258323
2. Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1959 Jan;19(1):152-61. doi: 10.1210/jcem-19-1-152. PMID: 13620740.
3. Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, Lee N, Machens A, Moley JF, Pacini F, Raue F, Frank-Raue K, Robinson B, Rosenthal MS, Santoro M, Schlumberger M, Shah M, Waguespack SG; American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2015 Jun;25(6):567-610. doi: 10.1089/thy.2014.0335. PMID: 25810047; PMCID: PMC4490627.
4. Filetti S, Durante C, Hartl D, Leboulleux S, Locati LD, Newbold K, Papotti MG, Berruti A; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019 Dec 1;30(12):1856-1883. doi: 10.1093/annonc/mdz400. PMID: 31549998.
5. Torresan F, Mian C, Cavedon E, Iacobone M. Cure and survival of sporadic medullary thyroid carcinoma following systematic preoperative calcitonin screening. *Langenbecks Arch Surg*. 2019 Jun;404(4):411-419. doi: 10.1007/s00423-019-01764-3. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30903267.
6. Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Aupérin A, Leboulleux S, Chehboun A, Troalen F, Dromain C, Lumbroso J, Baudin E, Schlumberger M. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol*. 2008 Feb;158(2):239-46. doi: 10.1530/EJE-07-0667. PMID: 18230832.
7. Haddad RI, Bischoff L, Ball D, Bernet V, Blomain E, Busaidy NL, Campbell M, Dickson P, Duh QY, Ehya H, Goldner WS, Guo T, Haymart M, Holt S, Hunt JP, Iagaru A, Kandeel F, Lamonica DM, Mandel S, Markovina S, McIver B, Raeburn CD, Rezaee R, Ridge JA, Roth MY, Scheri RP, Shah JP, Sipos JA, Sippel R, Sturgeon C, Wang TN, Wirth LJ, Wong RJ, Yeh M, Cassara CJ, Darlow S. Thyroid Carcinoma, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022 Aug;20(8):925-951. doi: 10.6004/jncn.2022.0040. PMID: 35948029.

8. Romei C, Casella F, Tacito A, Bottici V, Valerio L, Viola D, Cappagli V, Matrone A, Ciampi R, Piaggi P, Ugolini C, Torregrossa L, Basolo F, Materazzi G, Vitti P, Elisei R. New insights in the molecular signature of advanced medullary thyroid cancer: evidence of a bad outcome of cases with double *RET* mutations. *J Med Genet*. 2016 Nov;53(11):729-734. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103833. Epub 2016 Jul 28. PMID: 27468888.
9. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 Aug;22(6):475-85. doi: 10.1016/j.clon.2010.05.002. PMID: 20627492.
10. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993 Jul;2(7):851-6. doi: 10.1093/hmg/2.7.851. PMID: 8103403.
11. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, Delbridge L, Eng C, Robinson BG. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996 Mar;44(3):249-57. doi: 10.1046/j.1365-2265.1996.681503.x. PMID: 8729519.
12. Rindi G, Mete O, Uccella S, Basturk O, La Rosa S, Brosens LAA, Ezzat S, de Herder WW, Klimstra DS, Papotti M, Asa SL. Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):115-154. doi: 10.1007/s12022-022-09708-2. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35294740.
13. Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootcholten PM, Ceccherini I, Patrone G, Priolo M, Buys CH, et al. The physical map of the human *RET* proto-oncogene. *Oncogene*. 1995 Nov 2;11(9):1737-43. PMID: 7478601.
14. Anders J, Kjar S, Ibáñez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the *RET* receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35808-17. doi: 10.1074/jbc.M104968200. Epub 2001 Jul 9. PMID: 11445581.
15. Plaza-Menacho I. Structure and function of *RET* in multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Feb;25(2):T79-T90. doi: 10.1530/ERC-17-0354. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29175871.
16. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. *RET* as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine

- tumors. *Endocr Rev.* 2006 Aug;27(5):535-60. doi: 10.1210/er.2006-0017. Epub 2006 Jul 18. PMID: 16849421.
17. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May;3(5):383-94. doi: 10.1038/nrn812. PMID: 11988777.
  18. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.* 2004 Feb 20;204(2):197-211. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00456-7. PMID: 15013219.
  19. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4056-63. doi: 10.1093/emboj/19.15.4056. PMID: 10921886; PMCID: PMC306592.
  20. Elisei R, Alevizaki M, Conte-Devolx B, Frank-Raue K, Leite V, Williams GR. 2012 European thyroid association guidelines for genetic testing and its clinical consequences in medullary thyroid cancer. *Eur Thyroid J.* 2013 Jan;1(4):216-31. doi: 10.1159/000346174. Epub 2012 Dec 19. PMID: 24783025; PMCID: PMC3821492.
  21. Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, D'Amato GL, de Franciscis V, Fusco A. The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene.* 1990 Oct;5(10):1595-8. PMID: 1701232.
  22. Schuffenecker I, Ginet N, Goldgar D, Eng C, Chambe B, Boneu A, Houdent C, Pallo D, Schlumberger M, Thivolet C, Lenoir GM. Prevalence and parental origin of de novo RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma. *Le Groupe d'Etude des Tumeurs a Calcitonine. Am J Hum Genet.* 1997 Jan;60(1):233-7. PMID: 8981969; PMCID: PMC1712555.
  23. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjöld M, Komminoth P, Hendy GN, Mulligan LM, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA.* 1996 Nov 20;276(19):1575-9. PMID: 8918855.
  24. Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid



- carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar;86(3):1104-9. doi: 10.1210/jcem.86.3.7290. PMID: 11238493.
25. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, Zajac JD, Robinson BG, Eng C. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Nov;82(11):3902-4. doi: 10.1210/jcem.82.11.4508. PMID: 9360560.
  26. Cosci B, Vivaldi A, Romei C, Gemignani F, Landi S, Ciampi R, Tacito A, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Cappagli V, Viola D, Piaggi P, Vitti P, Pinchera A, Elisei R. In silico and in vitro analysis of rare germline allelic variants of RET oncogene associated with medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011 Sep 20;18(5):603-12. doi: 10.1530/ERC-11-0117. PMID: 21810974.
  27. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):E863-8. doi: 10.1210/jc.2010-1921. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325462.
  28. Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, Cosci B, Romei C, Barollo S, Cirello V, Bottici V, Marconcini G, Rosa PM, Borrello MG, Basolo F, Ugolini C, Materazzi G, Pinchera A, Elisei R. Evidence of a low prevalence of RAS mutations in a large medullary thyroid cancer series. *Thyroid.* 2013 Jan;23(1):50-7. doi: 10.1089/thy.2012.0207. Epub 2012 Dec 16. PMID: 23240926.
  29. Schilling T, Bürck J, Sinn HP, Clemens A, Otto HF, Höppner W, Herfarth C, Ziegler R, Schwab M, Raue F. Prognostic value of codon 918 (ATG-->ACG) RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer.* 2001 Jan 20;95(1):62-6. doi: 10.1002/1097-0215(20010120)95:1<62::aid-ijc1011>3.0.co;2-1. PMID: 11241313.
  30. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol.* 2006 Nov;155(5):645-53. doi: 10.1530/eje.1.02289. PMID: 17062879.
  31. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67 Suppl 1(Suppl 1):69-75. doi: 10.6061/clinics/2012(sup01)13. PMID: 22584709; PMCID: PMC3328821.

32. Rothberg AE, Raymond VM, Gruber SB, Sisson J. Familial medullary thyroid carcinoma associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Thyroid*. 2009 Jun;19(6):651-5. doi: 10.1089/thy.2009.0021. PMID: 19445625.
33. Decker RA, Peacock ML. Occurrence of MEN 2a in familial Hirschsprung's disease: a new indication for genetic testing of the RET proto-oncogene. *J Pediatr Surg*. 1998 Feb;33(2):207-14. doi: 10.1016/s0022-3468(98)90433-x. PMID: 9498388.
34. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler ML, Morange S, Conte-Devolx B; French Calcitonin Tumors Group (GETC). Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine ret mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Aug;86(8):3746-53. doi: 10.1210/jcem.86.8.7767. PMID: 11502806.
35. Mathiesen JS, Effraimidis G, Rossing M, Rasmussen ÅK, Hoejberg L, Bastholt L, Godballe C, Oturai P, Feldt-Rasmussen U. Multiple endocrine neoplasia type 2: A review. *Semin Cancer Biol*. 2022 Feb;79:163-179. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.03.035. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33812987.
36. Takahashi M. RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2022;98(3):112-125. doi: 10.2183/pjab.98.008. PMID: 35283407; PMCID: PMC8948417.
37. Machens A, Dralle H. Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2655-63. doi: 10.1210/jc.2009-2368. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20339026.
38. Nigam A, Xu B, Spanheimer PM, Ganly I, Tuttle RM, Wong RJ, Shaha AR, Ghossein RA, Untch BR. Tumor Grade Predicts for Calcitonin Doubling Times and Disease-Specific Outcomes After Resection of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2022 Oct;32(10):1193-1200. doi: 10.1089/thy.2022.0217. Epub 2022 Sep 20. PMID: 35950622; PMCID: PMC9595606.
39. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A, Schlumberger M, Bigorgne JC, Dumontier P, Leclerc L, Corcuff B, Guilhem I. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. *Groupe d'étude des tumeurs à calcitonine. Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998 Mar;48(3):265-73. doi: 10.1046/j.1365-2265.1998.00392.x. PMID: 9578814.

40. Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009 Jan;5(1):35-44. doi: 10.1038/ncpendmet1023. PMID: 19079272.
41. Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nysten ES, Snider RH, Simon GL, Goldberg RL, Becker KL. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Sep;83(9):3296-301. doi: 10.1210/jcem.83.9.5129. PMID: 9745444.
42. Thomas CM, Asa SL, Ezzat S, Sawka AM, Goldstein D. Diagnosis and pathologic characteristics of medullary thyroid carcinoma-review of current guidelines. *Curr Oncol.* 2019 Oct;26(5):338-344. doi: 10.3747/co.26.5539. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31708652; PMCID: PMC6821118.
43. Mendelsohn G, Wells SA Jr, Baylin SB. Relationship of tissue carcinoembryonic antigen and calcitonin to tumor virulence in medullary thyroid carcinoma. An immunohistochemical study in early, localized, and virulent disseminated stages of disease. *Cancer.* 1984 Aug 15;54(4):657-62. doi: 10.1002/1097-0142(1984)54:4<657::aid-cnrcr2820540412>3.0.co;2-v. PMID: 6378353.
44. Moley JF. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. *J Natl Compr Canc Netw.* 2010 May;8(5):549-56. doi: 10.6004/jnccn.2010.0042. PMID: 20495084.
45. Imai T, Uchino S, Okamoto T, Suzuki S, Kosugi S, Kikumori T, Sakurai A; MEN Consortium of Japan. High penetrance of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia 2 caused by germ line RET codon 634 mutation in Japanese patients. *Eur J Endocrinol.* 2013 Apr 15;168(5):683-7. doi: 10.1530/EJE-12-1106. PMID: 23416954.
46. Herfarth KK, Bartsch D, Doherty GM, Wells SA Jr, Lairmore TC. Surgical management of hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Surgery.* 1996 Dec;120(6):966-73; discussion 973-4. doi: 10.1016/s0039-6060(96)80042-0. PMID: 8957482.
47. Verga U, Fugazzola L, Cambiaghi S, Pritelli C, Alessi E, Cortelazzi D, Gangi E, Beck-Peccoz P. Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003 Aug;59(2):156-61. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01782.x. PMID: 12864791.
48. Rothberg AE, Raymond VM, Gruber SB, Sisson J. Familial medullary thyroid carcinoma associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Thyroid.* 2009 Jun;19(6):651-5. doi: 10.1089/thy.2009.0021. PMID: 19445625.

49. Mulligan LM, Eng C, Attié T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, Robinson BG, Frilling A, Verellen-Dumoulin C, Safar A, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec;3(12):2163-7. doi: 10.1093/hmg/3.12.2163. PMID: 7881414.
50. Decker RA, Peacock ML. Occurrence of MEN 2a in familial Hirschsprung's disease: a new indication for genetic testing of the RET proto-oncogene. *J Pediatr Surg.* 1998 Feb;33(2):207-14. doi: 10.1016/s0022-3468(98)90433-x. PMID: 9498388.
51. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 15;91(4):1579-83. doi: 10.1073/pnas.91.4.1579. PMID: 7906417; PMCID: PMC43203.
52. Cohen MS, Phay JE, Albinson C, DeBenedetti MK, Skinner MA, Lairmore TC, Doherty GM, Balfe DM, Wells SA Jr, Moley JF. Gastrointestinal manifestations of multiple endocrine neoplasia type 2. *Ann Surg.* 2002 May;235(5):648-54; discussion 654-5. doi: 10.1097/00000658-200205000-00006. PMID: 11981210; PMCID: PMC1422490.
53. Waguespack SG, Rich TA, Perrier ND, Jimenez C, Cote GJ. Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Aug 23;7(10):596-607. doi: 10.1038/nrendo.2011.139. PMID: 21862994.
54. Castinetti F, Moley J, Mulligan L, Waguespack SG. A comprehensive review on MEN2B. *Endocr Relat Cancer.* 2018 Feb;25(2):T29-T39. doi: 10.1530/ERC-17-0209. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28698189.
55. Liska J, Altanerova V, Galbavy S, Stvrtina S, Brtko J. Thyroid tumors: histological classification and genetic factors involved in the development of thyroid cancer. *Endocr Regul.* 2005 Sep;39(3):73-83. PMID: 16468229.
56. Jung CK, Agarwal S, Hang JF, Lim DJ, Bychkov A, Mete O. Update on C-Cell Neuroendocrine Neoplasm: Prognostic and Predictive Histopathologic and Molecular Features of Medullary Thyroid Carcinoma. *Endocr Pathol.* 2023 Mar;34(1):1-22. doi: 10.1007/s12022-023-09753-5. Epub 2023 Mar 8. PMID: 36890425.
57. Chu YH, Lloyd RV. Medullary Thyroid Carcinoma: Recent Advances Including MicroRNA Expression. *Endocr Pathol.* 2016 Dec;27(4):312-324. doi: 10.1007/s12022-016-9449-0. PMID: 27539727.

58. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, LiVolsi VA, Papotti MG, Sobrinho-Simões M, Tallini G, Mete O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):27-63. doi: 10.1007/s12022-022-09707-3. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35288841.
59. Alzumaili B, Xu B, Spanheimer PM, Tuttle RM, Sherman E, Katabi N, Dogan S, Ganly I, Untch BR, Ghossein RA. Grading of medullary thyroid carcinoma on the basis of tumor necrosis and high mitotic rate is an independent predictor of poor outcome. *Mod Pathol*. 2020 Sep;33(9):1690-1701. doi: 10.1038/s41379-020-0532-1. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32313184; PMCID: PMC7483270.
60. Fuchs TL, Nassour AJ, Glover A, Sywak MS, Sidhu SB, Delbridge LW, Clifton-Bligh RJ, Gild ML, Tsang V, Robinson BG, Clarkson A, Sheen A, Sioson L, Chou A, Gill AJ. A Proposed Grading Scheme for Medullary Thyroid Carcinoma Based on Proliferative Activity (Ki-67 and Mitotic Count) and Coagulative Necrosis. *Am J Surg Pathol*. 2020 Oct;44(10):1419-1428. doi: 10.1097/PAS.0000000000001505. PMID: 32452872; PMCID: PMC7641183.
61. Najdawi F, Ahmadi S, Capelletti M, Dong F, Chau NG, Barletta JA. Evaluation of grade in a genotyped cohort of sporadic medullary thyroid carcinomas. *Histopathology*. 2021 Sep;79(3):427-436. doi: 10.1111/his.14370. Epub 2021 Jun 15. PMID: 33763905.
62. Xu B, Fuchs TL, Ahmadi S, Alghamdi M, Alzumaili B, Bani MA, Baudin E, Chou A, De Leo A, Fagin JA, Ganly I, Glover A, Hartl D, Kanaan C, Khneisser P, Najdawi F, Nigam A, Papachristos A, Repaci A, Spanheimer PM, Solaroli E, Untch BR, Barletta JA, Tallini G, Al Ghuzlan A, Gill AJ, Ghossein RA. International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System: A Validated Grading System for Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2022 Jan 1;40(1):96-104. doi: 10.1200/JCO.21.01329. Epub 2021 Nov 3. PMID: 34731032; PMCID: PMC8683221.
63. Machens A, Dralle H. Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2655-63. doi: 10.1210/jc.2009-2368. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20339026.
64. Yeh T, Yeung M, Sherman EJ, Tuttle RM, Sabra MM. Structural Doubling Time Predicts Overall Survival in Patients with Medullary Thyroid Cancer in Patients with Rapidly Progressive Metastatic Medullary Thyroid Cancer Treated with Molecular Targeted Therapies. *Thyroid*. 2020

Aug;30(8):1112-1119. doi: 10.1089/thy.2019.0579. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32131709; PMCID: PMC7415878.

65. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026. PMID: 19097774.
66. Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, Schöffski P, Brose MS, Shah MH, Licitra L, Jarzab B, Medvedev V, Kreissl MC, Niederle B, Cohen EE, Wirth LJ, Ali H, Hessel C, Yaron Y, Ball D, Nelkin B, Sherman SI. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Oct 10;31(29):3639-46. doi: 10.1200/JCO.2012.48.4659. Epub 2013 Sep 3. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2014 Jun 10;32(17):1864. PMID: 24002501; PMCID: PMC4164813.
67. Wirth LJ, Sherman E, Robinson B, Solomon B, Kang H, Lorch J, Worden F, Brose M, Patel J, Leboulleux S, Godbert Y, Barlesi F, Morris JC, Owonikoko TK, Tan DSW, Gautschi O, Weiss J, de la Fouchardière C, Burkard ME, Laskin J, Taylor MH, Kroiss M, Medioni J, Goldman JW, Bauer TM, Levy B, Zhu VW, Lakhani N, Moreno V, Ebata K, Nguyen M, Heirich D, Zhu EY, Huang X, Yang L, Kherani J, Rothenberg SM, Drilon A, Subbiah V, Shah MH, Cabanillas ME. Efficacy of Selpercatinib in *RET*-Altered Thyroid Cancers. *N Engl J Med*. 2020 Aug 27;383(9):825-835. doi: 10.1056/NEJMoa2005651. PMID: 32846061.
68. Bradford D, Larkins E, Mushti SL, Rodriguez L, Skinner AM, Helms WS, Price LSL, Zirkelbach JF, Li Y, Liu J, Charlab R, Turcu FR, Liang D, Ghosh S, Roscoe D, Philip R, Zack-Taylor A, Tang S, Kluetz PG, Beaver JA, Pazdur R, Theoret MR, Singh H. FDA Approval Summary: Selpercatinib for the Treatment of Lung and Thyroid Cancers with *RET* Gene Mutations or Fusions. *Clin Cancer Res*. 2021 Apr 15;27(8):2130-2135. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3558. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33239432.
69. Papewalis C, Wuttke M, Jacobs B, Domberg J, Willenberg H, Baehring T, Cupisti K, Raffel A, Chao L, Fenk R, Seissler J, Scherbaum WA, Schott M. Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res*. 2008 Feb;40(2):108-16. doi: 10.1055/s-2007-1022565. PMID: 18283628.
70. Chatal JF, Champion L, Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Vuillez JP, Charbonnel B, Rohmer V, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM, Barbet J; French Endocrine Tumor Group. Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine

- Tumor Group. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 10;24(11):1705-11. doi: 10.1200/JCO.2005.04.4917. Epub 2006 Mar 20. PMID: 16549819.
71. Salavati A, Puranik A, Kulkarni HR, Budiawan H, Baum RP. Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) of Medullary and Nonmedullary Thyroid Cancer Using Radiolabeled Somatostatin Analogues. *Semin Nucl Med*. 2016 May;46(3):215-24. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.01.010. PMID: 27067502.
  72. Romero-Lluch AR, Cuenca-Cuenca JI, Guerrero-Vázquez R, Martínez-Ortega AJ, Tirado-Hospital JL, Borrego-Dorado I, Navarro-González E. Diagnostic utility of PET/CT with <sup>18</sup>F-DOPA and <sup>18</sup>F-FDG in persistent or recurrent medullary thyroid carcinoma: the importance of calcitonin and carcinoembryonic antigen cutoff. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017 Nov;44(12):2004-2013. doi: 10.1007/s00259-017-3759-4. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28646462.
  73. Uhrig M, Delorme S. Bildgebung beim medullären Schilddrüsenkarzinom [Imaging of medullary thyroid carcinoma]. *Radiologe*. 2019 Nov;59(11):992-1001. German. doi: 10.1007/s00117-019-0575-9. PMID: 31367891.
  74. Ciampi R, Romei C, Ramone T, Prete A, Tacito A, Cappagli V, Bottici V, Viola D, Torregrossa L, Ugolini C, Basolo F, Elisei R. Genetic Landscape of Somatic Mutations in a Large Cohort of Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas Studied by Next-Generation Targeted Sequencing. *iScience*. 2019 Oct 25;20:324-336. doi: 10.1016/j.isci.2019.09.030. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31605946; PMCID: PMC6817656.
  75. Minna E, Romeo P, Dugo M, De Cecco L, Aiello A, Pistore F, Carenzo A, Greco A, Borrello MG. Medullary Thyroid Carcinoma Mutational Spectrum Update and Signaling-Type Inference by Transcriptional Profiles: Literature Meta-Analysis and Study of Tumor Samples. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 13;14(8):1951. doi: 10.3390/cancers14081951. PMID: 35454858; PMCID: PMC9028774.
  76. Sponziello M, Durante C, Boichard A, Dima M, Puppini C, Verrienti A, Tamburrano G, Di Rocco G, Redler A, Lacroix L, Bidart JM, Schlumberger M, Damante G, Russo D, Filetti S. Epigenetic-related gene expression profile in medullary thyroid cancer revealed the overexpression of the histone methyltransferases EZH2 and SMYD3 in aggressive tumours. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jul 5;392(1-2):8-13. doi: 10.1016/j.mce.2014.04.016. Epub 2014 May 9. PMID: 24813658.
  77. Mian C, Pennelli G, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, Galuppini F, Pizzi M, Vianello F, Pelizzo MR, Girelli ME, Rugge M,

- Opocher G. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid*. 2012 Sep;22(9):890-6. doi: 10.1089/thy.2012.0045. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22747440; PMCID: PMC3429275.
78. Abraham D, Jackson N, Gundara JS, Zhao J, Gill AJ, Delbridge L, Robinson BG, Sidhu SB. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 15;17(14):4772-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0242. Epub 2011 May 27. PMID: 21622722.
79. Vuong HG, Odate T, Ngo HTT, Pham TQ, Tran TTK, Mochizuki K, Nakazawa T, Katoh R, Kondo T. Clinical significance of RET and RAS mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Jun;25(6):633-641. doi: 10.1530/ERC-18-0056. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29615431.
80. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, Bugalho MJ, Leite V. Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 2009 Jun 2;100(11):1777-83. doi: 10.1038/sj.bjc.6605056. Epub 2009 Apr 28. PMID: 19401695; PMCID: PMC2695700.