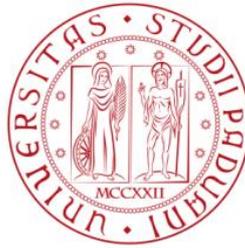


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



*Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia*

*Dipartimento di Medicina; Direttore: Prof. Roberto Vettor*

*U. O. C. di Endocrinologia; Responsabile: Prof.ssa Carla Scaroni*

## **TESI DI LAUREA**

# **LIVELLI DI CALCITONINA CIRCOLANTE NEI PAZIENTI CON IPERGASTRINEMIA SECONDARIA A GASTRITE AUTOIMMUNE**

RELATORE: Ch.ma Prof.ssa Caterina Mian

CORRELATORI: Dott.ssa Simona Censi

Dott.ssa Sofia Carducci

Laureando: Matteo Fiscato

Anno Accademico: 2021/2022



# INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b> .....	1
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	5
<b>2.1 Calcitonina e carcinoma midollare della tiroide</b> .....	5
2.1.1 <i>Generalità del MTC, forme sporadiche ed ereditarie</i> .....	5
2.1.2 <i>Prognosi e sopravvivenza MTC e suo trattamento</i> .....	6
2.1.3 <i>Genetica del MTC ereditario</i> .....	7
<b>2.1.4 Diagnosi di MTC sporadico e ruolo del dosaggio della calcitonina</b> .....	9
2.1.5 <i>Fattori fisiologici e patologici che influenzano i livelli di calcitonina sierica</i> .....	11
<b>2.2 Relazione tra ipergastrinemia in gastrite cronica autoimmune e calcitonina</b> .....	14
2.2.1 <i>Fisiologia della gastrina</i> .....	14
2.2.2 <i>Relazione tra gastrina e calcitonina</i> .....	15
2.2.3 <i>Generalità e patogenesi della gastrite cronica autoimmune</i> .....	16
2.2.4 <i>Diagnosi di GAI</i> .....	17
2.2.5 <i>Cromogranina A e GAI</i> .....	19
2.2.6 <i>GAI e livelli di calcitonina</i> .....	20
<b>3.1 Calcitonina e tiroidite di Hashimoto</b> .....	22
3.1.1 <i>Tiroidite di Hashimoto: generalità</i> .....	22
3.1.2 <i>Diagnosi di TH</i> .....	23
3.2.3 <i>Relazione tra tiroidite di Hashimoto e livelli di calcitonina</i> .....	25
<b>3. SCOPO DELLA TESI</b> .....	28
<b>4. PAZIENTI E METODI</b> .....	29
<b>4.1 Pazienti studiati</b> .....	29
<b>4.2 Analisi di laboratorio e strumentali</b> .....	30
<b>4.3 Analisi statistica</b> .....	31
<b>5. RISULTATI</b> .....	32
<b>5.1 Descrizione della popolazione dei tre gruppi di studio</b> .....	32
<b>5.2. Valutazione dei livelli sierici di gastrina totale, calcitonina e cromogranina A e loro correlazioni</b> ..	33
5.2.1. <i>Valutazione della gastrina totale sierica</i> .....	33
5.2.2. <i>Valutazione della calcitonina sierica e correlazione tra livelli di gastrina totale e calcitonina sieriche</i> .....	35
5.2.3. <i>Descrizione pazienti con calcitonina aumentata e ipergastrinemia</i> .....	36
5.2.4 <i>Descrizione pazienti con calcitonina aumentata e gastrina normale</i> .....	39
5.2.5 <i>Correlazione della cromogranina A con gastrina e calcitonina</i> .....	40
5.2.6 <i>Pazienti con tumore neuroendocrino (NET) gastrico e livelli di calcitonina</i> .....	42

5.2.7 <i>Correlazione tra calcitonina e tiroidite autoimmune</i> .....	42
<b>6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	44
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	51

## 1. RIASSUNTO

**Presupposti dello studio:** La calcitonina è un eccellente marcatore tumorale del carcinoma midollare della tiroide (MTC). Rende possibile una diagnosi precoce di MTC con aumento della sopravvivenza. È un marcatore molto sensibile tuttavia la sua specificità è bassa: diverse condizioni fisiologiche e patologiche sono state associate ad un aumento dei livelli di calcitonina, tra le quali sono spesso citate la tiroidite cronica e l'ipergastrinemia cronica (come quella in corso di gastrite cronica autoimmune (GAI)). Tuttavia, in Letteratura gli studi in merito sono pochi e caratterizzati da una bassa numerosità di pazienti. Inoltre, mentre è stato dimostrato che un'ipergastrinemia acuta, sia *in-vitro* che *in-vivo* rappresenta uno stimolo per la secrezione di calcitonina, l'effetto di un'ipergastrinemia cronica sull'uomo è ancora da dimostrare.

**Scopo dello studio:** Scopi dello studio sono: 1) valutare i livelli di calcitonina sierica in pazienti con ipergastrinemia cronica secondaria a GAI; 2) verificare se l'ipergastrinemia cronica nei pazienti con GAI sia associata ad un aumento dei valori di calcitonina sierica; 3) valutare i livelli di calcitonina sierica nei pazienti con TH, con GAI e senza GAI; 4) verificare se la presenza di TH sia associata ad un aumento dei valori di calcitonina sierica.

**Pazienti e metodi:** Abbiamo condotto uno studio retrospettivo multicentrico, arruolando consecutivamente 142 pazienti distinti in tre gruppi: gruppo A comprendente pazienti con diagnosi istologica di GAI (n=13, 11 uomini, 2 donne), gruppo B comprendente pazienti con diagnosi istologica di GAI e tiroidite autoimmune (n=92, 15 uomini, 77 donne) e gruppo C comprendente pazienti con tiroidite autoimmune senza GAI (n=37, 6 uomini e 31 donne). I criteri di esclusione erano: 1) età minore di 18 anni 2) presenza di insufficienza renale, iperparatiroidismo o tumore al polmone 3) rifiuto di dare il consenso informato allo studio. In tutti i pazienti è stata dosata la calcitonina e la gastrina sieriche.

**Risultati:** I livelli mediani di calcitonina non sono risultati diversi nei tre gruppi, con un valore mediano di 1 ng/L in tutti e tre i gruppi ( $p=0,1$ ), nonostante i valori di gastrina fossero elevati nel gruppo A e B e normali nel gruppo C, con valori mediani di 584,2 pmol/L (range interquartile, IQR 457,3 - 715,5 pmol/L), 540,0 pmol/L (243,3 - 736,4 pmol/L), 23,0 pmol/L (IQR 16,8 - 33,1 pmol/L) nel gruppo A, B e C, rispettivamente ( $p<0,001$ ). La calcitonina è risultata nel gruppo A, B, C rispettivamente: non dosabile in 8/13 (61,5%), 70/92 (76,1%) e 27/37 (73,0%); dosabile ma  $<10$  ng/L in 4/13 (30,8%), 20/92 (21,7%) e 8/37 (21,6%); e  $> 10$  ng/L in 1/13 (7,7%), 2/92 (2,2%) e 2/37 (5,4%) ( $p=0,1$ ). Solo tre pazienti hanno presentato elevati livelli di calcitonina ( $>10$  ng/L) ed elevati livelli di gastrina: questi pazienti presentavano una patologia nodulare tiroidea e sono stati sottoposti a test con calcio gluconato che è risultato compatibile con MTC. I pazienti sono stati sottoposti a intervento chirurgico e l'esame istologico ha confermato la diagnosi di MTC. Non è stata trovata una correlazione tra calcitonina e gastrina sia considerandole come variabili quantitative ( $p=0,27$ ,  $R=0,09$  secondo la correlazione per ranghi di Spearman) che categoriche ( $p=0,52$ ). Non è stata trovata una correlazione tra calcitonina e l'essere affetti da TH ( $p=0,79$ ). I livelli mediani sono risultati uguali nel gruppo di pazienti affetti da TH (gruppo B e C) e nel gruppo di pazienti affetti solo da GAI (gruppo A), con un valore di 1,0 ng/L.

**Conclusioni:** In questo studio, condotto su un numero rilevante di pazienti con diagnosi istologica di GAI e TH, è stato dimostrato che né l'ipergastrinemia cronica secondaria a GAI né la tiroidite autoimmune sono correlate ad un aumento della calcitonina sierica. Pertanto, nella valutazione di un paziente con GAI o TH, l'aumento della calcitonina non può essere attribuito alla presenza di queste patologie e va sempre indagata la presenza di un MTC per consentire una diagnosi precoce e un trattamento adeguato.

## 1. ABSTRACT

**Background:** calcitonin is an excellent tumor marker of medullary thyroid carcinoma (MTC). It makes early diagnosis of MTC possible with increased overall survival. It is a very sensitive marker however, its specificity is low: several physiological and pathological conditions have been associated with increased calcitonin levels, among which are often cited chronic thyroiditis and chronic hypergastrinemia, like those related to chronic autoimmune gastritis (GAI). However, there are few studies in Literature on this subject, characterized by low patient numbers. Furthermore, while an acute hypergastrinemia has been proven, both in-vitro and in-vivo, to represent a stimulus for calcitonin secretion, the effect of chronic hypergastrinemia on humans has still to be demonstrated.

**The objective of the study:** The aims of the study are 1) to evaluate serum calcitonin levels in patients with chronic hypergastrinemia secondary to GAI; 2) to verify whether chronic hypergastrinemia in patients with GAI is associated with increased serum calcitonin values; 3) to evaluate serum calcitonin levels in patients with TH, with GAI and without GAI; 4) to verify whether the presence of TH is associated with increased serum calcitonin values.

**Patients and methods:** We conducted a multicentric retrospective study, consecutively enrolling 142 patients divided into three groups: group A including patients with a histological diagnosis of GAI (n=13, 11 men, 2 women), group B including patients with a histological diagnosis of GAI and autoimmune thyroiditis (n=92, 15 men, 77 women) and group C including patients with autoimmune thyroiditis without GAI (n=37, 6 men and 31 women). Exclusion criteria were; 1) age less than 18 years 2) presence of renal failure, hyperparathyroidism or lung cancer 3) refuse to give the informed consent to the study. Serum calcitonin and gastrin were assayed in all patients.

**Results:** Calcitonin median levels did not differ in the three groups, being its median value equal to 1,0 ng/L in all three groups ( $p=0,1$ ), although gastrin values were high in groups A and B and normal in group C, being its median values equal

to 584,2 pmol/L (interquartile range, IQR 457,3 - 715,5 pmol/L), 540,0 pmol/L (243,3 - 736,4 pmol/L), 23,0 pmol/L (IQR 16,8 - 33,1 pmol/L) in group A, B and C respectively ( $p < 0,001$ ). Calcitonin resulted in group A, B, C respectively: undetectable in 8/13 (61,5%), 70/92 (76,1%) and 27/37 (73,0%); detectable but  $< 10$  ng/L in 4/13 (30,8%), 20/92 (21,7%) and 8/37 (21,6%); and  $> 10$  ng/L in 1/13 (7,7%), 2/92 (2,2%) and 2/37 (5,4%) ( $p = 0,1$ ). Only three patients had high calcitonin levels ( $> 10$  ng/L) and elevated gastrin levels: these patients carried a nodular thyroid disease and underwent calcium gluconate testing which resulted consistent with MTC. The patients underwent surgery, and histological examination confirmed the diagnosis of MTC. No correlation was found between calcitonin and gastrin either considering them as quantitative variables ( $p = 0,27$ ,  $R = 0,09$  at Spearman's rank correlation test) or categorical variables ( $p = 0,52$ ). No correlation was found between calcitonin and being affected by TH ( $p = 0,79$ ). The median levels were the same in the group of patients with TH (group B and C) and the group of patients with only GAI (group A), being its median value equal to 1,0 ng/L.

**Conclusions:** In this study, conducted on a relevant number of patients with histological diagnosis of GAI and TH, it was shown that neither chronic hypergastrinemia secondary to GAI nor autoimmune thyroiditis correlated with an increase in serum calcitonin. Therefore, in the evaluation of a patient with GAI or TH, increased calcitonin cannot be attributed to the presence of these diseases, and the presence of a MTC should always be investigated to enable early diagnosis and appropriate treatment.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Calcitonina e carcinoma midollare della tiroide

La calcitonina è un ormone peptidico, secreto dalle cellule C della tiroide. Agisce inibendo il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti e stimolando la clearance renale di calcio. Possiede azioni antagoniste al PTH sul metabolismo del calcio, tuttavia nell'uomo ha un ruolo fisiologico limitato. La calcitonina ha invece un importante significato clinico come marcatore tumorale nei casi sporadici ed ereditari di carcinoma midollare della tiroide (*medullary thyroid carcinoma*, MTC).<sup>1</sup>

#### 2.1.1 Generalità del MTC, forme sporadiche ed ereditarie

Il MTC è una neoplasia neuroendocrina rara che origina dalle cellule C della tiroide, di cui mantiene le caratteristiche biologiche. Rappresenta uno dei quattro istotipi di carcinoma tiroideo, i quali sono: papillare (*papillary thyroid carcinoma*, PTC), follicolare (*follicular thyroid carcinoma*, FTC), midollare (MTC) e anaplastico (*anaplastic thyroid carcinoma*, ATC). La grande maggioranza dei carcinomi tiroidei (>90%) sono papillari o follicolari e appartengono alla famiglia dei carcinomi differenziati (*differentiated thyroid carcinoma*, DTC)<sup>2</sup> mentre il MTC rappresenta circa solo il 3-5% delle neoplasie tiroidee. L'80% dei casi di MTC è rappresentato da forme sporadiche, il restante 20% da forme ereditarie nel contesto della sindrome tumorale endocrina autosomica dominante MEN2, in cui è mutato a livello germinale il proto-oncogene *RET*, che codifica per un recettore transmembrana tirosin-chinasico.<sup>3</sup> Queste forme ereditarie si associano ad altre malattie endocrine come feocromocitoma e iperparatiroidismo primario secondario ad adenoma/ipertrofia delle ghiandole paratiroidi.<sup>4</sup> In particolare si distinguono tre tipi di MEN2: MEN2A, MEN2B e MTC familiare (FMTC). MEN2A è caratterizzata dall'associazione tra MTC e feocromocitoma, ipertrofia o adenoma delle paratiroidi, lichen cutaneo, amiloidosi e raramente è presente anche la

malattia di Hirschprung. MEN2B si identifica invece per la presenza di MTC e feocromocitoma, iperparatiroidismo primario, un habitus marfanoide, neuromi mucosi, fibre nervose corneali e una disfunzione dei gangli autonomici intestinali che può portare a megacolon. Nel FMTC il cancro midollare della tiroide è isolato.<sup>5-7</sup> L'FMTC, inizialmente descritto come un'entità a sé stante distinta da MEN2A e MEN2B, viene più recentemente considerato come una variante di MEN2A in cui non si sono associati né feocromocitoma né iperplasia delle paratiroidi.<sup>3,8</sup>

L'età di insorgenza media del MTC è tra i 40 e 50 anni, con una presentazione più precoce nelle forme ereditarie rispetto alle sporadiche. Non è stata riscontrata nessuna differenza di genere nella prevalenza del MTC.<sup>9-11</sup>

### *2.1.2 Prognosi e sopravvivenza MTC e suo trattamento*

Rispetto agli altri tumori della tiroide, la prognosi del carcinoma midollare è intermedia tra le forme differenziate follicolari (DTC), a prognosi più favorevole, e il tumore anaplastico, a prognosi più infausta.<sup>9,12</sup> La peggior prognosi rispetto agli altri tumori differenziati della tiroide dipende dal suo comportamento biologico più aggressivo. Infatti, già in fase precoce quando il tumore è di dimensioni ancora ridotte, tende a diffondersi ai linfonodi e agli organi a distanza, per questo motivo per aumentare le possibilità di guarigione è fondamentale una diagnosi precoce.<sup>13,14</sup> La sopravvivenza a 10 anni, a seconda delle casistiche di diversi studi, varia tra il 67 e l'88%.<sup>9,11,12,15</sup> Il principale fattore prognostico per la sopravvivenza è lo stadio della malattia, che dipende strettamente da una diagnosi precoce in grado di individuare il tumore quando è ancora confinato alla tiroide senza interessamento linfonodale o metastasi a distanza.<sup>12</sup> Nello studio di Kebebew et al. infatti, si è mostrato come la sopravvivenza a 5 anni nello stadio I fosse del 100%, per ridursi invece drammaticamente al 55% nello stadio IV.<sup>9</sup> Il trattamento standard del carcinoma midollare della tiroide, sia nella forma sporadica che ereditaria, prevede una tiroidectomia totale e una linfadenectomia cervicale profilattica del compartimento centrale.<sup>3</sup> I casi ereditari presentano un miglior outcome, poiché attraverso lo screening genetico per mutazioni del proto-

oncogene RET, possono essere trattati in una fase pre-clinica, quando il tumore è microscopico e confinato alla tiroide o assente con una chirurgia profilattica.<sup>16,17</sup>

### *2.1.3 Genetica del MTC ereditario*

Ci sono diversi tipi di mutazioni, il gene RET si trova nel cromosoma 10 ed è costituito da 21 esoni. In MEN2A, nel 95% dei casi si trovano mutazioni nei codoni 609, 611, 618, 620 dell'esone 10 e nel codone 634 dell'esone 11. In pazienti con mutazioni nel codone 634 l'MTC presenta un'età di insorgenza più precoce e un decorso clinico più aggressivo rispetto alle altre mutazioni. In MEN2B il 95% delle mutazioni interessa il codone 918 dell'esone 16, con sostituzione di una metionina con una treonina, nei restanti casi la mutazione si trova nel codone 883 dell'esone 15. In casi di FMTC le mutazioni si possono trovare negli esoni 10 e 11, nell'esone 13 (codone 768) e nell'esone 14 (codoni 804 e 806).<sup>5,6,8</sup> Le linee guida dell'American Thyroid association (ATA) dividono queste mutazioni in tre diversi gruppi:

1. Highest risk (HST) che include i pazienti con MEN2B e la mutazione del codone 918 dell'esone 16
2. High risk (H) che include pazienti con mutazione del codone 634 dell'esone 11 e la mutazione del codone 883 dell'esone 15
3. Moderate risk (MOD) che include pazienti con MTC ereditario e mutazioni diverse dalle precedenti

Nella Tabella I sono elencate le più comuni mutazioni di RET con il relativo rischio di sviluppo di MTC.

**Tabella 1.** Rapporto tra le comuni mutazioni di RET e l'aggressività del MTC in MEN2A e MEN2B.<sup>3</sup>

<b>Mutazione</b>	<b>di</b>	<b>Esone</b>	<b>Livello</b>	<b>di</b>
<b>RET<sup>a</sup></b>			<b>rischio</b>	<b>di</b>
			<b>MTC</b>	
G533C	8		MOD	
C609F/G/R/S/Y	10		MOD	
C611F/G/S/Y/W	10		MOD	
C618F/R/S	10		MOD	
C620F/R/S	10		MOD	
C630R/Y	11		MOD	
D631Y	11		MOD	
C634F/G/R/S/W/Y	11		H	
K666E	11		MOD	
E768D	13		MOD	
L790F	13		MOD	
V804L	14		MOD	
V804M	14		MOD	
A883F	15		H	
S891A	15		MOD	
R912P	16		MOD	
M918T	16		HST	

<sup>a</sup>Rischio di MTC aggressivo: MOD, moderato; H, alto; HST, molto alto

Le linee guida suggeriscono un diverso timing della tiroidectomia nei bambini a seconda del grado di rischio della mutazione. Bambini nella categoria ATA-HST dovrebbero andare incontro a tiroidectomia nei primi mesi, entro l'anno di vita,

i bambini nella categoria ATA-H a 5 anni o prima se si riscontra un aumento di calcitonina, infine bambini nella categoria ATA-MOD dovrebbero iniziare un controllo con esame obiettivo, ecografia e dosaggio della calcitonina a 5 anni e andare incontro a tiroidectomia quando si rilevano aumenti della calcitonina.<sup>3</sup>

#### **2.1.4 Diagnosi di MTC sporadico e ruolo del dosaggio della calcitonina**

I casi sporadici, che rappresentano la gran parte dei carcinomi midollari, invece, vengono spesso diagnosticati quando vi è già stata un'invasione linfonodale o una disseminazione a distanza. La più comune forma di presentazione dei casi sporadici è attraverso il riscontro di un nodulo tiroideo, singolo o nel contesto di un gozzo multinodulare, senza il riscontro di sintomi specifici. In questi casi gli strumenti diagnostici fondamentali sono l'esame obiettivo, l'ecografia del collo (US) e un esame citologico attraverso agoaspirato (Fine Needle Aspiration Cytology, FNAC).<sup>18</sup> Il pattern citologico tipico del carcinoma midollare è a cellule disperse, di forma poligonale o triangolare, con granuli citoplasmatici azzurrofilii, nuclei eccentrici con cromatina granulare e presenza di amiloide. Nessuna di queste caratteristiche però è patognomonica e inoltre talvolta le cellule possono organizzarsi in clusters follicolari che ricordano neoplasie tiroidee follicolari.<sup>19,20</sup> Da metanalisi in letteratura emerge che la capacità dell'esame citologico di individuare correttamente i casi di MTC sia appena del 56%, i rimanenti casi di MTC sono diagnosticati all'analisi citologica come benigni, indeterminati, non diagnostici o altri tipi di neoplasie come il carcinoma follicolare o desmoide.<sup>21</sup> Elisei et al. ha riportato che di 44 casi di MTC solo 20 presentavano una citologia sospetta per questa neoplasia (sensibilità del 45%). Questo perché le caratteristiche tipiche del tumore possono sfuggire agli strisci citologici processati con le tecniche standard, inoltre i depositi di amiloide che possono aiutare nella diagnosi risultano piuttosto rari.<sup>22</sup> Un ampio studio multicentrico di Essig et al. ha raccolto 313 casi di MTC da 12 istituti in 29 anni, di questi 245 sono andati incontro

a FNAC e solo 112 (45,7%) sono stati correttamente diagnosticati come MTC o possibili MTC.<sup>23</sup>

Poiché la FNAC è in grado di diagnosticare solo poco più della metà dei casi di carcinoma midollare e poiché questa neoplasia necessita di una diagnosi e di un trattamento precoce, si rendono necessari altre tecniche e specifici approcci in combinazione al FNAC per evitare falsi negativi e per diagnosticare correttamente i casi di MTC.<sup>21</sup>

Il dosaggio della calcitonina in questi pazienti riveste un ruolo fondamentale. È stato dimostrato che il dosaggio di routine della calcitonina circolante nei pazienti con nodulo tiroideo possa portare ad una diagnosi precoce di MTC e di conseguenza ad un aumento dell'overall survival. Ad oggi la calcitonina sierica è il marcatore più specifico e sensibile di MTC<sup>13,22,24-26</sup> Nello studio di Pacini et al. è stata dosata la calcitonina sierica in 1385 pazienti che presentavano un nodulo tiroideo, questo ha permesso il riconoscimento e trattamento di 8 MTC sporadici. Di questi solo 3 sulla base dei soli dati del FNAC sarebbero stati sottoposti a chirurgia e almeno 3 pazienti con MTC avrebbero ricevuto solo terapia medica sulla base di un FNAC con citologia benigna. Lo studio mostra come il dosaggio della calcitonina sia superiore al solo agoaspirato nel riconoscimento del MTC.<sup>24</sup> Analoghi risultati sulla maggior sensibilità del dosaggio della calcitonina rispetto al FNAC sono stati riscontrati in altri studi. Nello studio di Elisei et al. è stata dosata la calcitonina circolante su 10864 pazienti con patologia nodulare tiroidea, 44 hanno presentato una calcitonina sierica basale elevata. Questi pazienti sono stati tutti sottoposti a tiroidectomia totale e linfadenectomia del compartimento centrale cervicale. L'istologia ha evidenziato la presenza di MTC in tutti i casi, ma al FNAC il 25% dei casi era suggestivo di lesione benigna e nel 9% dei casi il campione era inadeguato. Basandosi solo sui risultati del FNAC il 34% dei pazienti con MTC non avrebbe ricevuto la corretta diagnosi di neoplasia maligna e non sarebbe andato incontro a tiroidectomia. Questi pazienti diagnosticati con lo screening della calcitonina sono stati poi confrontati con un gruppo di pazienti diagnosticati solamente con metodi convenzionali in anni precedenti. Questo ha

permesso di evidenziare che i pazienti sottoposti a dosaggio di calcitonina sierica avevano uno stadio di MTC meno avanzato e sia la normalizzazione post-operatoria della calcitonina che l'outcome a lungo termine erano significativamente migliori rispetto ai pazienti non sottoposti a tale screening. Un'ipotesi è che l'aumento dell'accuratezza diagnostica pre-operatoria di MTC permetta la diagnosi di MTC a stadi precoci, portando il chirurgo all'esecuzione di una chirurgia più radicale, fondamentale per ottenere un trattamento definitivo.<sup>22</sup> In conseguenza a tali evidenze, nel 2007 l'European Thyroid Association (ETA) in una Consensus sulla gestione dei pazienti con DTC ha raccomandato il dosaggio della calcitonina sierica nella valutazione diagnostica iniziale dei noduli tiroidei.<sup>27</sup> È stato dimostrato che elevati livelli basali di calcitonina sierica sono diagnostici di MTC.<sup>28,29</sup> Nello studio di Costante et al., condotto su una coorte di 5817 pazienti, valori di calcitonina superiori a 100 pg/ml hanno dimostrato un valore predittivo positivo per MTC del 100%, in questo caso il rischio di MTC è stato definito estremamente elevato. Valori tra 50 e 100 pg/ml comportano un rischio moderato con valore predittivo positivo del 25% e valori tra 20 e 50 pg/ml un rischio basso con valore predittivo positivo del 8,3%. (Tabella II).<sup>14</sup>

**Tabella II.** Valori di calcitonina e rischio di carcinoma midollare della tiroide secondo i dati di Costante et al.

Valore (pg/ml)	Rischio di MTC
>100	Estremamente alto (100%)
≥ 50 e <100	Moderato (25%)
≥ 20 e <50	Basso (8,3%)

#### *2.1.5 Fattori fisiologici e patologici che influenzano i livelli di calcitonina sierica*

La calcitonina, tuttavia, pur essendo un marcatore molto sensibile, non è molto specifico. Infatti, è stato dimostrato come ci siano diverse condizioni fisiologiche e patologiche in cui si riscontra un aumento dei livelli di calcitonina sierica. In caso

di valori di calcitonina sierica compresi tra 10 e 100 pg/ml devo attentamente prendere in considerazione l'eventuale presenza di queste condizioni.<sup>30</sup>

Le condizioni che sono state associate ad aumentati valori di calcitonina sierica possono essere suddivise in:

1. condizioni fisiologiche
2. patologie non tiroidee
3. patologie tiroidee
4. uso di farmaci.

#### 1. Condizioni fisiologiche

Le condizioni fisiologiche comprendono il genere, l'età, il body max index (BMI) e l'attività fisica. In particolare, le donne sembrano presentare dei livelli basali di calcitonina più bassi rispetto agli uomini, di un rapporto di circa uno a due. Nello studio post-mortem di Guyetant et al. è stata dimostrata la presenza di un numero doppio di cellule C negli uomini rispetto alle donne.<sup>31</sup>

Correlazioni positive con aumento della calcitonina, anche se meno forti, sono presenti anche per età e BMI, soprattutto negli uomini. Livelli di calcitonina lievemente aumentati sembrano essere correlati anche al fumo di sigaretta. L'attività fisica infine sembra aumentare la secrezione di calcitonina nel periodo post-esercizio.<sup>32,33</sup>

#### 2. Patologie non tiroidee

In pazienti con insufficienza renale cronica si è riscontrato un aumento della concentrazione di calcitonina; la fisiopatologia non è chiara, potrebbe essere causata da una diminuita clearance renale della calcitonina<sup>34</sup> o per la presenza di un iperparatiroidismo terziario con conseguente ipercalcemia.<sup>35</sup> Niccoli et al. in uno studio ha riscontrato un aumento dei livelli di calcitonina nel 25% dei pazienti

dializzati, non trovando correlazioni significative con i valori di PTH e quindi con l'iperparatiroidismo. È stato suggerito che questo aumento possa essere dovuto al processo stesso della dialisi attraverso una pathway regolatoria ancora non definita.<sup>36</sup>

Infatti, il calcio è un forte secretagogo della calcitonina: il test al calcio gluconato, con la somministrazione di calcio gluconato alla dose di 25 mg/Kg di peso ideale alla velocità di 5-10 ml/min e il dosaggio di calcitonina ai tempi 0' 2' 5' 10' 20', viene utilizzato come test per valutare la concentrazione di calcitonina sotto stimolo e aiutare nella diagnosi di MTC. Condizioni che comportano un persistente aumento dei livelli di calcemia come nell'iperparatiroidismo primario o terziario potrebbero portare a livelli più elevati di calcitonina.<sup>30</sup>

Infine, le cellule tumorali di diversi tipi di neoplasie neuroendocrine possono produrre in modo ectopico calcitonina e aumentarne i livelli plasmatici. Valori aumentati di calcitonina sono stati riscontrati in pazienti con feocromocitoma, carcinoide gastrico, microcitoma polmonare e neoplasie pancreatiche neuroendocrine come insulinoma, glucagonoma, VIPomi.<sup>30,37-39</sup>

### 3. Patologie tiroidee

Il PTC e il FTC possono essere associati ad aumentati livelli di calcitonina circolante. Si è ipotizzato che le cellule tumorali rilascino delle sostanze con azione stimolante paracrina sulle cellule C.<sup>30,40</sup> Il ruolo della tiroidite di Hashimoto sui livelli di calcitonina è controverso: alcuni Autori ne hanno dimostrato una diminuzione, dal loro punto di vista secondaria all'insulto flogistico diretto anche verso le cellule C con un loro conseguente ridotto funzionamento. Una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di calcitonina è stata riscontrata nel gruppo di pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto, rispetto ai controlli sani.<sup>41-43</sup> Altri, nel 12,5-13% di pazienti con tiroidite, ne hanno rilevato un aumento<sup>44-46</sup>, altri infine non hanno documentato nessun cambiamento significativo rispetto al gruppo di controllo di pazienti sani.<sup>47</sup>

#### 4. Farmaci

Per diversi farmaci è stato descritto un aumento dei livelli sierici di calcitonina, come glucocorticoidi e beta-bloccanti e in particolare, l'uso cronico di inibitori di pompa protonica (PPI) sembra alzare i livelli di calcitonina sierica dopo 2-4 mesi di trattamento. I glucocorticoidi sembrano aumentare i livelli di calcitonina attraverso un aumento della trascrizione del gene della calcitonina con aumento dell'RNA del precursore.<sup>48</sup> Il meccanismo dei beta-bloccanti non è noto. I PPI possono indurre un'ipersecrezione di gastrina, che, per quanto riportato sopra, potrebbero di conseguenza comportare un aumento dei livelli di calcitonina.<sup>30,49,50</sup>

Per quanto riguarda le condizioni che potenzialmente possono dare alterazioni dei livelli di calcitonina, un tema dibattuto è il ruolo della gastrina, in particolare dell'ipergastrinemia presente nei pazienti con gastrite autoimmune.

### **2.2 Relazione tra ipergastrinemia in gastrite cronica autoimmune e calcitonina**

#### *2.2.1 Fisiologia della gastrina*

La gastrina è un ormone peptidico, composto da 17 e 34 amminoacidi nelle sue forme mature (gastrina 17 e 34). Viene prodotta e secreta per due terzi dalle cellule endocrine G a livello dell'antro gastrico e per un terzo dalle cellule endocrine G nella mucosa duodenale prossimale. Questo ormone ha molteplici azioni fisiologiche, tra cui la stimolazione della secrezione acida gastrica, l'intensificazione delle contrazioni peristaltiche a livello dell'antro pilorico ed è in grado di stimolare la proliferazione delle cellule gastriche epiteliali e di aumentare il numero di cellule parietali e di cellule enterocromaffini (ECL).<sup>51-54</sup>

Il suo ruolo principale è quello di stimolare la secrezione acida da parte delle cellule principali dello stomaco. La gastrina viene secreta in risposta all'ingestione di cibo o a stimoli vagali sulle cellule G e agisce stimolando la secrezione di istamina da parte delle cellule enterocromaffini. L'istamina poi va a stimolare la secrezione di acido cloridrico da parte delle cellule parietali; quindi, l'effetto della gastrina

sull'acidità è di tipo indiretto. Il rilascio di gastrina è regolato anche da un feedback negativo dato dall'acidità presente nello stomaco: l'acido nel lume gastrico reprime la secrezione di gastrina mentre la mancanza di acidità ne stimola la secrezione.<sup>55,56</sup> Per questo motivo, condizioni in cui si ha una riduzione dell'acidità gastrica possono far aumentare i livelli di gastrina, venendo a mancare il meccanismo di feedback negativo dato dall'acidità. Le condizioni di ipocloridria comprendono la gastrite autoimmune e anemia perniziosa, utilizzo cronico di PPI o antagonisti dei recettori H2 dell'istamina.<sup>57-60</sup>

### *2.2.2 Relazione tra gastrina e calcitonina*

Studi in vivo e in vitro hanno mostrato come, in acuto, la gastrina sia in grado di stimolare la sintesi e la secrezione di calcitonina.<sup>61-63</sup> Al contrario, nell'uomo, l'effetto di un'ipergastrinemia cronica sui livelli di calcitonina sierica è ancora da dimostrare e da chiarire.

Nello studio di Care et al. del 1971 è stata infusa pentagastrina in tiroidi porcine. La pentagastrina è un tetrapeptide C-terminale sintetico della gastrina e media gli stessi effetti biologici della gastrina. L'infusione di pentagastrina ha determinato un aumento della secrezione di calcitonina dalla ghiandola tiroidea dei maiali, evidenziando una relazione biologica tra gastrina e calcitonina.<sup>62</sup> La somministrazione di pentagastrina si è dimostrata alzare i livelli di calcitonina anche nell'uomo. Nello studio di Hennessy et al. l'infusione di pentagastrina in pazienti affetti da MTC ha mostrato un rapido aumento dei valori di calcitonina, con un aumento medio del 500% rispetto ai valori basali.<sup>63</sup> Il marcato aumento della calcitonina in soggetti affetti da MTC sotto stimolo della pentagastrina ha reso il test con pentagastrina uno dei possibili strumenti diagnostici per la diagnosi di MTC in soggetti con nodulo tiroideo, soprattutto nei casi in cui si riscontrava solo un modesto aumento della calcitonina basale.<sup>14,64</sup>

Inoltre, nello studio di Parthemore et al. del 1978, si è dimostrato che la pentagastrina in acuto è in grado di aumentare i livelli di calcitonina anche in

pazienti sani, non affetti da MTC, dimostrando come la gastrina (in forma del suo derivato sintetico pentagastrina) sia un secretagogo della calcitonina.<sup>65</sup>

In Letteratura è riportato inoltre che l'ipergastrinemia possa essere una delle cause di iperplasia secondaria delle cellule C della tiroide (CCH reattiva), tuttavia i dati sono pochi e con bassa numerosità dei campioni.<sup>66-68</sup> La CCH reattiva è un'entità biologica e morfologica che va distinta dalla CCH pre-neoplastica che si osserva nelle forme familiari di MTC. La CCH reattiva si può riscontrare fisiologicamente in neonati e anziani, e in pazienti con ipertiroidismo, tiroidite di Hashimoto, precedente emitiroidectomia, neoplasie papillari e follicolari tiroidee e in linfomi non Hodgkin della tiroide. Lo studio di Perry et al. ha analizzato istologicamente 17 tiroidi da pazienti con evidenza di MTC familiare e 19 esempi di CCH fisiologico. I CCH neoplastici presentavano cluster di cellule con citologia atipica, ben riconoscibili all'esame istologico in ematossilina-eosina, nei CCH fisiologici, invece, le cellule iperplastiche non erano riconoscibili in ematossilina-eosina poiché la loro morfologia era simile a quella delle cellule follicolari e per il riconoscimento si è dovuti a ricorrere a metodiche immunoenzimatiche con calcitonina. Data la sua natura reattiva, il CCH secondario si ritiene essere una condizione reversibile, ben distinta dal CCH pre-neoplastico che invece progredisce in genere verso l'MTC.<sup>69</sup>

### *2.2.3 Generalità e patogenesi della gastrite cronica autoimmune*

Una nota condizione di ipergastrinemia cronica è la gastrite atrofica autoimmune (GAI). La GAI è una gastropatia rilevante dal punto di vista epidemiologico. Nella popolazione generale si stima una prevalenza del 2-5%.<sup>70</sup> È più frequente nelle donne rispetto agli uomini con un rapporto di circa 3:1, il picco di prevalenza lo si riscontra tra le donne con età superiore ai 60 anni.<sup>71</sup> Questa patologia si associa spesso ad altre malattie autoimmuni, come la tiroidite di Hashimoto, il diabete mellito di tipo 1, il morbo di Addison e la vitiligine.<sup>72-75</sup> In particolare la tiroidite di Hashimoto è presente fino al 40% dei pazienti con gastrite autoimmune, come rilevato in uno studio di Lahner et. al che ha valutato 401 pazienti con gastrite atrofica autoimmune, suggerendo la necessità di eseguire uno screening per

escludere la presenza di una malattia tiroidea in tutti i pazienti affetti da GAI.<sup>76</sup> La patogenesi della gastrite è di tipo autoimmune: vi è una deregolazione del sistema immunitario con sviluppo di linfociti T sensibilizzati e autoanticorpi diretti contro la parete gastrica (APCA, anti-parietal cells antibodies) e contro il fattore intrinseco (AFI). L'azione infiammatoria del sistema immunitario determina un danno tissutale, in particolare a livello della mucosa ossintica, a causa della distruzione anticorpo-mediata delle cellule parietali gastriche, gli anticorpi sono infatti rivolti specificatamente contro la pompa protonica  $H^+/K^+$ . La risposta immunitaria determina lo sviluppo di una risposta infiammatoria cronica a livello del corpo gastrico, invece, in assenza di una concomitante infezione da *H. pylori*, la mucosa dell'antro gastrico risulta risparmiata dal processo. A lungo andare il trigger infiammatorio porta allo sviluppo di atrofia ghiandolare con perdita di mucosa ossintica e genesi di metaplasia intestinale e pseudo-pilorica, con conseguente mancanza di acidità gastrica per ipo/acloridia. L'aumento del pH gastrico determina iperplasia delle cellule G e importante aumento della secrezione di gastrina con sviluppo di ipergastrinemia.<sup>58,70,77,78</sup>

#### *2.2.4 Diagnosi di GAI*

Il gold standard per la diagnosi è rappresentato dalla valutazione istologica delle biopsie della mucosa dell'antro e del corpo gastrico, ottenute in gastroscopia.<sup>79</sup> La valutazione istologica si avvale della stadiazione OLGA. Lo stadio della gastrite viene ottenuto combinando uno score istologico di estensione dell'atrofia con la localizzazione dell'atrofia identificata da biopsie multiple. Ad ogni biopsia dell'antro e del corpo viene dato uno score di atrofia da 1 a 4 a seconda del grado di atrofia delle ghiandole: nessun atrofia = 0%, score = 0; atrofia lieve = 1-30%, score = 1; atrofia moderata = 31-60%, score = 2; atrofia severa = >60%, score = 3. Dai singoli score delle biopsie dell'antro si ottiene uno score globale dell'antro, lo stesso viene fatto per il corpo. Combinando lo score globale dell'antro con lo score globale del corpo gastrico si ottiene lo stadio come mostrato nella tabella III.<sup>80,81</sup>

**Tabella III.** Stadiazione OLGA

Score di atrofia		CORPO			
		Nessuna atrofia (score 0)	Atrofia lieve (score 1)	Atrofia moderata (score 2)	Atrofia severa (score 3)
<b>A N T R O</b>	Nessuna atrofia (score 0)	Stadio 0	Stadio I	Stadio II	Stadio II
	Atrofia lieve (score 1)	Stadio I	Stadio I	Stadio II	Stadio II
	Atrofia moderata (score 2)	Stadio II	Stadio II	Stadio III	Stadio IV
	Atrofia severa (score 3)	Stadio III	Stadio III	Stadio IV	Stadio IV

È importante determinare lo stadio OLGA poiché è stata dimostrata una forte associazione tra gli stadi OLGA III e IV e la presenza di carcinoma gastrico, per cui la sorveglianza endoscopica dovrebbe porre maggiore attenzione su questi pazienti.<sup>80-82</sup>

Altri test meno invasivi possono aiutare ad indirizzare i pazienti alla gastroscopia. Il GastroPanel è un esame sierologico in cui si valutano i valori di gastrina-17, pepsinogeno I, pepsinogeno II e anticorpi IgG diretti contro *H. pylori*. La gastrina risulta elevata in caso di GAI, poiché viene prodotta dalle cellule dell'antro gastrico, risparmiato nella patologia. Il pepsinogeno I viene prodotto delle

ghiandole ossintiche del corpo mentre il pepsinogeno II dalle ghiandole di corpo, antro e duodeno. Quando il pepsinogeno I è basso o il rapporto tra pepsinogeno I e II è diminuito, si può sospettare una gastrite atrofica del corpo. Un ulteriore strumento diagnostico è la ricerca degli anticorpi contro le cellule parietali gastriche (APCA).<sup>79</sup> Gli APCA si possono riscontrare nell'85-90% dei pazienti con gastrite atrofica autoimmune; tuttavia, la loro presenza non è sufficiente per arrivare alla diagnosi poiché possono essere presenti in pazienti con altre malattie autoimmuni come tiroiditi e diabete mellito di tipo 1, e anche in soggetti sani senza che vi sia la patologia gastrica. Possono però utili per uno screening iniziale in pazienti a rischio.<sup>83</sup> Clinicamente la GAI non si presenta con segni o sintomi specifici, a meno che il grado di atrofia non porti alla diminuzione dell'assorbimento di vitamina B12. In questi casi si sviluppa un'anemia macrocitica, detta anemia perniziosa (PA). Si può sviluppare anche un ridotto assorbimento di altre sostanze come acido folico e ferro, che concorre al rischio di anemia.<sup>58</sup>

#### *2.2.5 Cromogranina A e GAI*

Le cromogranine sono proteine acide espresse nelle cellule neuroendocrine. Di questo gruppo fanno parte la cromogranina A, B e C. Fisiologicamente la gastrina stimola la crescita delle cellule enterocromaffini (ECL), cellule neuroendocrine presenti nella mucosa gastrica.<sup>54</sup> È stato osservato come i livelli di cromogranina A correlano fortemente con quelli della gastrina.<sup>73,84,85</sup> Stati di ipergastrinemia, come nella GAI, si associano a una iperplasia delle cellule ECL, attraverso diversi stadi l'iperplasia di queste cellule porta allo sviluppo di carcinoidi gastrici, tumori neuroendocrini la cui prevalenza è aumentata nei pazienti con GAI.<sup>85</sup> Tra le cromogranine, la cromogranina A risulta essere un buon marcatore plasmatico per i tumori neuroendocrini; infatti, incrementi significativi nella sua concentrazione mostrano una specificità dell'85-90% ed una sensibilità del 70-80% nel rilevarne la presenza.<sup>73</sup> Per questo motivo in aggiunta alla periodica sorveglianza endoscopica, nei pazienti con GAI la valutazione dei valori sierici di cromogranina

A può essere utile per la valutazione dell'iperplasia delle ECL e lo sviluppo di tumori neuroendocrini gastrici.<sup>73,85</sup>

#### *2.2.6 GAI e livelli di calcitonina*

In letteratura gli studi volti a definire una relazione tra ipergastrinemia cronica e i livelli di calcitonina sierica nei pazienti con gastrite autoimmune sono pochi. Si caratterizzano per una bassissima numerosità di pazienti coinvolti e nella maggior parte i dati sono precedenti al 1990, quando venivano usati metodi di dosaggio della calcitonina meno sensibili e specifici di quelli presenti oggi.

Alcuni studi non hanno trovato alcuna correlazione. Nello studio di Fahrengurg et al. del 1977 è stata dosata la gastrina totale e la calcitonina sierica in 13 pazienti con acloridria e anemia perniziosa, e in 10 controlli omogenei per genere ed età. La concentrazione di gastrina è risultata notevolmente più alta nei pazienti con PA rispetto ai controlli ma non si è rilevata nessuna differenza significativa tra i due gruppi per quanto riguarda la concentrazione della calcitonina.<sup>86</sup>

Lo studio di Becker et al. del 1980, invece, ha riscontrato un aumento della calcitonina sierica in 6 su 11 (55%) pazienti con anemia perniziosa. Tuttavia, non è stata riscontrata nessuna correlazione significativa tra i livelli sierici di calcitonina e gastrina, suggerendo che l'ipergastrinemia endogena non influenzi in modo diretto la calcitoninemia.<sup>87</sup>

Ulteriori risultati di questo tipo sono stati ottenuti da Brandsborg et al. nel 1980. Sono stati valutati 38 pazienti con anemia perniziosa, di cui 32 con ipergastrinemia, e 32 controlli sani. Anche in questo caso non si è riscontrata nessuna differenza significativa per i livelli di calcitonina tra i controlli e i pazienti con PA. Inoltre, non è stata riscontrata nessuna differenza nemmeno all'interno del gruppo di pazienti con PA tra quelli con ipergastrinemia e quelli con valori di gastrina normali.<sup>88</sup>

Anche lo studio di Heynen et al. che comprendeva 12 pazienti con PA non ha trovato correlazioni fisiopatologiche<sup>89</sup>: i pazienti con i valori più alti di gastrina non hanno presentato i valori più alti di calcitonina e viceversa. È stato inoltre

evidenziato che somministrando pentagastrina in modo acuto in pazienti sani i livelli di calcitonina subiscono un aumento, come già visto in altri studi<sup>65</sup>, ma che questo incremento non avviene per dosi più basse, suggerendo che la secrezione di calcitonina per opera della gastrina e del suo analogo sintetico pentagastrina sia un effetto farmacologico piuttosto che fisiologico.<sup>89</sup>

Risultati analoghi sono stati ottenuti dallo studio di Lamers et al. su 16 pazienti con ipergastrinemia secondaria ad acloridria. In questo caso i livelli di calcitonina basale non erano aumentati.<sup>90</sup>

Pertanto, questi studi antecedenti al 1990 o non hanno mostrato un aumento della calcitonina basale nei pazienti con gastrite atrofica rispetto ai controlli,<sup>86,88,90</sup> oppure hanno evidenziato un aumento della calcitoninemia in una certa percentuale di pazienti, ma senza nessuna correlazione con i livelli di gastrina.<sup>87,89</sup>

Uno studio successivo, di Erdogan et al. del 2006, ha valutati i livelli di calcitonina sierica basale e stimolata con pentagastrina in pazienti con PA e in terapia con soppressori dell'acidità gastrica (37 pazienti con GAI, 40 controlli sani e 25 pazienti in terapia con beta bloccanti o protettori gastrici (PPI), in quest'ultimo caso, con una durata media del trattamento di circa  $5.1 \pm 5.3$  mesi (deviazione standard, DS). Lo studio ha evidenziato come pur non essendoci una correlazione significativa tra calcitonina e gastrina, i pazienti con gastrina elevata avessero un livello medio di calcitonina più elevato. L'aumento della calcitonina era comunque lieve, con valori medi di  $13,7 \pm 9,8$  ng/L. A nostro avviso, questo risultato ha però il grande limite di essere stato ottenuto nella totalità dei pazienti, senza prendere in considerazione il loro gruppo di appartenenza, quindi considerando anche soggetti senza GAI, ma in terapia con PPI di breve termine, considerando la DS. I limiti di questo studio non lo rendono quindi esaustivo per rispondere alla domanda sul reale effetto fisiologico di un'ipergastrinemia cronica sui livelli di calcitonina.<sup>67</sup>

Nel complesso i dati in letteratura appaiono pochi e in parte controversi e pertanto ancora non permettono di definire con certezza la relazione positiva tra

ipergastrinemia cronica secondaria a gastrite autoimmune e l'aumento dei livelli di calcitonina circolante.

### **3.1 Calcitonina e tiroidite di Hashimoto**

#### *3.1.1 Tiroidite di Hashimoto: generalità*

Allo stesso modo, anche la relazione tra tiroidite autoimmune e calcitoninemia non è chiara. La tiroidite di Hashimoto (TH) o tiroidite autoimmune, è un'inflammatione cronica della ghiandola tiroide ed è considerata la più comune malattia autoimmune, il più comune disturbo endocrino e la causa più comune di ipotiroidismo.<sup>91</sup> L'incidenza di TH è di 0,3-1,5 casi per 100.000 abitanti all'anno, con una maggior frequenza nelle donne rispetto agli uomini, con un rapporto 4-10 volte superiore.<sup>92</sup> Nei pazienti affetti sono presenti degli auto-anticorpi circolanti, contro la tireoperossidasi (AbTPO) e contro la tireoglobulina (AbTg). Gli antiTPO sono presenti nel 95% dei pazienti affetti da TH e sono rari nei controlli sani. La sensibilità degli antiTg è invece minore, essendo presenti in solo il 60-80% dei pazienti con tiroidite. Sono anche meno specifici essendo presenti in un maggior numero di controlli sani rispetto agli antiTPO.<sup>91</sup> La TH è caratterizzata da un'infiltrazione linfoide della ghiandola, sia di linfociti B che T. Sia l'immunità umorale che quella cellulare hanno un ruolo nella patogenesi.<sup>93</sup> Istopatologicamente si riscontra un'importante infiltrazione linfocitaria della tiroide con formazione di centri germinali, atrofia dei follicoli, assenza di colloide e presenza di fibrosi, lieve o moderata.<sup>1</sup> L'ipotiroidismo è dovuto alla distruzione a cui va incontro la ghiandola.<sup>92</sup> La distruzione dei tireociti per citotossicità anticorpo- e cellulo-mediata porta a cambiamenti morfologici e microscopici della tiroide, tra cui un iniziale ingrandimento della tiroide, infiltrazione del parenchima da parte di cellule infiammatorie, proliferazione fibroblastica, calcificazioni e proliferazione vascolare. Questi cambiamenti sono alla base delle caratteristiche ecografiche della TH, e l'ecografia risulta uno strumento fondamentale nella

diagnosi. Le principali caratteristiche ecografiche sono: ipoecogenicità marcata, pseudonoduli e disomogeneità del parenchima. <sup>94</sup>

### *3.1.2 Diagnosi di TH*

La diagnosi di TH si ottiene ricercando la positività agli anticorpi antiTPO e antiTg, valutando i valori dell'ormone TSH, che se aumentato indica uno stato di ipotiroidismo, e le caratteristiche ecografiche della tiroide. <sup>95</sup>

Sono stati proposti da Fiore et. al dei criteri diagnostici per una diagnosi corretta, suddivisi in criteri maggiori e minori. La tabella IV riassume questi criteri, specificandone significato e limiti. Come criteri maggiori sono stati individuati: ipotiroidismo, evidenziato da aumento dei valori sierici del TSH, positività agli autoanticorpi antiTPO o antiTg e un quadro ecografico tipico di TH. Come criteri minori: la familiarità per TH e la presenza nello stesso paziente di altre malattie autoimmuni. Ognuno di questi criteri ha dei limiti e singolarmente non permette la diagnosi di TH; tuttavia, la presenza contemporanea di due criteri maggiori è praticamente diagnostica della patologia. I criteri minori invece possono essere utili nei casi dubbi. <sup>96</sup>

**Tabella IV.** Criteri maggiori e minori per la diagnosi di Tiroidite di Hashimoto <sup>96</sup>

	Significato	Limiti
<b><i>Criteri maggiori</i></b>		
<i>TSH</i>	-TH principale causa di ipotiroidismo -valori lievemente aumentati predittivi di progressione verso ipotiroidismo franco	-TH in eutiroidismo  -ipertireotropinemia isolata
<i>AbTg e AbTPO</i>	presenti in più dell'80% dei pz con TH -AbTPO strettamente associati a infiltrazione linfocitaria e direttamente correlati con il grado di ipotiroidismo	-positività in patologie tiroidee non autoimmuni (basso titolo) -titolo anticorpale dipende da metodi di dosaggi e stadio della malattia -in una minoranza di pazienti con TH gli abTG e abTPO sono negativi
<i>Ecografia tiroidea</i>	-quadro ecografico espressione delle alterazioni istologiche -ipoecogenicità predittiva dello sviluppo di ipotiroidismo	-valutazione ipoecogenicità operatore-dipendente -pseudonoduli
<b><i>Criteri minori</i></b>		
<i>Familiarità</i>	-predisposizione genetica della TH -elevato rischio di sviluppare la malattia tra fratelli	-geni finora identificati conferiscono un basso livello di rischio di sviluppo della TH: malattia poligenica
<i>Altre patologie autoimmuni</i>	-frequente associazione con patologie autoimmuni organo o non organo specifiche	-nessuna malattia autoimmune associata a TH nel 100% dei casi

### *3.2.3 Relazione tra tiroidite di Hashimoto e livelli di calcitonina*

Per quanto riguarda il rapporto tra tiroidite di Hashimoto e valori di calcitonina, Alcuni Autori hanno dimostrato una riduzione dei valori di calcitonina nei pazienti affetti dalla patologia. Uno dei primi studi a riguardo è stato di Body et al. nel 1986. Lo studio ha valutato i valori di calcitonina basale e stimolata con calcio gluconato in un gruppo di donne sane e in un gruppo di donne con TH, queste ulteriormente suddivise in eutiroidee e ipotiroidee. I livelli di calcitonina, sia basali che stimolati, sono risultati più bassi nelle donne affette da TH e non è stata riscontrata differenza in questo gruppo tra donne eutiroidee e ipotiroidee, suggerendo che i livelli più bassi siano dovuti alla patologia di base della ghiandola e non allo stato di ipotiroidismo.<sup>43</sup> Risultati analoghi sono stati ottenuti da uno studio successivo di Borges et al. nel 1997. In questo caso i pazienti con TH sono stati divisi in due gruppi. Il primo comprendeva pazienti con tiroidite in fase iniziale, che presentavano un ingrandimento della tiroide, il secondo gruppo pazienti con tiroidite in fase più avanzata con una tiroide atrofica. I livelli di calcitonina basale e stimolata sono risultati più bassi in entrambi i gruppi rispetto ai controlli. L'ipotesi più solida, riportata dagli Autori, per spiegare la ridotta calcitonina in questi pazienti, è che le cellule C nella tiroidite autoimmune vadano incontro a una distruzione progressiva e aspecifica, dovuta a infiltrazione linfocitaria e fibrosi della tiroide.<sup>42</sup> Questa ipotesi è supportata anche dall'evidenza in uno studio di Inoue et al. che ha riscontrato una significativa riduzione della massa di cellule C nelle ghiandole tiroidee affette da tiroidite.<sup>97</sup> Tuttavia un altro studio di Katoh et al. volto a valutare le caratteristiche ultrastrutturali delle tiroidi con tiroidite ha riscontrato invece la persistenza delle cellule C anche dopo la distruzione follicolare dovuta alla malattia.<sup>98</sup> In ogni caso il processo che porta alla diminuzione della calcitonina è probabilmente legato alla ghiandola perché in pazienti con ipotiroidismo secondario non è stata riscontrata una diminuzione della calcitonina.<sup>43</sup> Lo studio di Poppe et al. del 1999 ha confermato i precedenti risultati, riscontrando una diminuzione dei livelli di calcitonina basale e stimolata nei pazienti con tiroidite autoimmune, più marcata nel gruppo di pazienti con

tiroidite avanzata con ipotiroidismo.<sup>41</sup> In uno studio successivo del 2012 di Grani et al. sono invece stati ottenuti risultati diversi. Non si sono riscontrate differenze significative nei livelli di calcitonina basale nei pazienti con TH rispetto ai controlli. Non è stata riscontrata nessuna differenza nemmeno tra i sottogruppi di pazienti con tiroidite con gozzo o atrofica. Gli autori suggeriscono perciò che poiché la TH non influenza i valori di calcitonina, per questi pazienti non deve essere fatta una distinzione particolare nell'interpretazione dello screening per MTC.<sup>47</sup> Infine, Altri Autori hanno riscontrato un aumento dei livelli di calcitonina in un paziente con TH. In un case report brasiliano, una giovane paziente di 32 anni, sottoposta a chirurgia per una lesione follicolare, presentava valori aumentati di calcitonina basale e stimolata. La diagnosi è poi risultata essere di tiroidite autoimmune.<sup>46</sup> In uno studio di Barbot et al. del 1991, su 24 pazienti con diagnosi di TH, 3 hanno presentato livelli aumentati di calcitonina basale e 2 di calcitonina stimolata con pentagastrina. Questi pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia e l'analisi istopatologica ha evidenziato le caratteristiche tipiche di tiroidite autoimmune e un'estesa iperplasia delle cellule C, concludendo che è possibile riscontrare valori aumentati di calcitonina in alcuni pazienti con TH come conseguenza di questa iperplasia.<sup>45</sup> Ulteriori risultati in questo senso sono stati ottenuti più recentemente in uno studio di Karanikas et al. del 2014 che ha valutato i livelli di calcitonina in pazienti con diverse patologie tiroidee. 28 pazienti (6,8%) presentavano elevati valori di calcitonina basale, 7 di questi (25%) aveva una diagnosi di TH, mentre la prevalenza della patologia nel totale dei pazienti era di solo il 13,3%, mostrano una correlazione positiva tra tiroidite autoimmune e aumento dei livelli di calcitonina. Gli autori suggeriscono un legame tra TH e CCH alla cui base ci potrebbero essere meccanismi immunopatologici e un effetto di mediatori dell'infiammazione e citochine secrete dai linfociti infiltranti il parenchima tiroideo. L'aumento della calcitonina potrebbe rappresentare una risposta fisiologica delle cellule C alla distruzione follicolare in atto nella tiroide.<sup>44</sup> A supporto di questa teoria un'associazione tra CCH e tiroidite autoimmune è stata descritta in Letteratura da diversi autori.<sup>45,99,100</sup> Uno studio retrospettivo di

Guyetant et al. ha valutato istologicamente 112 ghiandole tiroidee appartenenti a pazienti con TH senza MTC o neoplasia endocrina multipla (MEN) riscontrando CCH nel 20% dei casi.<sup>100</sup>

In conclusione, la calcitonina ad oggi rappresenta un ottimo marker per il MTC e il suo dosaggio di routine nei pazienti con nodulo tiroideo può consentire una diagnosi precoce, fondamentale per un trattamento adeguato e precoce del tumore, aumentando il tasso di sopravvivenza di questi pazienti. Tuttavia, pur essendo un marker sensibile, è meno specifico e ci sono varie condizioni, fisiologiche e patologiche, in grado di aumentarne il valore. La relazione tra ipergastrinemia secondaria a gastrite cronica autoimmune e i livelli circolanti di calcitonina non è ancora chiara dalla Letteratura e lo stesso vale per la relazione tra tiroidite di Hashimoto e livelli di calcitonina. Sono necessari ulteriori studi per aumentare il valore diagnostico del marker calcitonina e inquadrarne in modo più corretto il dato di laboratorio all'interno del contesto fisiopatologico del paziente.

### **3. SCOPO DELLA TESI**

Gli scopi dello studio sono:

- 1) valutare i livelli di calcitonina sierica in pazienti con ipergastrinemia cronica secondaria a GAI;
- 2) verificare se l'ipergastrinemia cronica nei pazienti con GAI sia associata ad un aumento dei valori di calcitonina sierica;
- 3) valutare i livelli di calcitonina sierica nei pazienti con TH, con GAI e senza GAI;
- 4) verificare se la presenza di TH sia associata ad un aumento dei valori di calcitonina sierica.

## 4. PAZIENTI E METODI

### 4.1 Pazienti studiati

In questo studio retrospettivo multicentrico da gennaio 2020 a marzo 2022 sono stati arruolati 142 pazienti in tre diversi Centri: nella U.O.C. di Endocrinologia e nella U.O.C. di Gastroenterologia dell’Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova (Centro #1), nella U.O.C. di Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo dell’Ospedale Universitario Integrato di Verona (Centro #2) e nella UOC Medicina Clinica SS Endocrinologia dell’Azienda Sanitaria Universitaria di Trieste (Centro#3). I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: gruppo A comprendente pazienti affetti da sola gastrite atrofica autoimmune (GAI), composto da 13 pazienti; gruppo B comprendente pazienti affetti da GAI e tireopatia cronica autoimmune, composto da 92 pazienti; gruppo C comprendente pazienti affetti da sola tireopatia cronica autoimmune, composto da 37 pazienti. I criteri di inclusione del gruppo A erano: diagnosi istologica di gastrite autoimmune e la presenza di gastrina totale sierica aumentata; i criteri di inclusione del gruppo B erano: gli stessi del gruppo A associati a presenza di diagnosi di tiroidite autoimmune (almeno due tra i tre seguenti criteri: presenza di anticorpi anti-tireoglobulina (anti-TG) o anti-tireoperossidasi (anti-TPO), pattern ecografico di tiroidite di autoimmune, ipotiroidismo subclinico o clinico)<sup>96</sup>; il criterio di inclusione del gruppo C era: presenza di diagnosi di tiroidite autoimmune in assenza di gastrite autoimmune, secondo i criteri sotto citati. Lo studio è stato seguito in accordo alle linee guida di Helsinki e tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato scritto. I criteri di esclusione per tutti e tre i gruppi erano: 1) un’età minore di 18 anni 2) la presenza di insufficienza renale, iperparatiroidismo o tumore al polmone 3) rifiuto a fornire il consenso informato.

Per inquadrare i pazienti nei diversi gruppi: nei pazienti noti per avere una gastrite autoimmune sono stati dosati TSH, anticorpi anti-TPO e anti-TG ed eseguita

un'ecografia tiroidea per indagare la presenza di una possibile tiroidite autoimmune in associazione. Viceversa, nei pazienti noti per avere una tiroidite autoimmune sono stati dosati gastrina totale sierica, cromogranina A e anticorpi anti-cellule parietali gastriche; in caso di gastrina totale aumentata è stata eseguita una EGDS con esame istologico, è stato ottenuto il GastroPanel (dosaggio ematico di pepsinogeno A, pepsinogeno B e gastrina 1-17) e la cromogranina A.

Se i pazienti con gastrite autoimmune nota dimostravano di avere anche una tiroidite cronica venivano catalogati nel gruppo B, viceversa nel gruppo A. Se i pazienti noti per avere una tiroidite autoimmune dimostravano una positività ad Ab anti parete gastrica e a gastrina venivano sottoposti a EGDS. In caso di riscontro istologico di gastrite autoimmune venivano catalogati nel gruppo B, altrimenti nel gruppo C.

In ogni paziente di ciascun gruppo è stata dosata la gastrina totale sierica e la calcitonina sierica. I pazienti con valori di calcitonina al di sopra dei livelli di riferimento hanno eseguito la diagnostica differenziale per escludere un MTC, venendo sottoposti a ecografia tiroidea e a test di stimolo con calcio gluconato. In caso di forte sospetto di MTC sono stati sottoposti ad intervento secondo le più recenti linee guida ATA.

Ulteriori dati clinici sono stati ricavati dai database elettronici.

#### **4.2 Analisi di laboratorio e strumentali**

Per il dosaggio della calcitonina è stato usato lo stesso kit in tutti i Centri coinvolti. La calcitonina sierica è stata determinata con la strumentazione completamente automatizzata disponibile in commercio CLIA LIAISON CT II-Gen (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA), analizzatore a chemiluminescenza, con una sensibilità analitica di  $\leq 1$  ng/L e una sensibilità funzionale di  $\leq 3$  ng/L. È stato adottato un limite superiore di riferimento di 10 ng/L.

La gastrina totale sierica è stata dosata con metodo radioimmunologico Radio Immuno Assay (RIA, DIASource ImmunoAssay S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium),

con limite di rilevamento di 8,06 pmol/L, limite di quantificazione di 11,95 pmol/L e valori di riferimento compresi tra 11 e 54 pmol/L. TSH, FT3, FT4 sierici (Roche, Rotkreuz, Switzerland); AbTG e AbTPO (DiaSorin, Stillwater, MN, USA); sono stati dosati con kit commerciali con sistema di dosaggio RIA. Valori normali sono stati considerati: TSH: 0,2-4 mIU/L; FT3: 3,90-6,80 pmol/L; FT4: 9,00-22,00 pmol/L; AbTg: 0,0-100,0 kU/L; AbTPO: 0,0-30,0 kU/L.

Nel test di stimolo al calcio gluconato sono stati prelevati campioni ematici basali e sotto stimolo per il dosaggio della calcitonina sierica ai tempi 0 (baseline), 2, 5, 10 e 20 minuti dopo la somministrazione di calcio gluconato. I pazienti erano a digiuno dalla mezzanotte e i prelievi sono stati eseguiti con paziente in posizione supina e con monitoraggio elettrocardiografico continuo; alterazioni degli ioni ematici erano state precedentemente escluse. Il calcio gluconato è stato somministrato endovena, lentamente, in 4 minuti, al dosaggio di 25 mg/kg, considerando il peso ideale del paziente.

#### **4.3 Analisi statistica**

I valori di calcitonina, gastrina e cromogranina A sono stati valutati sia in forma quantitativa sia in forma categorizzata. I valori di calcitonina sono stati tricotomizzati in: livelli non rilevabili di calcitonina, valori compresi tra 1-10 ng/L e > 10 ng/L. I valori di gastrina totale sono stati dicotomizzati in: valori  $\leq$  54 pmol/L, > 54 pmol/L. I valori di cromogranina A sono stati dicotomizzati in: valori  $\leq$  100 ng/mL, > 100 ng/mL. Il test di Kolmogorov Smirnov è stato usato per valutare la normale distribuzione delle variabili nei gruppi. Le variabili distribuite in modo non normale sono state analizzate con Mann-Whitney o test di Kruskal-Wallis. Le variabili categoriche sono state analizzate con test  $\chi^2$ . Le correlazioni sono state indagate con il test di Spearman.

Tutte le analisi statistiche sono state fatte con MedCalc versione 19.2.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

## 5. RISULTATI

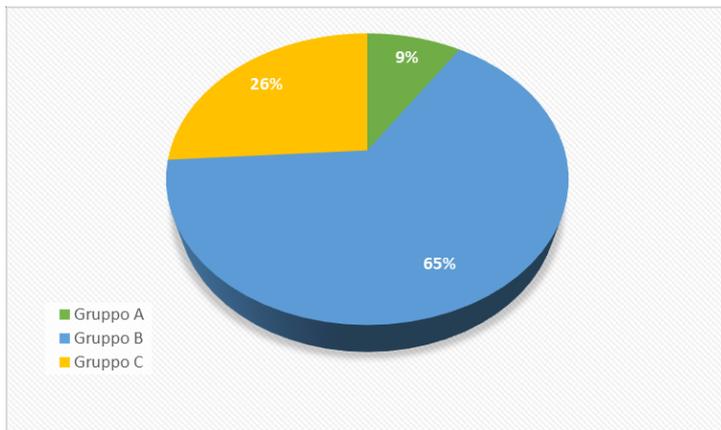
### 5.1 Descrizione della popolazione dei tre gruppi di studio

In questo studio sono stati arruolati 142 pazienti con età mediana di 57 anni (Interquartile Range (IQR) 49-65 anni). I soggetti di genere maschile erano 23 (16%) quelli di genere femminile 119 (84%) con un rapporto femmine: maschi di 5,2 a 1.

I pazienti del gruppo A, con sola diagnosi di GAI erano 13, di cui 11 donne (85%) e 2 uomini (15%), con età mediana di 65 anni (IQR 54-71 anni) e rapporto femmine:maschi di 5,5 a 1. Il gruppo A rappresenta il 9% (13/142) del totale dei pazienti dello studio (Figura 1).

I pazienti del gruppo B, con diagnosi sia di GAI che di tiroidite autoimmune erano 92, di cui 15 uomini (16%) e 77 donne (84%), con età mediana di 59 anni (IQR 50,5-67 anni); il rapporto femmine:maschi era di 6,1 a 1. Il gruppo B è il più numeroso, rappresentando il 65% dei pazienti studiati (92/142) (Figura 1).

I pazienti del gruppo C, con diagnosi di sola tiroidite autoimmune erano 37, di cui 6 uomini (16%) e 31 donne (84%), con età mediana di 52 anni (IQR 45-62 anni) il rapporto femmine:maschi era di 5,1 a 1. Il gruppo C rappresenta il 26% del totale (37/142) (Figura 1).

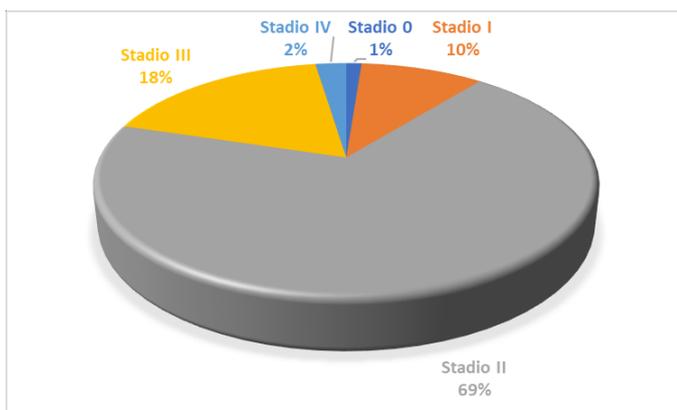


**Figura 1.** Percentuale della numerosità dei pazienti arruolati suddivisa per gruppo A, B e C di ogni gruppo studiato

## 5.2. Valutazione dei livelli sierici di gastrina totale, calcitonina e cromogranina A e loro correlazioni

### 5.2.1. Valutazione della gastrina totale sierica

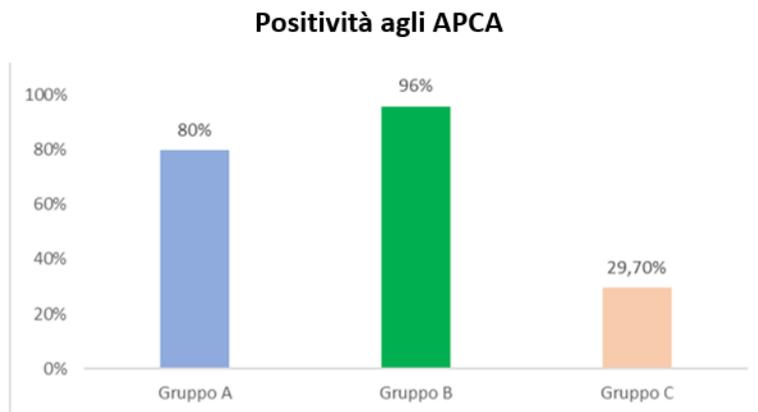
I pazienti affetti da gastrite autoimmune erano 105/142 (74%). Tra questi era disponibile la stadiazione OLGA in 84/105 (80%) pazienti. 1/84 presentava uno stadio 0 (1%), 8/84 (10%) pazienti uno stadio I, 58/84 (69%) pazienti uno stadio II, 15/84 (18%) pazienti uno stadio III e 2/84 (2%) pazienti uno stadio IV (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuzione in percentuale dei pazienti con gastrite autoimmune a seconda dello stadio OLGA

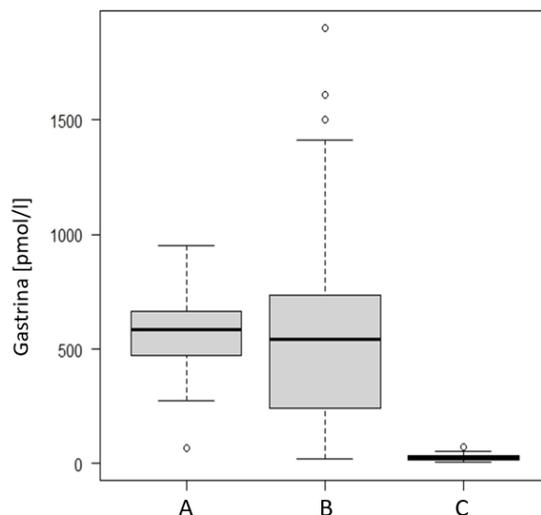
La durata media della gastrite autoimmune era nota in 62/105 pazienti affetti (59%) ed era di 7,5 anni (IQR 4-10).

Lo stato degli anticorpi anti-parete gastrica (APCA) era noto nel 96% del totale dei pazienti (136/142). Nel gruppo A erano positivi nel 80% dei pazienti (8/10), nel gruppo B nell'96% (85/89) e nel 29,7% (11/37) nel gruppo C (Figura 3). I pazienti del gruppo C con anticorpi APCA positivi presentavano tutti una gastrina nei limiti di norma.



**Figura 3.** Percentuale di positività agli APCA per gruppo

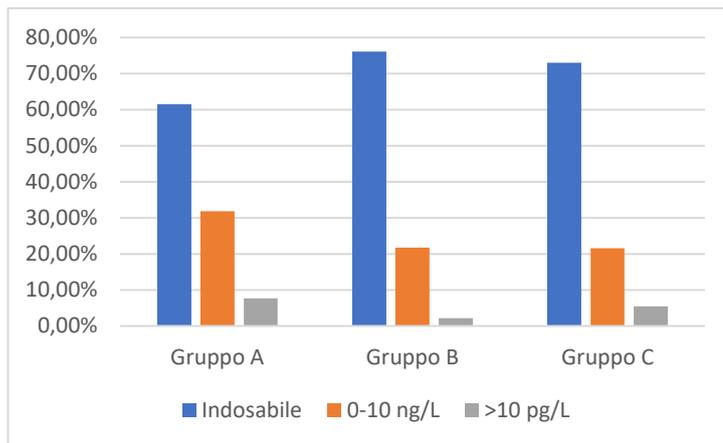
Nel gruppo A la mediana dei valori di gastrina totale sierica era di 584,20 pmol/L (IQR 457,3-715,5 pmol/L), nel gruppo B di 540,00 pmol/L (IQR 243,27-736,35) mentre nel gruppo C di 23,00 pmol/L (IQR 16,8-33,1 pmol/L). I valori sono risultati significativamente più elevati e al di sopra del limite superiore di riferimento nei gruppi A e B (pazienti tutti affetti da gastrite autoimmune), rispetto ai pazienti del gruppo C (pazienti con la sola tiroidite autoimmune), in cui erano nella norma ( $p < 0.001$ ; Figura 4).



**Figura 4.** Grafico box-plot rappresentativo della distribuzione dei valori di gastrina sierica totale nei gruppi A, B e C

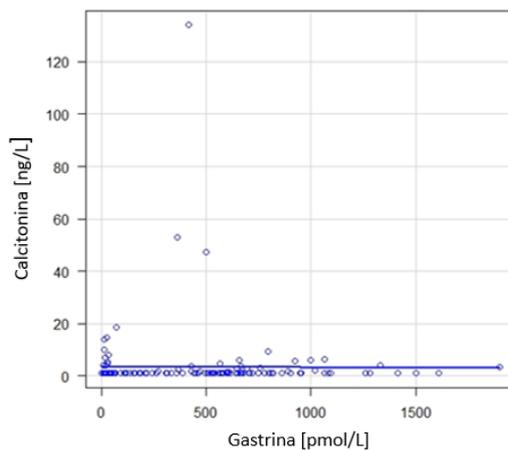
#### 5.2.2. Valutazione della calcitonina sierica e correlazione tra livelli di gastrina totale e calcitonina sieriche

Sono stati valutati i livelli di calcitonina sierica nella totalità dei pazienti arruolati e non vi erano differenze nella mediana nei tre gruppi (mediana per ciascun gruppo A, B e C: 1,0 ng/L (IQR 1,0-1,0 ng/L), evidenziando una distribuzione dei valori che non variava a seconda del gruppo preso in considerazione ( $p=0,1$ ). La calcitonina sierica è risultata non dosabile in 8/13 (61,5%) dei pazienti del gruppo A, in 70/92 (76,1%) del gruppo B e in 27/37 (73%) del gruppo C, è risultata dosabile e compresa tra 1 e 10 ng/L rispettivamente in 4/13 (30,8%) pazienti del gruppo A, 20/92 (21,7%) pazienti del gruppo B e 8/37 (21,6%) pazienti del gruppo C. Infine la calcitonina sierica è risultata > 10 ng/L in 1 paziente su 13 (7,7%) del gruppo A, 2/92 (2,2%) del gruppo B e 2/37 (5,4%) del gruppo 3 (Figura 5).



**Figura 5.** Percentuale di pazienti nei gruppi A, B, C suddivisi per valori di calcitonina indosabili, compresi tra 0 e 10 ng/L e > 10 ng/L

Non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra i valori di calcitonina sierica e i valori di gastrina totale nei 3 gruppi, sia considerando i valori di gastrina e calcitonina come variabili qualitative, rispettivamente dicotomizzati e tricotomizzati ( $p=0.52$ , secondo test del  $\chi^2$ ), sia considerando i valori come variabili quantitative ( $p=0.27$ ,  $R=0.09$  secondo la correlazione per ranghi di Spearman; Figura 6).



**Figura 6.** Correlazione tra gastrina totale e calcitonina al test di Spearman

### 5.2.3. Descrizione pazienti con calcitonina aumentata e ipergastrinemia

Solo 3 pazienti avevano livelli di calcitonina > 10 ng/L e contestualmente ipergastrinemia. Tutti questi pazienti presentavano una patologia nodulare

tiroidea e sono stati sottoposti a test di stimolo con calcio gluconato, che risultava compatibile con MTC, successivamente confermato all'analisi istologica. La prima paziente era una donna di 54 anni appartenente al gruppo B, affetta sia da gastrite autoimmune che da tiroidite di Hashimoto. Presentava livelli di calcitonina basale di 47.5 ng/L e di gastrina totale di 500,00 pmol/L. L'ecografia tiroidea documentava il noto quadro di tireopatia autoimmune e un nodulo sinistro di 15 mm di diametro massimo, isoecogeno, a margini definiti. Il picco di calcitonina al test di stimolo con calcio gluconato era di 235 ng/L a 2 minuti. La paziente è stata sottoposta a intervento di tiroidectomia totale (TT) e linfadenectomia profilattica del comparto centrale; l'esame istologico ha confermato un MTC midollare a stroma amiloide. Il carcinoma era presente sul lobo tiroideo destro ed aveva un diametro massimo di 10 mm, sono stati valutati istologicamente 31 linfonodi che sono risultati negativi (stadio I). L'analisi genetica non ha rilevato nessuna mutazione germinale del gene RET.

La seconda paziente era una donna di 51 anni, appartenente al gruppo B. La calcitonina basale era 53,1 ng/L e la gastrina totale di 362,0 pmol/L. L'ecografia tiroidea documentava un nodulo tiroideo sospetto al lobo sinistro, di 15 mm di diametro massimo, ipoecogeno, disomogeneo, con all'interno spots iperecogeni, con vascolarizzazione periferica e centrale, di consistenza aumentata all'elastosonografia, in quadro di tireopatia autoimmune. Sono stati eseguiti tre agoaspirati per esame citologico (FNAC), risultati in due casi TIR2 (lesione non maligna/benigna) e in un caso TIR3A (lesione indeterminata a basso rischio), secondo la Classificazione Italiana 2014 della Citologia Tiroidea.<sup>101</sup> In considerazione dei valori di calcitonina basale è stato eseguito un test di stimolo con calcio gluconato, in cui è stato riportato un picco di 538 ng/L a 2 minuti. Anche questa paziente non presentava mutazione germinale del gene RET. La paziente è stata sottoposta a intervento di tiroidectomia totale con linfadenectomia profilattica del compartimento centrale, l'esame istologico ha confermato la presenza di un microMTC di 8 mm di diametro massimo al lobo sinistro e ha

rilevato la presenza di un microPTC di 1 mm a livello dell'istmo (stadio I). Sono stati esaminati 25 linfonodi che sono risultati esenti da metastasi.

Infine, la terza paziente era una donna di 55 anni, appartenente al gruppo A. La calcitonina basale era di 135,0 ng/L e la gastrinemia totale di 419,0 pmol/L. L'ecografia tiroidea documentava al lobo destro un nodulo marcatamente ipoecogeno, disomogeneo, con intensa vascolarizzazione sia peri- che intranodulare e di consistenza aumentata all'elastasonografia, di 10 mm di diametro; in un quadro di ghiandola tiroidea con ecostruttura normoecogena e omogenea, non erano presenti linfadenomegalie significative. Il test di stimolo al calcio gluconato ha mostrato un picco di calcitonina a 175,0 ng/L a 5 minuti. La paziente è stata sottoposta a tiroidectomia totale con linfadenectomia profilattica del compartimento centrale e l'esame istologico ha confermato la presenza un MTC con minimo stroma amiloide, unifocale di 12 mm, al lobo destro, con invasione vascolare, infiltrazione capsulare e positività di 5 linfonodi su 20 esaminati (stadio III). Contestualmente è stato riscontrato anche un microPTC papillare e un microPTC a variante follicolare, rispettivamente di 1 mm al lobo destro e di 6 mm al lobo sinistro (stadio I). La ricerca di mutazioni germinali del gene RET è risultata negativa. La tabella V riassume le principali caratteristiche delle tre pazienti affette da MTC.

**Tabella V.** Valori di calcitonina, gastrina, test al calcio; caratteristiche ecografiche, stato mutazionale del gene RET, tipo di intervento chirurgico e istologia delle tre pazienti affette da MTC

Paziente	Calcitonina (ng/L)	Test al calcio (ng/L)	Gastrina (pmol/L)	Caratteristiche ecografiche	Stato mutazionale gene RET	Tipo di intervento chirurgico	Istologia
27	47,4	Picco di 235,0 a 2 minuti	500,0	Nodulo sinistro di 15 mm, isoecogeno a margini definiti su quadro di tiroidite	Nessuna mutazione germinale	Tiroidectomia con linfadenectomia del comparto centrale profilattica	- MTC a stroma amiloide di 10 mm nel lobo destro - 0/24 linfonodi positivi
30	53,1	Picco di 538,0 a 2 minuti	362,0	Nodulo sinistro di 15 mm, ipoecogeno, disomogeneo su quadro di tiroidite	Nessuna mutazione germinale	Tiroidectomia con linfadenectomia del comparto centrale profilattica	-microMTC di 8 mm al lobo sinistro -microPTC di 1mm all'istmo -0/25 lifonodi positivi
7	135,0	Picco di 175,0 a 5 minuti	419,0	Nodulo destro di 10 mm, ipoecogeno, disomogeneo su quadro di ghiandola normoecogena e omogenea	Nessuna mutazione germinale	Tiroidectomia con linfadenectomia del comparto centrale profilattica	-MTC con minimo stroma amiloide, di 12 mm al lobo destro -microPTC papillare di 1mm al lobo destro -microPTC a variante follicolare di 8mm al lobo sinistro -5/20 linfonodi positivi

#### 5.2.4 Descrizione pazienti con calcitonina aumentata e gastrina normale

2 pazienti presentavano valori di calcitonina > 10 ng/L e gastrina normale (11-54 pmol/L). Entrambe appartenevano al gruppo C ed erano affette da sola TH.

La prima paziente presentava valori di calcitonina basale di 14,0 ng/L e valori di gastrina di 14,0 pmol/L. È stato eseguito un test al calcio gluconato e il picco di calcitonina a 2 minuti era di 77 ng/L. In questo caso si è deciso di adottare per la

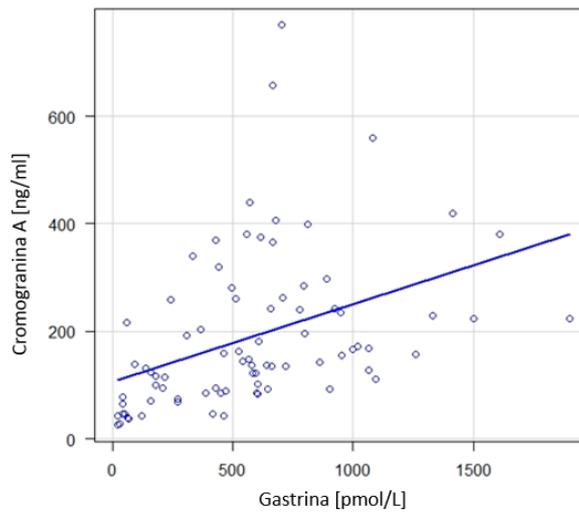
paziente un approccio wait and see, considerando come limite del picco del test al calcio gluconato il valore di 79 ng/L.<sup>102</sup>

La seconda paziente presentava valori di calcitonina basale di 18,7 ng/L e valori di gastrina di 72,0 pmol/L, di poco al di sopra del range di normalità. L'ipergastrinemia era secondaria a infezione da H. pylori e si era normalizzata dopo eradicazione, mentre i valori di calcitonina rimanevano stabili. È stato eseguito un test al calcio gluconato e il picco di calcitonina a 2 minuti era di 106 ng/L. All'ecografia tiroidea la paziente presentava al lobo destro un nodo ipoecogeno, disomogeneo e intensamente vascolarizzato. Dopo valutazione endocrinologica si è posta indicazione ad intervento di tiroidectomia totale ma la paziente ha rifiutato l'intervento e preferito continuare con un follow up biochimico ed ecografico.

#### 5.2.5 Correlazione della cromogranina A con gastrina e calcitonina

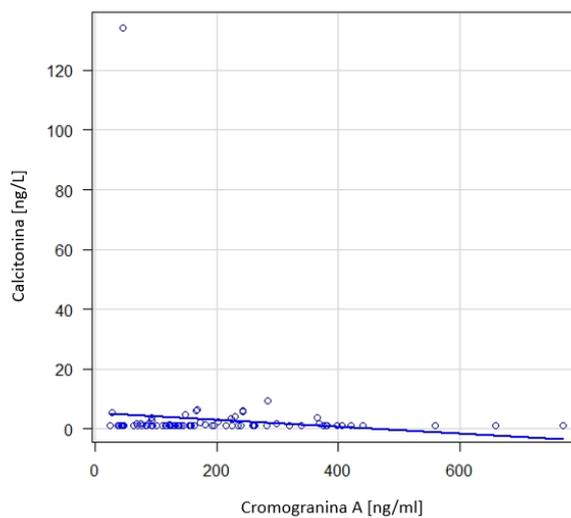
La cromogranina A è stata dosata in un totale di 81 pazienti: 13 del gruppo A (100%), 63 del gruppo B (68%) e 5 del gruppo C (14%). È risultata superiore al valore soglia di 100 ng/L rispettivamente in 9/13 (69%) pazienti del gruppo A, 46/63 (73%) del gruppo B e in nessun paziente del gruppo C (0%).

È emersa una correlazione statisticamente significativa tra valori di cromogranina A e valori di gastrina ( $P < 0.001$ ) al test di Spearman, ( $R = 0.58$ ; Figura 7). Questo risulta conforme al dato fisiopatologico per cui la cromogranina A aumenta nei pazienti affetti da GAI.<sup>73,84,85</sup>



**Figura 7.** Correlazione tra gastrina totale e cromogranina A

Non è stata invece trovata una correlazione statisticamente significativa tra cromogranina A e calcitonina: considerando la cromogranina A in forma dicotomizzata, la correlazione non era significativa sia considerando la calcitonina come variabile quantitativa ( $p=0.79$ ;  $r= 0.065$ ). Figura 8), sia come variabile categorica in forma tricotomizzata ( $p=0,33$ ; Figura 8).



**Figura 8.** Correlazione tra cromogranina A e calcitonina al test di correlazione di Spearman

### 5.2.6 Pazienti con tumore neuroendocrino (NET) gastrico e livelli di calcitonina

12/105 (11%) dei pazienti con GAI presentavano un NET, attivo o pregresso, 3/12 (25%) appartenevano al gruppo A e 9/12 (75%) al gruppo B. In particolare 6/105 (6%) pazienti presentavano un NET attivo al momento del dosaggio di gastrina, cromogranina A e calcitonina.

Tra i pazienti con NET attivo e pregresso la gastrina è risultata superiore al valore soglia di 54 pmol/L in 12/12 pazienti (100%). La cromogranina A era nota in 11/12 pazienti (92%) ed è risultata superiore al valore soglia di 100 ng/L in 10/11 pazienti (91%). Nonostante ciò, la calcitonina è risultata indosabile in 8/12 (67%) pazienti, dosabile ma inferiore a 10 ng/L in 4/12 (33%) e in 0/12 pazienti è risultata superiore a 10 ng/L. Nella tabella VI sono riportati i valori di gastrina, cromogranina A, calcitonina e lo stato del NET gastrico per singolo paziente.

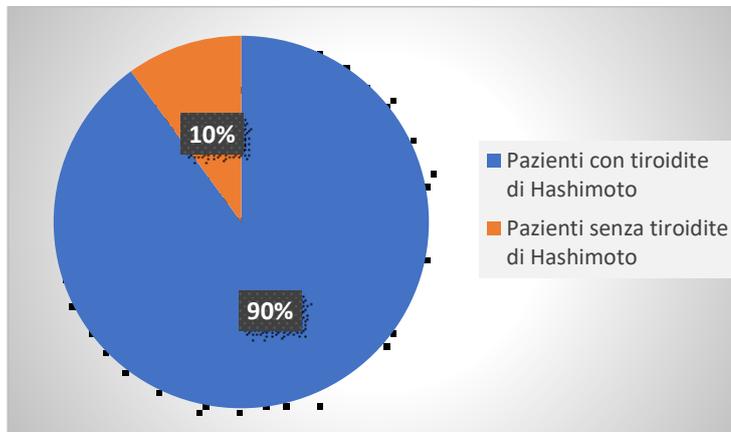
**Tabella VI.** Valori di gastrina, cromogranina A e calcitonina in pazienti con NET attivo o pregresso

Paziente	Gruppo	NET gastrico	Gastrina (pmol/L)	Cromogranina A (ng/ml)	Calcitonina (ng/L)
8	A	attivo	609,4	180,8	1,4
10	A	attivo	666,4	658,0	1,0
13	A	pregresso	891,6	297,7	1,7
15	B	pregresso	568,6	147,8	4,6
17	B	pregresso	664,0	135,6	1,0
21	B	pregresso	1611,0	381,0	1,0
23	B	attivo	1900,0	223,4	3,3
24	B	pregresso	1065,0	127,3	1,0
47	B	attivo	388,0	84,5	1,0
51	B	attivo	1413,0	420,0	1,0
53	B	attivo	1282,0	Non nota	1,0
68	B	pregresso	557,4	380,7	1,0

### 5.2.7 Correlazione tra calcitonina e tiroidite autoimmune

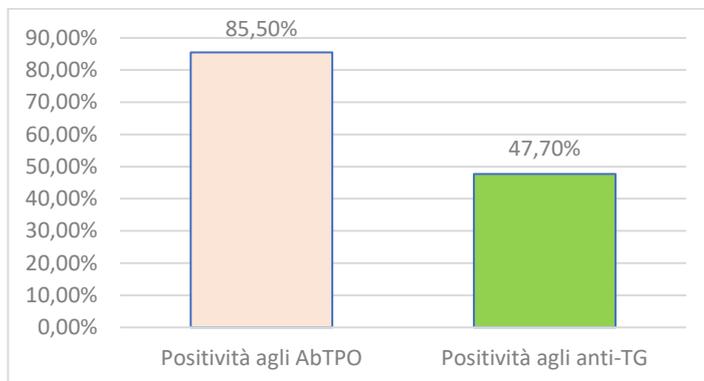
I pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto, presenti quindi nel gruppo B e nel gruppo C, erano 129/142 (91%; Figura 10). In questi pazienti la durata di malattia

era nota in 102/129 (79%), di cui la mediana era di 10 anni (IQR 3-13 anni). I pazienti affetti da TH sul totale dei pazienti con GAI erano 92/105 (88%).



**Figura 9.** Percentuale di pazienti con e senza tiroidite di Hashimoto

Lo stato degli anticorpi anti-TPO era noto in 97 pazienti, tra questi 83 (85,6%) li presentano positivi e 14 (14,4%) negativi. Gli anticorpi anti-TG erano invece noti in 86 pazienti, 41 (47,7%) li presentano positivi e 45 (52,3%) negativi (Figura 11).



**Figura 10.** Percentuale di positività agli abTPO e anti-Tg nei pazienti affetti da tiroidite autoimmune

Non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra i valori di calcitonina sierica e l'essere affetti da tiroidite di Hashimoto ( $p=0,79$ ). I livelli mediani sono risultati uguali per i due gruppi, in entrambi i casi 1,00 ng/L (IQR 1,00-1,00 ng/L).

## 6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ad oggi, la calcitonina sierica è considerata il marcatore più sensibile di MTC e il suo dosaggio di routine nei pazienti con nodulo tiroideo consente una diagnosi precoce della neoplasia con aumento della sopravvivenza.<sup>13,22,24-26</sup> Elevati livelli di calcitonina sierica sono infatti diagnostici di MTC<sup>28,29</sup>: è stato dimostrato che valori superiori a 100 ng/L hanno un valore predittivo positivo del 100% per la neoplasia.<sup>28</sup> È stato dimostrato come il dosaggio della calcitonina sia una metodica più sensibile rispetto al solo agoaspirato per il riconoscimento di MTC, con aumento dell'accuratezza diagnostica pre-operatoria e conseguente possibilità per il chirurgo di eseguire un intervento più radicale, fondamentale per un trattamento definitivo.<sup>22,24</sup> In una Consensus del 2007, l'ETA, a fronte di queste evidenze, ne ha raccomandato il dosaggio nella diagnostica iniziale di tutti i pazienti con nodulo tiroideo.<sup>27</sup> Le ultime linee guida ATA del 2015 sulla gestione del MTC tuttavia non si esprimono né a favore né contro il dosaggio della calcitonina, lasciando al singolo Centro la possibilità di scelta.<sup>3</sup> Questo veniva giustificato dal fatto che la calcitonina sierica, pur essendo un marcatore estremamente sensibile, non è molto specifico: vi sono alcune condizioni fisiologiche e patologiche descritte in Letteratura che possono aumentarne i livelli (tra i quali: insufficienza renale cronica, iperparatiroidismo, tumore polmonare, assunzione di beta-bloccanti e di PPI, patologie tiroidee).<sup>30</sup> Nel nostro studio abbiamo indagato due di queste condizioni: l'ipergastrinemia cronica secondaria a GAI e la tiroidite di Hashimoto. Lo scopo dello studio era di verificare se livelli aumentati di gastrina totale o la presenza di tiroidite autoimmune rappresentino condizioni associate ad un aumento della calcitonina sierica.

Infine, mentre è stato dimostrato, sia *in vitro* che *in vivo*, che un'ipergastrinemia acuta determini uno stimolo alla secrezione di calcitonina, l'effetto di un'ipergastrinemia cronica nell'uomo sui livelli di calcitonina sierica è ancora da avvalorare.

Per quanto riguarda l'ipergastrinemia cronica, gli studi in Letteratura che analizzano l'influenza sulla calcitoninemia sono pochi, in gran parte antecedenti agli anni '90, quando i metodi di rilevazione della calcitonina erano meno sensibili e specifici. Sono studi caratterizzati da una bassa numerosità campionaria. In questi studi la gastrina era significativamente aumentata nei pazienti con GAI senza che questo comportasse un aumento dei livelli di calcitonina rispetto al gruppo di controllo.<sup>86,88-90</sup> È stato condotto un solo studio successivo agli anni '90, di Erdogan et al nel 2006. Questo studio, valutando 37 pazienti con GAI, 40 controlli sani e 25 pazienti in terapia con beta bloccanti o protettori gastrici (PPI) (in questo caso, con una durata media del trattamento di circa  $5.1 \pm 5.3$  mesi. (deviazione standard, DS) Lo studio ha evidenziato come pur non essendoci una correlazione significativa tra calcitonina e gastrina, i pazienti con gastrina elevata avessero un livello medio di calcitonina più elevato. L'aumento della calcitonina era comunque lieve, con valori medi di  $13,7 \pm 9,8$  ng/L. A nostro avviso, questo risultato ha però il grande limite di essere stato ottenuto nella totalità dei pazienti, senza prendere in considerazione il loro gruppo di appartenenza, quindi considerando anche soggetti senza GAI, ma in terapia con PPI di breve termine, considerando la DS. Inoltre gli autori riscontravano un livello di calcitonina basale lievemente più elevato nel gruppo di pazienti con tiroidite in associazione a GAI rispetto alla sola GAI, ai limiti della significatività statistica. Non era specificata la durata di malattia nei pazienti con tiroidite cronica, fattore che, come vedremo più avanti in questa discussione, può incidere sui valori di calcitonina. Infine, neppure la durata di malattia cronica autoimmune gastrointestinale dei pazienti arruolati era specificata. I limiti di questo studio non lo rendono quindi esaustivo per rispondere alla domanda sul reale effetto fisiologico di un'ipergastrinemia cronica sui livelli di calcitonina.

Nel nostro studio abbiamo considerato una serie di pazienti con sicura diagnosi di lungo termine di gastrite autoimmune. Abbiamo riscontrato livelli mediani di gastrina molto più elevati nel gruppo affetto da GAI rispetto alla sola tiroidite autoimmune. Nonostante ciò, i livelli di calcitonina mediana sono risultati uguali

ed entro il range di norma nei tre gruppi, dimostrando l'assenza di una correlazione tra gastrina totale e calcitonina sieriche. Anche considerando i pazienti rispetto a valori normali o elevati di gastrina abbiamo ottenuto differenze nei valori mediani di calcitonina, in contrasto con i risultati di Erdogan.<sup>67</sup>

Solo tre pazienti dello studio, una paziente del gruppo A e due pazienti del gruppo B, hanno presentato valori di gastrina e calcitonina entrambi elevati. Procedendo con la diagnostica differenziale (ecografia tiroidea e test al calcio gluconato), in tutti i casi si poneva il sospetto di MTC per la presenza di patologia nodulare tiroidea e per risposta positiva allo stimolo con calcio gluconato, pertanto le pazienti venivano sottoposte a intervento chirurgico di tiroidectomia totale e linfadenectomia del compartimento centrale e la presenza di MTC veniva confermata all'analisi istologica. Da questo possiamo dedurre che i valori aumentati di calcitonina erano effettivamente dovuti alla presenza della neoplasia a cellule C e non secondari all'ipergastrinemia. Se gli aumentati valori di calcitonina in queste pazienti non fossero stati presi attentamente in considerazione perché ritenuti secondari all'ipergastrinemia cronica, probabilmente si sarebbe ritardato l'intervento chirurgico con possibilità di avanzamento della neoplasia e ridotta probabilità di trattamento definitivo. Di conseguenza, poiché elevati valori di gastrina non spiegano un'ipercalcitoninemia, in presenza di elevati livelli di calcitonina e gastrite autoimmune, è in ogni caso mandatorio intraprendere l'iter diagnostico per escludere la presenza di un MTC.

Il nostro studio ha considerato l'influenza dell'ipergastrinemia cronica sui livelli di calcitonina, infatti a conferma di ciò la durata media di GAI nella nostra popolazione era nota in 62/105 pazienti ed era di 8 anni. Nello studio di Heynen et al. è stato invece considerato lo stimolo acuto, evidenziando come l'iniezione acuta di una elevata dose di pentagastrina, analogo sintetico della gastrina, aumentasse i livelli di calcitonina in modo significativo. Dagli Autori questo veniva considerato un effetto farmacologico, piuttosto che fisiologico. I risultati di questo stesso studio sullo stimolo cronico erano invece in linea con i nostri, non mostrando nessuna correlazione.<sup>89</sup> Un risultato in parte diverso è stato ottenuto

da Becker et al. che pur non trovando una correlazione statisticamente significativa tra valori di calcitonina e gastrina, ha evidenziato un aumento della calcitonina in 6/11 pazienti (55%) con anemia perniciosa, tuttavia senza una correlazione tra i due dati.<sup>87</sup> Alla base di questo risultato in apparente divergenza con la restante Letteratura e con i nostri dati può esserci la metodica di dosaggio della calcitonina, un tempo meno specifica, impiegando metodiche radio-immunologiche (RIA). Nel nostro studio sono state usate le metodiche più sensibili e specifiche per il dosaggio della calcitonina ma non è stato evidenziato nessun aumento significativo tra i pazienti con patologia gastrointestinale cronica.

I risultati del nostro studio sono in linea con gran parte degli studi precedenti agli anni '90, i quali non avevano trovato una correlazione tra ipergastrinemia cronica nei pazienti con GAI e livelli di calcitonina, tuttavia divergono da quelli ottenuti dallo studio di Erdogan et al., che tuttavia presenta, a nostro parere dei limiti che ne impongono l'interpretazione cauta dei risultati.

La Letteratura attuale, comprese le Linee Guida, considera l'ipergastrinemia cronica un possibile fattore confondente di aumento della calcitoninemia principalmente sulla base di questo studio, considerata la scarsità di recenti indagini; alla luce dei nostri risultati, ottenuti su una numerosità maggiore, tale conclusione potrebbe essere riconsiderata.

Il nostro studio ha valutato anche la relazione tra i livelli di cromogranina A e i valori di calcitoninemia. È noto, per motivi fisiopatologici, che la cromogranina A correla con la gastrina e risulta aumentata nei pazienti con GAI.<sup>73,84,85</sup> I nostri risultati sono concordi alla Letteratura, la cromogranina A è risultata superiore al valore soglia nel 69% dei pazienti con sola GAI, nel 73% dei pazienti con GAI e TH e in nessun paziente con sola tiroidite, e abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa con i livelli di gastrina. È emerso che i livelli di cromogranina A non correlavano in modo statisticamente significativo con i livelli di calcitonina, sia considerando i valori di calcitonina in modo quantitativo che in modo categorico, a conferma dei dati emersi in merito all'ipergastrinemia. Inoltre,

nel nostro studio erano presenti 12 pazienti con NET gastrico, attivo o pregresso: questi presentavano sia valori di gastrina che di cromogranina A superiori alla soglia di normalità ma i valori di calcitonina risultavano normali, ad ulteriore conferma della mancanza di relazione tra questi ormoni.

Infine, in questo studio abbiamo valutato i livelli di calcitonina sierica nei pazienti con TH, per valutare come questa patologia ne influenzi i valori. La relazione tra TH e livelli di calcitonina non è chiara, in Letteratura gli studi che hanno indagato questa relazione hanno riportato risultati discordanti. Alcuni Autori hanno evidenziato una diminuzione significativa della calcitonina nei pazienti con TH rispetto a controlli senza tiroidite <sup>41-43</sup>, uno studio non ha evidenziato alcuna differenza <sup>47</sup>, altri infine hanno mostrato un aumento dei valori di calcitonina in una certa percentuale di pazienti con TH <sup>44,45</sup>. I dati del nostro studio non hanno evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa tra i livelli di calcitonina sierica e la presenza di TH, e i valori mediani sono risultati identici nel gruppo con TH e nel gruppo senza TH. Queste evidenze corroborano i risultati di Grani et. al che non riportavano differenze significative <sup>47</sup>, mentre risultano discordanti rispetto agli studi che indicavano una diminuzione dei valori di calcitonina rispetto ai pazienti senza tiroidite.<sup>41-43</sup> Un'ipotesi avanzata a spiegazione di questi dati apparentemente discordanti che il processo infiammatorio cronico della tiroidite, che negli anni comporta atrofia della ghiandola, porta a una distruzione progressiva e aspecifica delle cellule C. In particolare lo studio di Borges et al. ha confrontato pazienti con diagnosi recente di TH che presentavano una ghiandola ingrandita con gozzo e pazienti con una tiroidite di lunga durata, definita atrofica. In questi ultimi, lo studio mostrava come ci fosse una correlazione tra livelli di calcitonina e volume della ghiandola, con valori più bassi di calcitonina a volumi più bassi. <sup>42</sup> Una diminuzione più marcata della calcitonina nelle fasi più avanzate della tiroidite è stata riscontrata anche nello studio di Poppe et al.<sup>41</sup> Nonostante ciò, lo studio di Grani et al. però non ha invece evidenziato differenze tra pazienti con tiroidite in fase iniziale con gozzo e tiroidite di lunga data, atrofica.<sup>47</sup> Per quanto riguarda il nostro studio, tra i 129

pazienti con TH la durata di malattia era nota in 102, ed era pari a 10 anni. Perciò i nostri pazienti possono essere definiti in uno stadio cronico di tiroidite, con una tiroide più probabilmente atrofica. I valori di calcitonina nei nostri pazienti affetti da tiroidite non erano diversi rispetto al gruppo di pazienti senza tiroidite. Va sottolineato che sia nei pazienti con tiroidite che nei pazienti senza tiroidite la calcitonina è risultata indosabile nella maggioranza dei casi, rispettivamente nel 75,2% e nel 61,5% dei casi.

Il principale limite del nostro studio, che è però intrinseco al design e alla domanda che ne stavano alla base è la mancanza di dati sui livelli di calcitonina nei pazienti con gastrite autoimmune all'esordio. Sarebbe interessante comprendere se, almeno inizialmente, l'incremento della gastrina nel paziente con gastrite autoimmune porti con sé un parallelo incremento dei valori di calcitonina, poi destinati a normalizzarsi con la cronicizzazione del processo. Questo potrebbe spiegare il dato in apparente controtendenza rispetto a quello di alcuni studi recenti.<sup>67</sup>

In conclusione, il nostro studio, condotto su un numero rilevante di pazienti con diagnosi istologica di GAI e TH, ha dimostrato come né l'ipergastrinemia cronica né la tiroidite autoimmune di lunga data siano associate ad un aumento dei livelli di calcitonina sierica. Per questo motivo, in caso di valori aumentati di calcitonina in un paziente affetto da GAI o TH, va sempre indagata la presenza di un possibile MTC. Attribuire l'aumento della calcitoninemia a queste condizioni potrebbe ritardare processi diagnostici e interventi terapeutici, necessari per un trattamento precoce dell'MTC andando così a compromettere le possibilità di un trattamento risolutivo precoce.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. DL Longo; AS Fauci; DL Kasper; SL Hauser; J Jameson; J Loscalzo. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. (McGraw-Hill, 2015).
2. Merino MJ. Thyroid Cancer. In: Strayer DS, Rubin E, editors. *Rubin's Pathology*. 7th ed. Baltimore, MD; Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2015. p. 1192-1196.
3. Wells, S. A. *et al.* Revised American thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* **25**, 567–610 (2015).
4. KEISER, H. R. Sipple's Syndrome: Medullary Thyroid Carcinoma, Pheochromocytoma, and Parathyroid Disease. *Annals of Internal Medicine* **78**, 561 (1973).
5. Morrison, P. J. & Atkinson, A. B. Genetic Aspects of Familial Thyroid Cancer. *The Oncologist* **14**, 571–577 (2009).
6. Lodish, M. B. & Stratakis, C. A. RET oncogene in MEN2, MEN2B, MTC and other forms of thyroid cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **8**, 625–632 (2008).
7. Accardo, G. *et al.* Genetics of medullary thyroid cancer: An overview. *International Journal of Surgery* **41**, S2–S6 (2017).
8. Fujiwara, N., Hall, C. & Jenkins, A. ВВЕДЕНИЕ Page 1 of 23. *Cereal Chemistry Journal* **94**, 110–116 (2017).
9. Kebebew, E. & Clark, O. H. Medullary thyroid cancer. *Curr Treat Options Oncol* **1**, 359–367 (2000).
10. Bergholm, U. *et al.* Clinical characteristics in sporadic and familial medullary thyroid carcinoma. *Cancer* **63**, 1196–1204 (1989).

11. Dottorini, M. E. *et al.* Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma: Prognostic significance and impact on treatment of clinical and pathologic variables. *Cancer* **77**, 1556–1565 (1996).
12. Modigliani, E. *et al.* Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: Results in 899 patients. *Clinical Endocrinology* **48**, 265–273 (1998).
13. Hahm, J. R. *et al.* Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid* **11**, 73–80 (2001).
14. Costante, G. *et al.* Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**, 450–455 (2007).
15. Gharib, H. *et al.* Medullary Thyroid Carcinoma: Clinicopathologic Features and Long-Term Follow-Up of 65 Patients Treated During 1946 Through 1970. *Mayo Clinic Proceedings* **67**, 934–940 (1992).
16. Pacini, F. *et al.* Early treatment of hereditary medullary thyroid carcinoma after attribution of multiple endocrine neoplasia type 2 gene carrier status by screening for ret gene mutations. *Surgery* **118**, 1031–1035 (1995).
17. Wells SA Jr, Skinner MA. Prophylactic thyroidectomy, based on direct genetic testing, in patients at risk for the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106(1):29-34.
18. Viola D, Elisei R. Management of Medullary Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019 Mar;48(1):285-301.
19. Papaparaskeva, K., Nagel, H. & Droese, M. Cytologic diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Diagnostic Cytopathology* **22**, 351–358 (2000).

20. Konstantinidis, A., Stang, M., Roman, S. A. & Sosa, J. A. Surgical management of medullary thyroid carcinoma. *Updates in Surgery* **69**, 151–160 (2017).
21. Trimboli, P. *et al.* Detection rate of FNA cytology in medullary thyroid carcinoma: A meta-analysis. *Clinical Endocrinology* **82**, 280–285 (2015).
22. Elisei, R. *et al.* Impact of Routine Measurement of Serum Calcitonin on the Diagnosis and Outcome of Medullary Thyroid Cancer: Experience in 10,864 Patients with Nodular Thyroid Disorders. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 163–168 (2004).
23. Essig, G. *et al.* Fine needle aspiration and medulla. *Endocrine Practice* **19**, 920–927 (2013).
24. Miccoli, P., Coscio, D. I., P, I. E. F. & Patologica, A. Thyroid Unsuspected Diagnosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **78**, 826–829 (1994).
25. Vierhapper, H., Niederle, B., Bieglmayer, C., Kaserer, K. & Baumgartner-Parzer, S. Early diagnosis and curative therapy of medullary thyroid carcinoma by routine measurement of serum calcitonin in patients with thyroid disorders. *Thyroid* **15**, 1267–1272 (2005).
26. Özgen, A. G. *et al.* Evaluation of routine basal serum calcitonin measurement for early diagnosis of medullary thyroid carcinoma in seven hundred seventy-three patients with nodular goiter. *Thyroid* **9**, 579–582 (1999).
27. Pacini, F. *et al.* European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European Journal of Endocrinology* **154**, 787–803 (2006).

28. Costante, G. & Filetti, S. Early Diagnosis of Medullary Thyroid Carcinoma: Is Systematic Calcitonin Screening Appropriate in Patients with Nodular Thyroid Disease? *The Oncologist* **16**, 49–52 (2011).
29. Frank-Raue, K., Schott, M., Raue, F. & DGE, im N. der S. S. der. Empfehlung zum Calcitonin-Screening bei Struma nodosa. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **143**, 1065–1069 (2018).
30. Toledo, S. P. A. *et al.* Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma. *Clinics* **64**, 699–706 (2009).
31. Guyétant, S. *et al.* Sex-related C cell hyperplasia in the normal human thyroid: A quantitative autopsy study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**, 42–47 (1997).
32. d'Herbomez, M. *et al.* Reference range of serum calcitonin levels in humans: Influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *European Journal of Endocrinology* **157**, 749–755 (2007).
33. Aloia JF, Rasulo P, Deftos LJ, Vaswani A, Yeh JK. Exercise-induced hypercalcemia and the calciotropic hormones. *J Lab Clin Med.* 1985 Sep;106(3):229-32.
34. Simmons, R. E. *et al.* Renal metabolism of calcitonin. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **254**, 593–600 (1988).
35. Garancini, S., Ballada, L., Roncari, G. & Gastaldi, L. Calcitonin in chronic renal failure. *Nephron* **34**, 224–227 (1983).
36. Niccoli, P. *et al.* Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *European Journal of Endocrinology* **132**, 75–81 (1995).
37. Yiakoumakis, E. *et al.* Calcitonin concentrations in lung cancer and non-malignant pulmonary diseases. *Oncology* **44**, 145–149 (1987).

38. Machens, A. *et al.* Hypercalcitoninemia in a sporadic asymptomatic neuroendocrine tumor of the pancreatic tail. *Digestive Surgery* **17**, 522–524 (2000).
39. Uccella, S. *et al.* Calcitonin-Producing Neuroendocrine Neoplasms of the Pancreas: Clinicopathological Study of 25 Cases and Review of the Literature. *Endocrine Pathology* **28**, 351–361 (2017).
40. Albores-Saavedra, J., Monforte, H., Nadji, M. & Morales, A. R. C-cell hyperplasia in thyroid tissue adjacent to follicular cell tumors. *Human Pathology* **19**, 795–799 (1988).
41. Poppe, K. *et al.* Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid* **9**, 1211–1214 (1999).
42. Borges, M. F., Abelin, N. M. A., Menezes, F. O. M., Dahia, P. L. M. & Toledo, S. P. A. Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clinical Endocrinology* **49**, 69–75 (1998).
43. Body, J. J., Demeester-Mirkine, N., Borkowski, A., Suciú, S. & Corvilain, J. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **62**, 700–703 (1986).
44. Karanikas, G. *et al.* Frequency and Relevance of Elevated Calcitonin Levels in Patients with Neoplastic and Nonneoplastic Thyroid Disease and in Healthy Subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 515–519 (2004).
45. Barbot, N. *et al.* Chronic Autoimmune Thyroiditis and C-cell Hyperplasia. Study of Calcitonin Secretion in 24 Patients. *Ann Endocrinol* (1991).
46. Batista, R., Toscanini, A., Brandão, L. & Cunha-Neto, M. B. False positive results using calcitonin as a screening method for medullary thyroid carcinoma. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **17**, 524 (2013).

47. Grani, G. *et al.* Interpretation of serum calcitonin in patients with chronic autoimmune thyroiditis. *Endocrine-Related Cancer* **19**, 345–349 (2012).
48. Cote, G. J. & Gagel, R. F. Dexamethasone differentially affects the levels of calcitonin and calcitonin gene-related peptide mRNAs expressed in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 15524–15528 (1986).
49. Freston, J. W. Omeprazole, hypergastrinemia, and gastric carcinoid tumors. *Annals of Internal Medicine* **121**, 232–233 (1994).
50. Klinkenberg-Knol, E. C. *et al.* Long-term omeprazole treatment in resistant gastroesophageal reflux disease: Efficacy, safety, and influence on gastric mucosa. *Gastroenterology* **118**, 661–669 (2000).
51. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Fisiologia*. (2012).
52. Ferrand, A. & Wang, T. C. Gastrin and cancer: A review. *Cancer Letters* **238**, 15–29 (2006).
53. Dockray, G. J. Gastrin. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **18**, 555–568 (2004).
54. Ryberg, B. *et al.* Gastrin stimulates the self-replication rate of enterochromaffinlike cells in the rat stomach. Effects of omeprazole, ranitidine, and gastrin-17 in intact and antrectomized rats. *Gastroenterology* **99**, 935–942 (1990).
55. Lindström, E., Chen, D., Norlén, P., Andersson, K. & Håkanson, R. Control of gastric acid secretion: The gastrin-ECL cell-parietal cell axis. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **128**, 503–511 (2001).
56. Schubert, M. L. Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acid secretion. *Current Opinion in Gastroenterology* **33**, 430–438 (2017).

57. Festen, H. P. M. *et al.* Effect of single and repeated doses of oral omeprazole on gastric acid and pepsin secretion and fasting serum gastrin and serum pepsinogen I levels. *Digestive Diseases and Sciences* **31**, 561–566 (1986).
58. Neumann, W. L., Coss, E., Rugge, M. & Genta, R. M. Autoimmune atrophic gastritis-pathogenesis, pathology and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **10**, 529–541 (2013).
59. Pounder R. Histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1988 Jul;2(3):593-608.
60. Lind, T., Cederberg, C., Forssell, H., Olausson, M. & Olbe, L. Relationship between reduction of gastric acid secretion and plasma gastrin concentration during omeprazole treatment. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **23**, 1259–1266 (1988).
61. Cooper CW, Schwesinger WH, Mahgoub AM, Ontjes DA. Thyrocalcitonin: stimulation of secretion by pentagastrin. *Science.* 1971 Jun 18;172(3989):1238-40.
62. Care, A. D. *et al.* Role of pancreozymin-cholecystokinin and structurally related compounds as calcitonin secretagogues. *Endocrinology* **89**, 262–271 (1971).
63. Hennessy, J. F., Wells, S. A., Ontjes, D. A. & Cooper, C. W. A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **39**, 487–495 (1974).
64. Machens, A., Hauptmann, S. & Dralle, H. Medullary thyroid cancer responsiveness to pentagastrin stimulation: An early surrogate parameter of tumor dissemination? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 2234–2238 (2008).

65. Parthemore, J. G. & Deftos, L. J. Calcitonin secretion in normal human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **47**, 184–188 (1978).
66. Sakorafas, G. H., Nasikas, D., Thanos, D. & Gantzoulas, S. Incidental thyroid C cell hyperplasia: Clinical significance and implications in practice. *Oncology Research and Treatment* **38**, 249–252 (2015).
67. Erdogan MF, Gursoy A, Kulaksizoglu M. Long-term effects of elevated gastrin levels on calcitonin secretion. *J Endocrinol Invest*. 2006 Oct;29(9):771-5.
68. Sizemore GW, Go VL, Kaplan EL, Sanzenbacher LJ, Holtermuller KH, Arnaud CD. Relations of calcitonin and gastrin in the Zollinger-Ellison syndrome and medullary carcinoma of the thyroid. *N Engl J Med*. 1973 Mar 29;288(13):641-4.
69. Perry, A., Molberg, K. & Albores-Saavedra, J. Physiologic versus neoplastic C-cell hyperplasia of the thyroid: Separation of distinct histologic and biologic entities. *Cancer* **77**, 750–756 (1996).
70. Minalyan, A., Benhammou, J. N., Artashesyan, A., Lewis, M. S. & Pisegna, J. R. Autoimmune atrophic gastritis: Current perspectives. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **10**, 19–27 (2017).
71. Carmel, R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Archives of Internal Medicine* **156**, 1097–1100 (1996).
72. Cellini, M. *et al.* Hashimoto's thyroiditis and autoimmune gastritis. *Frontiers in Endocrinology* **8**, 1–5 (2017).
73. de Block, C. E. M., de Leeuw, I. H. & van Gaal, L. F. Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: A clinically oriented review. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 363–371 (2008).

74. Amerio, P. *et al.* Vitiligo associated with other autoimmune diseases: Polyglandular autoimmune syndrome types 3B + C and 4. *Clinical and Experimental Dermatology* **31**, 746–749 (2006).
75. Zelissen, P. M. J., Bast, E. J. E. G. & Crougns, R. J. M. Associated autoimmunity in addison's disease. *Journal of Autoimmunity* **8**, 121–130 (1995).
76. Lahner, E. *et al.* Occurrence and Risk Factors for Autoimmune Thyroid Disease in Patients with Atrophic Body Gastritis. *American Journal of Medicine* **121**, 136–141 (2008).
77. Coati, I. *et al.* Autoimmune gastritis: Pathologist's viewpoint. *World Journal of Gastroenterology* **21**, 12179–12189 (2015).
78. Hall, S. N. & Appelman, H. D. Autoimmune gastritis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **143**, 1327–1331 (2019).
79. Annibale, B., Esposito, G. & Lahner, E. A current clinical overview of atrophic gastritis. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* **14**, 93–102 (2020).
80. Rugge, M. *et al.* OLGA staging for gastritis: A tutorial. *Digestive and Liver Disease* **40**, 650–658 (2008).
81. Rugge, M. *et al.* Gastritis staging in clinical practice: The OLGA staging system. *Gut* **56**, 631–636 (2007).
82. Rugge, M. *et al.* Gastric cancer prevention targeted on risk assessment: Gastritis OLGA staging. *Helicobacter* **24**, (2019).
83. Rusak, E., Chobot, A., Krzywicka, A. & Wenzlau, J. Anti-parietal cell antibodies - Diagnostic significance. *Advances in Medical Sciences* **61**, 175–179 (2016).

84. Peracchi, M. *et al.* Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *European Journal of Endocrinology* **152**, 443–448 (2005).
85. Borch, K., Stridsberg, M., Burman, P. & Rehfeld, J. F. Basal chromogranin A and gastrin concentrations in circulation correlate to endocrine cell proliferation in type-A gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **32**, 198–202 (1997).
86. Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Rehfeld JF. Serum calcitonin in hypergastrinaemia due to achlorhydria. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1977 Sep;86(1):140-5.
87. Becker, K. L., Silva, O. L., Cyrus, J., Snider, R. H. & Moore, C. F. Hypercalcitonemia in pernicious anemia. *Experientia* **36**, 1330–1331 (1980).
88. Brandsborg, M., Nielsen, H. E., Brandsborg, O., Olsen, K. J. & Løvgreen, N. A. The role of serum gastrin in the secretion of calcitonin: Studies in patients with pernicious anaemia and in healthy subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **15**, 23–28 (1980).
89. Heynen, G. *et al.* Lack of clinical and physiological relationship between gastrin and calcitonin in man. *European Journal of Clinical Investigation* **11**, 331–335 (1981).
90. Lamers, C. B. H., Hackeng, W. H. L., Thien, T. & van Tongeren, J. H. M. Serum concentrations of immunoreactive calcitonin in patients with hypergastrinaemia. *Digestion* **20**, 379–382 (1980).
91. Caturegli, P., Remigis, A. de & Rose, N. R. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews* 1–7 (2014)

92. Ralli, M. *et al.* Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmunity Reviews* **19**, 102649 (2020).
93. Ajjan, R. A. & Weetman, A. P. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Hormone and Metabolic Research* **47**, 702–710 (2015).
94. Wu, G., Zou, D., Cai, H. & Liu, Y. Ultrasonography in the diagnosis of Hashimoto's thyroiditis. *Frontiers in Bioscience - Landmark* **21**, 1006–1012 (2016).
95. Ragusa, F. *et al.* Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **33**, 101367 (2019).
96. Fiore, E., Rago, T., Ruggeri, R. M., Trimarchi, F. & Vitti, P. La tiroidite di Hashimoto: proposta di aggiornamento dei criteri diagnostici. *L'Endocrinologo* **19**, 31–37 (2018).
97. Inoue S, Yokoyama S, Nakayama I, Noguchi S. An immunohistochemical study of calcitonin-containing cells in benign and malignant thyroid lesions. *Acta Pathol Jpn.* 1990 Mar;40(3):187-92.
98. Katoh, R. C CELLS IN HASHIMOTO'S THYROIDITIS Ultrastructural and Immunohistochemical Observations. *Pathology International* **37**, 1611–1620 (1987).
99. Libbey NP, Nowakowski KJ, Tucci JR. C-cell hyperplasia of the thyroid in a patient with goitrous hypothyroidism and Hashimoto's thyroiditis. *Am J Surg Pathol.* 1989 Jan;13(1):71-7.
100. Guyetant, S. *et al.* C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: A retrospective quantitative study of 112 cases. *Human Pathology* **25**, 514–521 (1994).

101. Nardi, F. *et al.* Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *Journal of Endocrinological Investigation* **37**, 593–599 (2014).
102. Mian, C. *et al.* Refining calcium test for the diagnosis of medullary thyroid cancer: Cutoffs, procedures, and safety. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99**, 1656–1664 (2014).