



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE**

Curriculum: Biotecnologie Endocrinologiche Molecolari e Rigenerative

CICLO XXXV

COORDINATORE Prof. Fabrizio Chiti

***Dosaggio precoce della calcitonina nei pazienti affetti da carcinoma  
midollare tiroideo senza metastasi a distanza:  
significato clinico e ruolo prognostico***

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

**Dottorando**

Dott. Clotilde Sparano

**Tutore**

Prof. Mario Maggi

**Coordinatore**

Prof. Fabrizio Chiti

Anni 2019/2022

# Sommario

<b>1. Introduzione</b> .....	4
<b>1.2 Epidemiologia</b> .....	6
<b>1.2.1 Forme ereditarie</b> .....	8
<b>1.3. Diagnosi</b> .....	11
<b>1.3.1 Biochimica</b> .....	11
<b>1.3.2 Test provocativi</b> .....	12
<b>1.3.3 Citologia e dosaggio della CT su liquido di lavaggio dell'agoaspirato</b> .....	14
<b>1.3.4 Screening genetico e sindromi associate</b> .....	16
<b>1.4. Terapia chirurgica e stadiazione</b> .....	19
<b>1.4.1 Chirurgia</b> .....	19
<b>1.4.2 Istologia e TNM</b> .....	22
<b>1.4.2.1 Peculiarità istologiche</b> .....	22
<b>1.4.2.2 Stadiazione Tumour-Node-Metastasis</b> .....	23
<b>1.4.2.3 Numero di linfonodi metastatici e <i>lymph node ratio</i></b> .....	24
<b>1.4.3 Stadiazione radiologica</b> .....	25
<b>1.4.4 Medicina Nucleare</b> .....	26
<b>1.5. Monitoraggio e fattori prognostici</b> .....	29
<b>1.5.1 Nuovi marcatori</b> .....	29
<b>1.5.1.1 Ruolo del Ca19.9 e del fattore di rilascio della pro-gastrina</b> .....	29
<b>1.5.1.2 Biopsia liquida</b> .....	30
<b>1.5.2 Fattori prognostici</b> .....	31
<b>1.5.2.1 Fattori biochimici: Calcitonina e CEA <i>doubling time</i></b> .....	32
<b>1.5.2.2 Fattori molecolari</b> .....	33
<b>1.6. Cenni di terapia medica</b> .....	36
<b>2. Obiettivo della tesi</b> .....	39
<b>3. Materiali e Metodi</b> .....	40
<b>3.1 Analisi Statistica</b> .....	41
<b>4. Risultati</b> .....	42
<b>5. Discussione</b> .....	50
<b>6. Conclusioni</b> .....	53
<b>7. Referenze</b> .....	54



# 1. Introduzione

Il carcinoma midollare tiroideo (CMT) rappresenta un raro tumore, potenzialmente aggressivo, ad origine dalle cellule parafollicolari (o cellule C) di tipo neuroendocrino. Rispetto alla controparte dei tumori ad origine follicolare, il CMT costituisce solo il 5% di tutte le neoplasie della tiroide (1) e, nonostante la lunga sopravvivenza media, esso presenta all'esordio un alto tasso di metastasi linfonodali (dal 50% al 90%) (2,3) e, nel 10% dei casi, metastasi a distanza (1). Sebbene la maggior parte dei CMT si configuri come tumore sporadico, circa il 25% dei casi presenta, in realtà, una predisposizione genetica dovuta a una mutazione germinale del gene *RET*, responsabile anche di altre neoplasie endocrine, raggruppate nell'ambito della sindrome da Neoplasia Endocrina Multipla di tipo 2 (Multiple Endocrine Neoplasia 2, MEN2) (1).

Al di fuori dell'ambito familiare, mutazioni del gene *RET* possono essere riscontrate fino all'80% dei casi a livello somatico, associandosi generalmente ad una maggior aggressività biologica del CMT (4).

Il primo approccio terapeutico per questi tumori è rappresentato dalla tiroidectomia totale, associata a linfadenectomia, la cui estensione è tuttora oggetto di dibattito, mentre non è previsto sistematicamente un trattamento adiuvante post-chirurgico (1,2).

Dal punto di vista terapeutico, negli ultimi anni, sono stati realizzati numerosi progressi, grazie all'approvazione di alcuni inibitori tirosin-chinasici ad ampio spettro (vandetanib e cabozantinib) (5,6), seguiti dai più recenti inibitori diretti di *RET*, nei casi che presentano tali mutazioni (7). Tuttavia, queste terapie sono riservate ai pazienti con patologia avanzata ed alto carico tumorale, nell'ottica di ridurre il volume di malattia e prolungare la sopravvivenza. Al contrario, la maggior parte dei pazienti va in contro a un lungo monitoraggio biochimico e strumentale, senza trattamenti attivi.

Pochi progressi sono stati fatti nell'ambito dei fattori prognostici e dei marcatori di malattia. Infatti, la presa in carico tradizionale del CMT prevede controlli seriati di calcitonina (CT) – suo specifico marcatore oncologico – e dell'antigene carcinoembrionario (CEA) – meno specifico,

ma associato a maggior aggressività tumorale – e la valutazione dei loro tempi di raddoppiamento, la cui rapida ascesa sottende una progressione morfologica di malattia (1). In particolare, le valutazioni della CT rappresentano tuttora il marcatore più specifico nell’ambito di questa patologia, sebbene nell’interpretazione di questi valori vadano considerati alcuni aspetti. Ad esempio, da un punto di vista fisiologico, la CT umana non è prodotta esclusivamente dalla tiroide, in quanto cellule C sono presenti anche a livello dei polmoni, dell’intestino tenue, del timo, del fegato e delle paratiroidi (8). D’altro canto, i livelli di CT sono anche influenzati da diverse condizioni patologiche, come l’insufficienza renale, infezioni o altre neoplasie, oppure da alcuni farmaci (1).

In generale, vi è comune accordo sul valore prognosticamente sfavorevole di elevati livelli postoperatori di CT – i.e. >150 pg/ml – mentre non vi sono evidenze disponibili sul significato di valori post-chirurgici bassi, ma dosabili (1). In questo caso, le vigenti linee guida consigliano un primo dosaggio della CT a 3 mesi dall’intervento e poi semestralmente il primo anno (1). Tuttavia, la CT postoperatoria può richiedere diversi mesi per raggiungere il suo nadir (1,9), per tale ragione, sono necessarie alcune valutazioni consecutive dell’ormone. Nel caso in cui i livelli si stabilizzino su valori normali o bassi, essi non sono necessariamente legati al CMT, ma possono celare comunque una malattia micrometastatica (1), nonostante la negatività delle indagini radiologiche. Infatti, fino al 60% dei pazienti mostra livelli post-operatori di CT dosabili e, talvolta, elevati (10), rivelando nel tempo la persistenza di malattia, più frequentemente a livello linfonodale o loco-regionale (11). Infine, nonostante le indicazioni delle linee guida internazionali (1), il monitoraggio biochimico e le cadenze dei controlli post-operatorio sono poco uniformi tra i centri.

Nell’insieme, sono molti gli aspetti ancora non chiariti della presa in carico di questa rara neoplasia. In particolare, la finestra iniziale del monitoraggio clinico biochimico è ancora orfana di validi fattori prognostici, specie nei casi privi di metastasi a distanza, in cui è plausibile attendersi una guarigione dopo intervento chirurgico. Infatti, l’interpretazione degli esami ematici e strumentali presenta ancora degli aspetti controversi e richiede future indagini per chiarire l’effettivo rischio di persistenza di malattia in vari sottogruppi di pazienti.

## 1.2 Epidemiologia

Il CMT rappresenta uno degli istotipi tumorali più rari nell'ambito delle neoplasie tiroidee, costituendo meno del 5% di tutti i tumori diagnosticati (1,12). I tassi di incidenza a cui si fa riferimento sono, tuttavia, ancorati a percentuali *storiche* e numerose criticità cliniche e patologiche ostacolano considerazioni epidemiologiche più fini, che sono, invece, abituali per l'ampia controparte dei tumori ad origine follicolare.

A sommarsi alle difficoltà statistiche di una neoplasia rara, alla disomogeneità dei registri nazionali e alle attese difformità diagnostiche appannaggio dei diversi contesti ospedalieri, si aggiunge la difficoltà nel categorizzare correttamente le forme sporadiche ed ereditarie. Infatti, una quota sostanziale di CMT è causata da mutazioni germinali del gene *RET* (circa il 25% del totale)(1): le cosiddette forme familiari nell'ambito della Sindrome MEN2. Per queste ultime, l'inquadramento è ancora lacunoso a causa di gap diagnostici ed economici tra i vari centri, motivo per cui adeguate tempistiche e standard metodologici restano prerogativa delle sole strutture di terzo livello. In quest'ottica, una stima fedele di eventuali modifiche dei trend di incidenza è destinata, al momento, a rimanere parziale e la quota parte di casi che sfuggono alla corretta categorizzazione – cioè in “sporadici” o “ereditari” - distorce in maniera non marginale una panoramica epidemiologica più puntuale.

Al netto di queste considerazioni, gli studi di popolazione disponibili osservano nella maggior parte dei casi l'assenza di un vero e proprio trend in crescita del CMT (13–17). Secondo uno studio globale che ha coperto gli anni 1998-2012, i tassi di incidenza standardizzati per età non hanno mai superato 1 caso su 100000 per le donne (con un picco italiano di 0.8 casi/100000) e oscillano tra lo 0.2 e lo 0.4 casi ogni 100000 per gli uomini (con picco a 0.62 in Austria) (13). Solo la Cina e la Turchia hanno mostrato un incremento temporale significativo per tutte gli istotipi tumorali tiroidei, incluso il CMT (13) (Figura 1). Tra le distorsioni di questa analisi, vi è

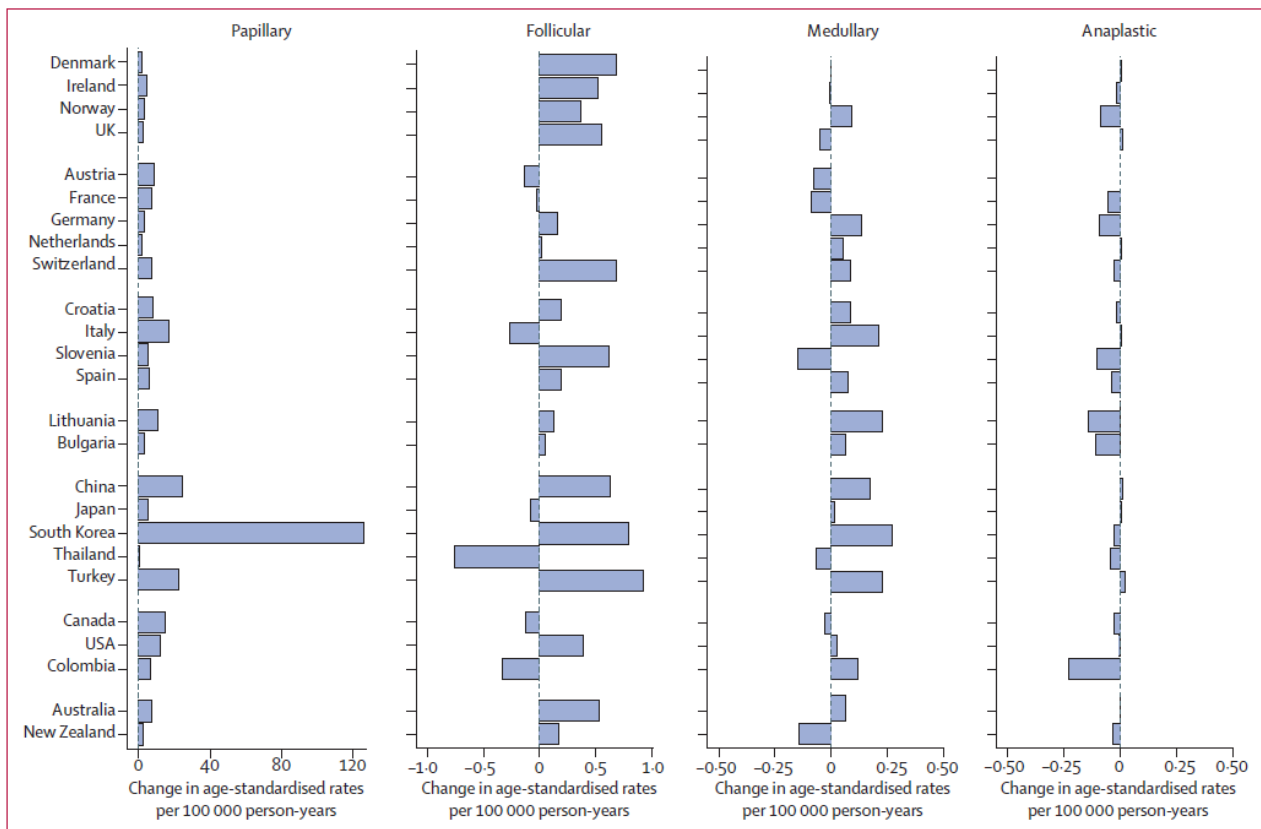


Figura 1. Rappresentazione grafica dei cambiamenti assoluti di incidenza standardizzata per età dei tumori tiroidei, secondo l'istotipo, nelle donne, negli anni 1998–2002 and 2008–12. Tratto da Miranda-Filho et al. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2021; 9: 225–34.

un *bias* di selezione che ha escluso popolazioni con numerosità inferiore ai 2 milioni di abitanti, offrendo una panoramica ampia, ma comunque circoscritta a *sol*i 25 paesi (13).

Altri studi, basati su registri di singole nazioni, mostrano risultati parzialmente differenti.

Ad esempio, stime ottenute dai registri norvegesi (15) hanno osservato un progressivo incremento delle diagnosi di CMT dal 1994 al 2016, attribuibile, però, ad un netto miglioramento delle tecniche diagnostiche e dei dosaggi della CT, riflesso di una diagnosi più precoce e di una minor estensione delle neoplasie negli anni più recenti. Nello stesso periodo, i registri sloveni (18) hanno confermato un analogo trend in incremento, con circa il 3.6% di casi in più ogni anno dal 1995 al 2015 e un'incidenza significativamente maggiore rispetto ad altri stati come Irlanda e Danimarca. Infatti, studi retrospettivi ottenuti da questi ultimi due registri, non hanno osservato nessun cambiamento nei tassi di incidenza del CMT, considerando sia le forme sporadiche, che ereditarie (19,20). Infine, in controtendenza, uno studio olandese focalizzato su pazienti pediatrici e giovani adulti, ha constatato una riduzione nel tempo dell'incidenza di CMT in questa fascia di età,

contrariamente a quanto avvenuto per le forme di neoplasia tiroidea differenziata ad origine follicolare (21).

### **1.2.1 Forme ereditarie**

La diagnosi delle forme di CMT ereditario è relativamente recente, poiché solo 25 anni fa fu effettivamente sancita la necessità di un test molecolare per identificare i casi di neoplasia ereditaria attraverso uno screening genetico esteso ai familiari del caso indice (22,23).

Pochi studi si sono focalizzati esclusivamente sull'epidemiologia dei CMT familiari e, tra i maggiori contributi in quest'ambito, troviamo quelli sulla MEN2A: sottotipo di MEN2 caratterizzato dalla presenza di CMT (100% dei casi, con aggressività variabile), feocromocitoma (dal 10% al 50% dei casi) e iperparatiroidismo primitivo (dal 10% al 20% dei casi) (1,24). Ad esempio, un ampio studio nazionale danese (25) ha mostrato un tasso di incidenza per MEN2A stabile per oltre un secolo a circa 28 casi per milioni di abitanti/anno (dal 1971 al 2000), ma con valori nettamente superiori rispetto ad altre nazioni. In Norvegia (25,26) il tasso di incidenza del periodo corrispondente è stato di circa 15 casi/milione, mentre Machens e Colleghi (27,28), pur osservando in Germania un raddoppiamento dell'incidenza di MEN2A, da 5.0 (1951–1960) a 9.9 (1991–2000) casi per milioni di nati vivi nel corso degli anni, non hanno comunque evidenziato numeri comparabili ai precedenti registri. Sebbene una spiegazione definitiva ai tassi danesi non sia stata trovata, una parziale giustificazione a tali risultati risiede nell'effetto fondatore della mutazione C611Y del gene *RET*, significativamente rappresentata in Danimarca (74% delle MEN2A) (25). A questo riguardo, confronti tra dati presenti in letteratura hanno ricostruito una differente prevalenza geografica di alcune varianti del gene *RET*, sottendendo un'antica ereditarietà genetica circoscritta a precise regioni europee e consolidata nel tempo nella popolazione indigena (28). Ad esempio, in Italia la mutazione V804M rappresenta largamente la variante più frequente (circa 20%), seguita dalla C634A (14%) (29); mentre la Germania mostra un ascendente L790F (12%) e la Polonia quello Y791F (19%) (28). Questi dati, per quanto oggettivati in termini numerici, sono ovviamente relativi in termini assoluti, poiché solo uno



screening di massa offrirebbe una panoramica esaustiva dello spettro *etnico* del gene *RET*. Analogamente, la presenza di varianti con minore penetranza (ad esempio la mutazione V804M) (30) ha probabilmente indotto una distorsione sistematica al ribasso nella ricerca dei portatori, poiché familiari più anziani (come nonni o genitori), con anamnesi negativa per patologia, sono spesso erroneamente categorizzati come non portatori *ex ante*, in virtù della sola storia clinica, sottostimando l'effettiva prevalenza della mutazione nella popolazione.

In conclusione, nonostante i numerosi progressi nell'analisi epidemiologica - intesa sia in termini geografici, che puramente genetici – l'attuale rappresentazione dei CMT ereditari è probabilmente ancora distante dai dati reali.

Più in generale, la maggior parte delle sindromi MEN2A è sostenuta da mutazioni nei codoni 609,611,618 o 620 dell'esone 10 o dal codone 634 dell'esone 11 (24). Quest'ultima mutazione si associa ad un'elevata aggressività biologica di malattia con esordio del CMT sin dall'età pediatrica e sviluppo di feocromocitoma dal 50 al 90% dei casi nel corso degli anni, a differenza del circa 25%-50% osservato nelle altre mutazioni (1,24). Più rara, ma in assoluto più aggressiva è la mutazione del codone M918T sull'esone 16, associata a sindrome MEN2B, caratterizzata dallo sviluppo di CMT e feocromocitoma, ma non da iperparatiroidismo primitivo (1) (vedi sezione dedicata).

Nell'adulto, la diagnosi di MEN2A spesso avviene in seguito al riscontro di CMT e si associa alla valutazione delle altre neoplasie associate, cioè il feocromocitoma e l'iperparatiroidismo. Nei familiari del caso indice che risultano portatori della mutazione, invece, viene predisposto uno screening biochimico e strumentale a cadenza generalmente annuale, volto ad intercettare l'insorgenza precoce di CMT e delle altre neoplasie (1).

Particolari considerazioni vanno, invece, effettuate in ambito pediatrico e riguardo la chirurgia profilattica durante l'infanzia (1,24). In particolare, i bambini affetti da mutazione nel codone M918T hanno indicazione ad effettuare tiroidectomia entro il primo anno di vita, data l'elevata aggressività del CMT. Nei casi di mutazione A883 e C634, l'intervento può essere posticipato fino a massimo i cinque anni di vita, in presenza di valori di CT permissivi. Mentre in tutti gli altri casi, i bambini portatori di altre mutazioni a minor aggressività dovrebbero essere sottoposti

a screening biochimico e strumentale dall'età di cinque anni con cadenza semestrale o annuale. Tuttavia, ai genitori preoccupati per l'eccessiva medicalizzazione del bambino, viene lasciata l'opzione di una chirurgia profilattica precoce in alternativa al monitoraggio stretto (1).

## 1.3. Diagnosi

### 1.3.1 Biochimica

Il CMT rappresenta un istotipo tumorale di origine neuroendocrina, derivato dalle cellule parafollicolari tiroidee – anche dette cellule C – produttori CT, a partire dal precursore procalcitonina (proCT). La CT è un peptide monomero di 32 aminoacidi e rappresenta il marcatore più specifico per CMT, sia in fase diagnostica, che di follow-up (1). L'origine comune alla proCT spiega perché stati di sepsi o semplici infezioni acute possano determinare aumenti dell'ormone non correlati alla presenza di neoplasia; analogamente, condizioni di insufficienza renale, alcuni tumori neuroendocrini, la presenza di anticorpi eterofili e l'uso di alcuni farmaci (come gli inibitori di pompa protonica) possono causare anch'essi aumenti transitori o persistenti di questo ormone (1). È noto che gli uomini presentano livelli normali di CT mediamente più elevati rispetto alle donne e che un alto indice di massa corporea o l'abitudine al fumo possano incrementarne ulteriormente i livelli basali. Tuttavia, su riserva di una buona sensibilità del metodo di laboratorio utilizzato, fino all'88% dei soggetti adulti sani presenta valori di CT indosabili, mentre solo il 10% della popolazione presenta valori superiori ai convenzionali limiti di riferimento di 10 pg/ml (1,31). Fanno eccezione i neonati e i bambini da 1 fino a 3 anni di età, che possono avere livelli circolanti di CT fisiologicamente elevati (1,32). Per tali ragioni, il dosaggio della CT in corso di indagini per tireopatia nodulare è stato spesso auspicato nella routine clinica, benché non formalmente indicato dalle vigenti linee guida (33–36). Il riscontro di valori di CT >100 pg/ml è altamente suggestivo di CMT e, quindi, unitamente all'opportuna diagnostica radiologica, supporta autonomamente l'indicazione chirurgica (1,35). Tuttavia, livelli compresi tra i 10 e i 100 pg/ml possono essere riscontrati fino al 7% dei soggetti con tireopatia nodulare, ma costituiscono una zona grigia, che richiede ulteriori approfondimenti per supportare la diagnosi (35,37). Condizioni come tiroidite autoimmune e la presenza di microcarcinomi tiroidei di origine follicolare sono stati spesso associati a valori basali di CT superiori alla norma, a causa di una presunta stimolazione paracrina che determina iperplasia delle cellule C o per la produzione di fattori ormonali che favoriscono il rilascio di CT (35). Tuttavia, tali associazioni

sono ancora controverse e uno studio su un ampio campione di oltre 3000 pazienti non ha riscontrato nessuna differenza tra i valori di CT nei soggetti con tiroidite autoimmune/neoplasia tiroidea non-CMT e soggetti senza queste condizioni, invitando a non sottovalutare la presenza di ipercalcitoninemia nei soggetti con tiroidite e a proseguire l'opportuno iter diagnostico (35).

Il ruolo della proCT in fase diagnostica è stato valutato da alcuni studi (38,39) con risultati parzialmente discordanti riguardo al suo valore predittivo positivo, mentre viene sostanzialmente riconosciuta la sua utilità in termini di valore predittivo negativo, poiché valori indosabili di proCT sembrano escludere efficacemente una diagnosi di CMT (38).

D'altro canto, in presenza di valori di CT prossimi o  $>500$  pg/ml il rischio di metastasi a distanza da CMT è concreto ed è necessario procedere con una diagnostica strumentale estesa per stadiare adeguatamente la malattia (1).

Un marcatore di CMT non specifico è il CEA. Esso rappresenta, in realtà, una famiglia di circa 36 glicoproteine e può essere prodotto in elevate quantità sia dalle cellule neoplastiche del CMT, che da neoplasie dell'apparato gastrointestinale, da cui l'assenza di una specificità tumorale. I valori di CEA vengono convenzionalmente testati in fase diagnostica, ma sono utili per lo più in fase post-chirurgica, dove è attesa una loro normalizzazione, mentre l'incremento può associarsi a ripresa o progressione di malattia (1).

### **1.3.2 Test provocativi**

In presenza di valori dubbi e condizioni patologiche confondenti è suggerita l'esecuzione di un test provocativo che valuti i livelli di CT stimolata (1). Infatti, i fattori che determinano ipercalcitoninemia al di fuori del CMT non risentono della stimolazione con specifici secretagoghi (1) e la combinazione di CT basale e stimolata porta i valori di sensibilità e specificità di questo marcatore prossimi al 100% (40). Tali test sono stati anche auspicati nel caso di forme ereditarie in pazienti pediatriche per decidere le tempistiche della tiroidectomia e nei casi di CMT operati con valori dosabili di CT, ma senza chiara ripresa di malattia (1). Tuttavia, le stesse linee guida non hanno stabilito un preciso protocollo per questi test e numerose difficoltà

analitiche e nell'individuazione di cut-off univoci impongono almeno una "standardizzazione interna" al centro che effettua i dosaggi, onde limitare errori interpretativi (1).

I secretagoghi utilizzati sono la pentagastrina e il calcio gluconato e, in entrambe le versioni del test, sono previsti dei dosaggi seriati di CT basale e dopo loro iniezione endovenosa. Nel passato, la maggiore esperienza clinica si è basata sull'utilizzo della pentagastrina (0.5µg/kg), di cui era stato individuato un protocollo sostanzialmente condiviso con dosaggi al basale e poi a 3 e 5 minuti dopo l'infusione, assieme a specifici cut-off per i valori di CT (Tabella 1) (41,42).

<b>Picco di calcitonina stimolata (pg/ml)</b>	<b>Significato clinico</b>
<10	Assenza di patologia delle cellule C
>10 ma <100	Risultato indeterminato (verosimile falso positivo)
>100 ma <500	Verosimile iperplasia delle cellule C
>500 ma <1000	Verosimile carcinoma midollare tiroideo
>1000	Carcinoma midollare tiroideo

Adattato da "Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2009 Jan;5(1):35-44. doi: 10.1038/ncpendmet1023. PMID: 19079272".

Tuttavia, la progressiva irreperibilità della pentagastrina ha reso necessario un ritorno al test con calcio gluconato, sul cui protocollo esistono, però, ulteriori incertezze in termini di esecuzione e soglie interpretative (42). Analogamente a quello con pentagastrina, il test al calcio prevede la somministrazione endovenosa rapida di circa 2.5 mg/kg di calcio gluconato, seguito da valutazioni seriate della CT (41,42).

In tutti i casi è richiesto che il paziente non abbia comorbidità cardiache e che il test venga svolto in un ambiente sanitario protetto per i possibili eventi avversi maggiori, tra cui quelli cardiovascolari (ad esempio aritmie, crisi ipertensive e dolore simil-anginoso) (41,42). La complessità e i potenziali eventi connessi a tali stimolazioni costituiscono un limite importante alla strutturazione di un protocollo universale, ma anche alla sua diffusione nella pratica clinica. Infine, con l'avvento dei dosaggi ad immunochemiluminescenza, gli attuali valori di CT sono

molto più accurati e l'utilizzo dei dosaggi di CT su liquido di lavaggio dell'agoaspirato ha contribuito a risolvere almeno una quota delle diagnosi citologiche dubbie o inconcludenti. Questi nuovi e maneggevoli strumenti hanno portato alcuni clinici a dubitare della necessità dei test provocativi (1), il cui ruolo andrebbe, quindi, ridimensionato a casi molto selezionati.

### 1.3.3 Citologia e dosaggio della CT su liquido di lavaggio dell'agoaspirato

Come tutte le neoplasie tiroidee, la diagnostica iniziale si basa sull'esecuzione di un'ecografia del collo, che consente la caratterizzazione morfologica del nodulo sospetto. La descrizione ecografica, però, non discrimina la natura delle lesioni, né in termini di benignità o malignità, né riguardo la possibile origine neuroendocrina, per cui ad essa deve seguire necessariamente un approfondimento citologico mediante agoaspirato (fine-needle aspiration, FNA). I criteri citologici che supportano la diagnosi di CMT prevedono la presenza di cellule

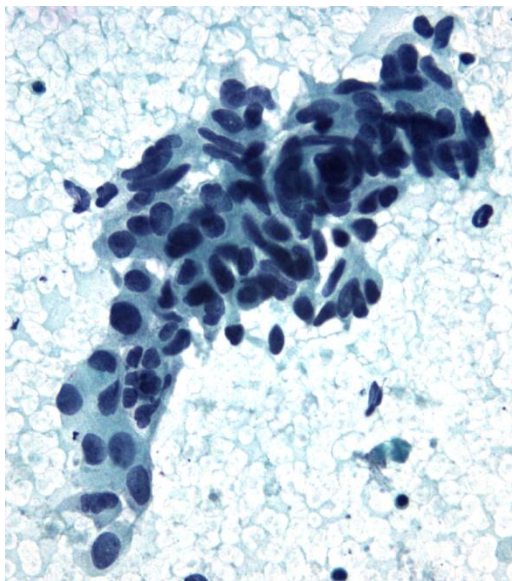
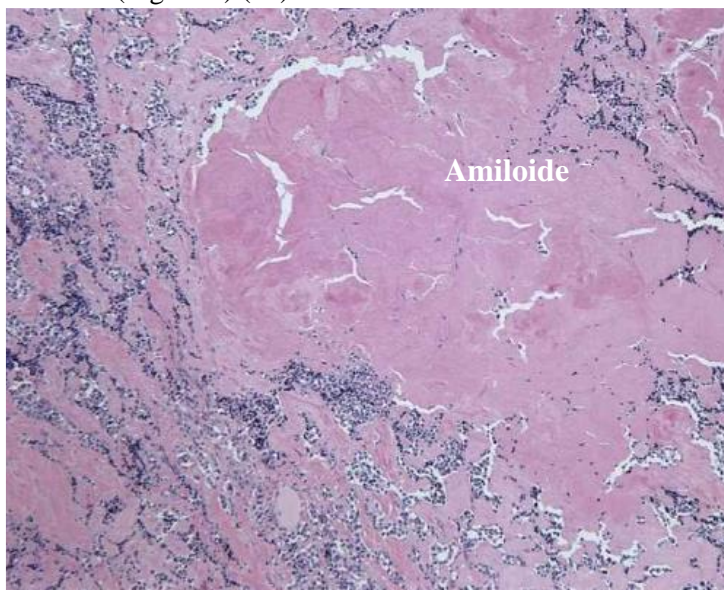


Figura 2. Aspetto citologico tipico di un carcinoma midollare tiroideo.

poligonali e/o triangolari, con granuli azzurrofilo nel citoplasma, una disposizione eccentrica dei nuclei con cromatina grossolana e la presenza di amiloide (Figura 2) (1). Tuttavia, le peculiarità cellulari del CMT rendono la citologia meno affidabile e l'interpretazione dei vetrini può spesso generare delle difficoltà. Infatti, le cellule del CMT possono assumere svariate forme, simulando i più diversi quadri patologici: ad esempio, nel caso di aspetti fusati, possono richiamare i sarcomi; i quadri epitelioidi sono simili ai tumori tiroidei follicolari, talvolta invece le caratteristiche fenotipiche evocano il plasmocitoma (1). L'amiloide può essere confusa con tireoglobulina, determinando diagnosi errate (43), inoltre, anche laddove correttamente riconosciuta, la sua

presenza non è patognomonica di CMT, ma può coesistere in alcune tipologie di gozzo o in alcune malattie linfoproliferative (Figura 3) (43).



*Figura 3. Rappresentazione di agglomerati di amiloide sparsi tra cordoni di cellule di carcinoma midollare tiroideo.*

Per tali motivi, di fronte ad una cellularità atipica, andrebbe sempre associato uno studio immunocitochimico che ricerchi l'espressione di CT, cromogranina A e/o CEA ed escluda marcatori tipici di altri tumori tiroidei come la tireoglobulina. Ciononostante, l'accuratezza diagnostica del solo FNA non è pienamente soddisfacente, essendo gravata da un alto tasso di falsi negativi, con una sensibilità diagnostica estremamente variabile, dal 20% all'86 % (44), che può migliorare fino al 89% in caso di immunocitochimica concorde (45). Un concreto miglioramento in termini diagnostici si è ottenuto associando al FNA il dosaggio della CT sul liquido di lavaggio dell'agoaspirato. Tale procedura è nota per migliorare l'accuratezza del FNA sui linfonodi sospetti per metastasi da carcinoma tiroideo di origine follicolare – utilizzando in questo caso il dosaggio della tireoglobulina – e consiste nell'effettuare la consueta aspirazione del nodulo per l'esame citologico, a cui segue il lavaggio dell'ago con 1.0 ml di soluzione fisiologica, sulla quale verranno dosati i valori di CT. Tali livelli saranno quindi ottenuti direttamente dal nodulo e possono supportare o escludere la diagnosi di CMT indipendentemente dal risultato citologico e/o dai livelli di CT sierici. La sensibilità del dosaggio di CT su liquido di lavaggio raggiunge il 95% (CI95%:96-100) (44) e migliora nettamente la diagnostica di queste neoplasie.

### 1.3.4 Screening genetico e sindromi associate

Il fatto che fino a un quarto dei casi di CMT sia di origine familiare impone uno

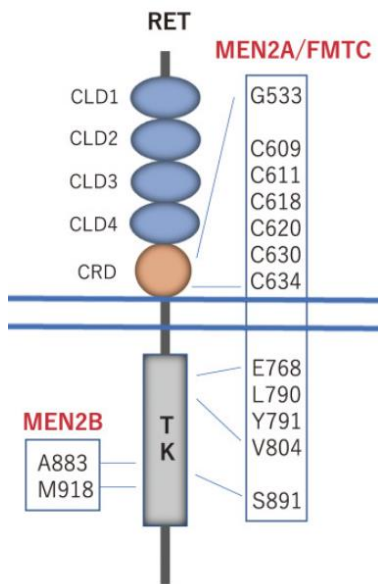


Figura 4. Mutazioni germinali del gene *RET* nell'ambito delle sindromi MEN. Adattato da Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2022 Mar 11; 98(3): 112–125. doi: 10.2183/pjab.98.008

screening genetico del paziente e, eventualmente, di tutti i consanguinei di primo grado alla ricerca di altri portatori. Il gene che determina lo sviluppo di forme di neoplasia familiare con ereditarietà autosomica dominante è l'oncogene *RET* (Figura 2). Dalla sua scoperta sono state individuate un numero crescente di mutazioni, che vengono continuamente aggiornate in uno specifico database: [https://arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2\\_welcome.php](https://arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2_welcome.php).

Il gene *RET* è implicato nello sviluppo di numerose neoplasie di origine endocrina e non-endocrina e viene valutato tramite sequenziamento genetico, a partire da un prelievo di sangue. Nell'ambito della patologia tiroidea, mutazioni germinali

determinano lo sviluppo di sindromi fenotipicamente differenti: la MEN2A, la MEN2B e il carcinoma midollare tiroideo familiare (FMTC) (1,46) (Figura 4).

- La MEN2A è la sindrome più frequente e oltre il 90% dei pazienti presenta una mutazione ereditata da altri membri della famiglia, sebbene con possibile diversa penetranza clinica (1). Tale sindrome si caratterizza per la presenza di CMT (100%) associato a variabili percentuali di feocromocitoma (circa 50%), iperparatiroidismo primitivo (circa 20%) e sporadici casi con lichen amiloide (osservati in presenza di mutazioni dei codoni 634 e 804) (1,46) (Tabella 2). Inoltre, il 7% dei pazienti può presentare la malattia di Hirschprung, con cui condivide un substrato genetico a livello dell'esone 10 (codoni 609,611,618 e 620) (1). Nel 95% delle MEN2A la mutazione è localizzata a livello di uno dei 6 residui di cisteina (nell'esone 10 a livello dei codoni 609, 611, 618 e 620 e nell'esone 11 a livello dei codoni 630 e 634) (Tabella 2), o della regione extracellulare in uno specifico dominio ricco di cisteina (46).



- La MEN2B è la forma sindromica più rara, ma molto aggressiva, con sviluppo di CMT precoce (già nell'infanzia) e rapida evoluzione clinica (1,46); il fenotipo dei pazienti è complesso e oltre al feocromocitoma, include la presenza di ganglioneuromi intestinali, habitus marfanoide e neuromi mucosi, ma non comprende l'iperparatiroidismo. A differenza della MEN2A, la MEN2B si caratterizza nel 75% dei casi per mutazioni *RET de novo*, mentre solo il 25% riconosce un'origine in famiglie con portatori noti (1).
- Il FMTC è il quadro più *semplice*, prevedendo lo sviluppo del solo CMT in fasi più tardive della vita. Tale definizione e il suo labile confine con la MEN2A, hanno più volte sollevato dei dubbi applicativi, in quanto una definizione "precoce" di FMTC potrebbe impedire la ricerca di feocromocitomi, nell'ambito di un quadro di MEN2A a sviluppo *late-onset* (1). Per tali ragioni, diversi autori auspicano che l'etichetta di FMTC venga definitivamente abbandonata, per essere inglobata in una definizione più inclusiva di MEN2A.

La Tabella 2 mostra i principali esoni e mutazioni cliniche nello spettro dei quadri sindromici; come si evince, alcuni genotipi si accompagnano a una maggior aggressività del CMT (mutazioni 634, 883 e 918) e determinano uno specifico rischio di patologia, ma anche di sviluppo di neoplasie associate (1,32,46).

<b>Tabella 2. Associazione tra caratteristiche cliniche e genetiche nell'ambito delle forme familiari di carcinoma midollare tiroideo</b>			
	<b>FMTC</b>	<b>MEN2A</b>	<b>MEN2B</b>
<b>Esoni</b>	10,11,13,14,15	8, 10, 11, 13, 14, 15	15,16
<b>Mutazioni</b>	Duplicazione 532, C609, C611, C618, C620, C634, G768, G790, G791, V804L, S891	G533, C609, C611, C618, C620, C630, C634, D631Y, K666E, E768D, L790F, V804, S891A, R912P	A883F, Met918T
<b>CMT</b>	100%	100%	100%
<b>Età di esordio (anni)</b>	<20 - >50	<20	<1
<b>Multicentricità</b>	100%	100%	100%
<b>Bilateralità</b>	100%	100%	100%
<b>Iperplasia delle cellule C</b>	100%	100%	100%
<b>Feocromocitoma</b>	0%	10-60%	50%
<b>Iperparatiroidismo</b>	0%	5-20%	0%
<b>Lichen cutaneo amiloide</b>	0%	<5%	0%
<b>Ganglioneuromatosi</b>	0%	0%	100%
<b>Dismorfismo</b>	0%	0%	100%
<b>Aggressività del CMT: moderata, alta e molto alta</b>			

Adattato da "Schlumberger, M. & Pacini, F. (2003) Medullary thyroid carcinoma. In: Thyroid Tumors, 2nd edn, pp. 267–299. Nucléon, Paris", da "Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2022 Mar 11; 98(3): 112–125, doi: 10.2183/pjab.98.008" e da Wells et al. Thyroid 2015 guidelines

Lo screening genetico per mutazioni *RET* germinali riesce ad individuare fino al 7% dei casi di CMT che vengono erroneamente etichettati come sporadici (1). Questo ha un impatto notevole sui familiari del caso indice, che possono, quindi, essere identificati e trattati in fasi subcliniche della vita. Nel caso in cui venga valutato per possibile forma familiare un paziente con CMT di nuova diagnosi, lo studio del gene *RET* è normalmente esteso alle regioni *hotspots*, ovvero i codoni più frequentemente mutati nell'ambito degli esoni 10 e 11 - cioè 609,611,618, 620, 630 e 634 - e, secondariamente, ad altri esoni, quali il 13, 14, 15 e 16. Pochi centri analizzano sistematicamente l'esone 8 (1). Un sequenziamento esteso di tutto il gene *RET*, invece, è prerogativa solo di alcuni istituti, per i costi che esso comporta. D'altro canto, lo screening dei familiari di un caso indice, è agevolato dal target molecolare noto, che quindi, guida l'analisi genetica.

Una volta diagnosticata una forma sindromica, lo screening del CMT prevede il monitoraggio clinico, biochimico e strumentale a cadenza almeno annuale, con dosaggio di CT e CEA ed ecografia del collo, possibilmente in centri esperti. In caso di incremento dei livelli di CT, sarà necessario procedere con ulteriori approfondimenti fino all'eventuale risoluzione chirurgica per l'elevata probabilità di CMT(1).

## 1.4. Terapia chirurgica e stadiazione

### 1.4.1 Chirurgia

Dopo aver escluso la presenza di una forma familiare o di un coesistente feocromocitoma, il primo approccio terapeutico per il CMT è la tiroidectomia totale, associata a dissezione linfonodale. È tuttora controverso quanto estesa debba essere la chirurgia linfonodale in assenza di chiari segni di metastatizzazione. Le linee guida dell'American Thyroid Association (ATA) (1) sono concordi nei seguenti casi:

a) In assenza di metastasi evidenziabili a livello del collo (cN0) e in assenza di metastasi a distanza (M0), è indicata la tiroidectomia totale e l'asportazione profilattica del comparto centrale (livelli VI e VII) (Figura 5), (Grado di evidenza B);

b) In assenza di metastasi a distanza, ma in presenza di metastasi linfonodali, è indicata la tiroidectomia totale e linfadenectomia del comparto centrale (livelli VI e VII) e laterale coinvolto (livelli II e V); la dissezione profilattica del comparto laterale controlaterale può essere considerata se i valori di CT > 200 pg/ml, (Grado di evidenza C);

La condizione su cui vige il maggior disaccordo è la dissezione profilattica del comparto laterale (II-V) in assenza di linfadenopatie cliniche. In tale situazione, infatti, la scelta su come procedere viene demandata ai singoli istituti, consigliando una valutazione dei livelli di CT (1).

Il tropismo linfonodale del CMT è molto alto, infatti, in

presenza di una lesione tiroidea palpabile si stima che il 70% dei casi abbia già metastasi linfonodali e, addirittura, il 10% metastasi a distanza (1,45). L'indicazione chirurgica profilattica, seppur in assenza di malattia radiologicamente evidenziabile, si basa sull'elevato rischio di lesioni subcliniche, da cui l'importanza dei valori di CT che possono suggerire la presenza di un volume

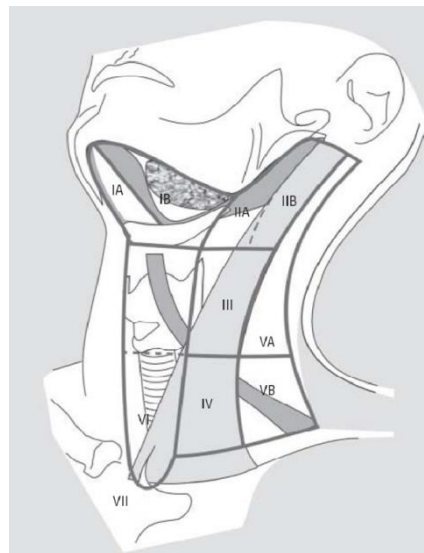


Figura 5 Rappresentazione schematica delle stazioni linfonodali del collo.

tumorale maggiore rispetto a quello oggettivabile. In tali situazioni i rischi chirurgici di un re-intervento, supererebbero, secondo alcuni, quelli di una chirurgia estesa iniziale. Tuttavia, le evidenze della letteratura mostrano ancora dati contrastanti. Ad esempio, un'analisi ottenuta dai registri americani del Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) (47) sui pazienti affetti da CMT con malattia estesa fino massimo al comparto centrale (N1a), confrontando tre diversi approcci chirurgici, quali tiroidectomia subtotale (inclusa lobectomia), sola tiroidectomia totale e tiroidectomia totale associata a linfadenectomia, ha mostrato come l'estensione della chirurgia iniziale non impatti sulla sopravvivenza specifica per malattia (47).

Considerando i valori di CT basale, invece, ritroviamo risultati discordanti e l'assenza di una soglia condivisa per dissezioni profilattiche resta la questione maggiormente controversa nella pratica clinica. Uno studio norvegese (15) ha sottolineato come i livelli di CT preoperatori, sebbene correlati all'estensione di patologia, non guidino in maniera efficace la scelta di dissezione profilattica del comparto laterale. D'altro canto, in una coorte spagnola (48) con CMT sia sporadici che ereditari, sono stati individuati due differenti soglie di CT basale ad orientare l'estensione della chirurgia: 600 pg/ml per i tumori non familiari e 200 pg/ml per quelli ereditari, suggerendo una riflessione sull'importanza dello screening genetico nella pianificazione chirurgica (48).

Il dilemma della dissezione riguarda anche le neoplasie con dimensioni  $\leq 1$  cm, poiché, secondo le linee-guida (LG) ATA (1), la presenza di metastasi occulte nel comparto centrale è tale da giustificare, comunque, un'asportazione profilattica dello stesso. Il National Comprehensive Center Network (NCCN) ha assunto una posizione differente al riguardo, consentendo una chirurgia meno estesa, che risparmi il comparto centrale, in presenza di microcarcinomi (49). Tale condotta, tuttavia, non sembra essere supportata da una revisione mirata della letteratura (50), che in base alle attuali evidenze ritiene comunque più opportuno un approccio che contempli la dissezione linfonodale.

La tabella 3 riassume le principali indicazioni vigenti in termini di approccio chirurgico iniziale nel CMT, secondo diverse LG internazionali (49,51–55).

**Tabella 3. Raccomandazioni delle principali società internazionali sull'approccio chirurgico nel carcinoma midollare tiroideo**

Società (Paese)	Expert Consensus (Cina)	KATES (Korea)	ATA (USA)	BABETS (Inghilterra)	CACEK (Germania)	NCCN (USA)
Anno	2020	2017	2015	2016	2012	2014
<b>CT preoperatoria</b>	Raccomandata se sospetto CMT (raccomandazione forte, basso livello di evidenza)	Secondo la valutazione pre-chirurgica (FNA sospetto per CMT o Sd MEN, ecc) Non raccomandato di routine	Secondo giudizio medico. Non raccomandato di routine	Solo se sospetto clinico. Non raccomandato di routine	Raccomandato prima di tutte le chirurgie tiroidee (Screening pre-operatorio per CMT)	Raccomandato o solo se sospetto pre-chirurgico di CMT
<b>Tipo di chirurgia</b>	TT	TT	TT	TT	TT	TT
<b>Comparto centrale ipsilaterale</b>	Routine (Livello VI)	Routine (Livello VI)	Routine (Livello VI)	Routine (Livello VI)	a) Secondo indicazione clinica/FNA/strumentale: in base alla sede; b) se CT basale 20-200 pg/ml, anche se imaging negativo: Livello VI+VII	a) Tumori <1 cm e unilaterali: considerare; b) Tumori >1 cm e/o bilaterali: Livello VI
<b>Comparto centrale controlaterale</b>	Routinario (Livello VI) (raccomandazione forte, basso livello di evidenza)	Routinario (Livello VI)	Routinario (Livello VI)	Routinario (Livello VI)	a) Secondo indicazione clinica/FNA/strumentale: in base alla sede; b) se CT basale 20-200 pg/ml, anche se imaging negativo: Livello VI+VII	a) Tumori <1 cm e unilaterali: considerare; b) Tumori >1 cm e/o bilaterali: Livello VI
<b>Comparto laterocervicale e ipsilaterale</b>	- Profilattico: in base a dimensioni del tumore e CT basale oppure se esame estemporaneo positivo per LN del comparto centrale (Raccomandazione debole, basso livello di evidenza); - Se sospetto clinico: routinario (Raccomandazione forte, basso livello di evidenza)	-Se clinicamente sospetto in pazienti ad alto rischio o con malattia confermata: routinario; - Profilattico: non raccomandato ;	- Profilattico: in base ai valori di CT (no cut-off); - Se clinicamente sospetto: routinario	- Profilattico: in base a dimensioni del tumore e valori di CT oppure se esame estemporaneo positivo per LN del comparto centrale; - T2-4: routinaria profilassi selettiva (Livelli IIa e Vb)	- CT basale 20-200 pg/ml: sì, anche se clinicamente negativo: Risk-oriented: routinario (Livelli II-V)	- Profilattico: considerare in centri ad alto volume o in caso di reperti estesi
<b>Comparto laterocefalico controlaterale</b>	Non menzionato	Non menzionato	Se LN positivi nel comparto laterale ipsilaterale e CT >200 pg/ml	T2-T4: profilassi selettiva routinaria (Livelli IIa-Vb)	CT basale >200 pg/ml: risk-oriented raccomandato (Livelli II-V)	Non menzionato

**Abbreviazioni:** CT, calcitonina; KATES, Korean Association of Thyroid and Endocrine Surgeons; ATA, American Thyroid Association; BAETS, British Association of Endocrine Surgeons; CAEK, Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Endokrinologie; FNA, fine needle aspiration; HT, hemithyroidectomy; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; TT, Tiroidectomia Totale

Adattato da “ Zhang D, Colombo C, Sun H, Kim HY, Pino A, De Leo S, Gazzano G, Persani L, Dionigi G, Fugazzola L. Unilateral Surgery for Medullary Thyroid Carcinoma: Seeking for Clinical Practice Guidelines. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Jul 11;13:875875. doi: 10.3389/fendo.2022.875875. PMID: 35898450; PMCID: PMC9309363”

## 1.4.2 Istologia e TNM

### 1.4.2.1 Peculiarità istologiche

Come per le altre neoplasie, la diagnosi di CMT è istologica. L'origine a partire dalle cellule C fa sì che la maggior parte di questi tumori si sviluppi nei 2/3 superiori e laterali della ghiandola, dove le concentrazioni di cellule parafollicolari sono maggiori, mentre è molto poco frequente la sede istmica (56). Le forme di CMT ereditario sono quasi sempre associate a piccoli focolai di multifocalità e bilateralità, a differenza dei casi sporadici (56). Analogamente a quanto detto per la citologia, l'esame istologico può riservare diverse insidie interpretative e richiedere valutazioni ancillari a supporto della diagnosi (43). Macroscopicamente queste lesioni sono grossolanamente incapsulate e dal colorito grigiastro o bruno, mentre con l'aumentare delle dimensioni possono svilupparsi aree di necrosi o regressione cistica (56). Dal punto di vista microscopico, il CMT si presenta come un agglomerato di nidi cellulari dai bordi poco definiti, circondato da uno stroma vascolare o fibroso contenente dal 60 all'85% dei casi un vistoso quantitativo di amiloide (43,56). L'assenza di uno stroma desmoide rappresenta un fattore favorevole, in quanto associato ad un minor tasso di metastatizzazione (56). L'amiloide, invece, ha la peculiarità di assumere un colorito verde mela alla luce polarizzata, anche in assenza della tipica colorazione rosso Congo (43). Oltre all'istotipo classico, che rappresenta circa l'80% dei casi (57), sono state individuate numerose altre (rare) varianti di CMT nel corso degli anni, tra cui: quella follicolare e pseudofollicolare, papillare e pseudopapillare, cistica, incapsulata, oncocitica, a cellule chiare, a cellule fusate, squamosa, a piccole o grandi cellule, produttore melanina o mucina, una variante simil-adenoma trabecolare ialinizzante, angiosarcoma-like, neuroblastoma-like e paraganglioma-like (43). Infine, una forma di CMT misto a carcinoma follicolare rappresenta un istotipo raro e controverso, che contempla una doppia differenziazione cellulare di tipo CMT e tiroideo epiteliale follicolare (43).

Date le difficoltà diagnostiche, all'esame macro- e microscopico va associato uno studio immunohistochimico che valuti l'espressione di CT (pressoché invariabile), quella di cromogranina A e sinaptofisina; il CEA è espresso nella maggior parte dei casi (56). Numerose

altre proteine possono essere ricercate con l'immunoistochimica, tra cui somatostatina, serotonina, ormone adrenocorticotropo, eccetera. Nella maggior parte dei CMT può essere dimostrata la presenza di TTF-1 e Islet-1, mentre le forme familiari spesso esprimono la proteina S-100, che rappresenta un marcatore importante della variante paraganglioma-like (56). Raramente possono essere osservati dei CMT cosiddetti "atipici", per l'assenza di espressione di CT e CEA. In questi casi le cellule possono esprimere fortemente calcitonin gene-related peptide (CGRP), ma le principali diagnosi differenziali devono includere metastasi da altri tumori neuroendocrini, localizzazione intratiroidea di una paratiroide oppure un paraganglioma primitivo tiroideo (56).

Moura e Colleghi (57) hanno analizzato una coorte di CMT, ricercando una correlazione tra il genotipo (somatico) e la variante di CMT. Dai risultati ottenuti, è stato osservato che i tumori con mutazioni *RET* 918 o senza mutazioni si presentano più spesso sotto forma di variante classica; altre mutazioni del gene *RET* (non 918) si associano prevalentemente a sottotipi istologici diversi, come quello pseudopapillare o paraganglioma-like, mentre le mutazioni del gene *RAS* sono prevalenti nella variante a cellule fuse con prognosi intermedia (57).

### **1.4.2.2 Stadiazione Tumour-Node-Metastasis**

Il Tumour-Node-Metastasis (TNM) rappresenta un sistema di stadiazione che consente una stima prognostica in termini di sopravvivenza specifica per neoplasia. L'attuale 8<sup>a</sup> edizione del TNM (58) per CMT è stata promulgata dall'American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) nel 2017, sebbene alcune sostanziali criticità diagnostiche non siano state risolte. Infatti, gran parte della classificazione è mutuata da quella del carcinoma tiroideo ad origine follicolare e alcuni dubbi sull'effettiva capacità prognostica sono stati più volte sollevati nel tempo (59).

Il TNM è basato sulla descrizione di tre parametri:

- T, tumour: indica le dimensioni del tumore primitivo e la sua eventuale estensione extra-tiroidea;
- N, node: indica l'estensione ai linfonodi regionali;

- M, metastasis: indica l'eventuale disseminazione in tessuti extra-cervicali.

La combinazione di questi tre gruppi individua degli stadi di patologia (da I a IV) che avranno come corrispettivo una stima della sopravvivenza specifica per CMT a 5 anni (Tabella 4).

L'effettiva capacità prognostica, così come una miglior performance rispetto al TNM precedente richiedono studi su ampi campioni di pazienti.

<b>Tabella 4. Stadiazione secondo l'8a edizione TNM dall'American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC)</b>						
<b>Stadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Note</b>	<b>Sopravvivenza* (95%CI)</b>	
<b>I</b>	1	0	0	T ≤ 2 cm, senza estensione extra-tiroidea, senza metastasi N o a distanza	99% (92-100)	
<b>II</b>	2	0	0	T > 2 e < 4 cm, senza estensione extra-tiroidea, né metastasi N o a distanza	88% (75-94)	
	3	0	0	T > 4 cm o con limitata estensione extra-tiroidea, ma senza metastasi		
<b>III</b>	1-3	1a	0	Qualsiasi dimensione, ma con limitata estensione extra-tiroidea e presenza di metastasi a livello del comparto centrale	71% (54-83)	
<b>IV</b>	<b>A</b>	4a	any	0	Qualsiasi dimensione con estensione extra-tiroidea grossolana ai tessuti circostanti. Possibili metastasi N, ma non a distanza	22% (3-51)
		1-3	1b	0	Qualsiasi dimensione, con minima estensione extra-tiroidea; presenza di metastasi a livello dei N mediastinici e/o retrofaringei, ma non a distanza	
	<b>B</b>	4b	any	0	Qualsiasi dimensione con sviluppo attorno al rachide o ai grandi vasi. Possibili metastasi N, ma non a distanza	
	<b>C</b>	any	any	1	Presenza di metastasi a distanza	

**Acronimi: T, tumore primitivo; N, linfonodi; M, metastasi a distanza; CI, intervallo di confidenza**  
**\* A 5 anni dalla diagnosi**

### 1.4.2.3 Numero di linfonodi metastatici e *lymph node ratio*

Sebbene la classificazione più utilizzata sia tuttora il TNM (58), diversi studi hanno valutato la possibilità di utilizzare un'altra tipologia di stadiazione, in particolare per quanto riguarda la valutazione dei linfonodi, stante anche il frequente coinvolgimento di questa sede nell'ambito del CMT. L'AJCC/UICC suddivide l'interessamento linfonodale in assente (N0); presente a livello del comparto centrale (N1a), livelli VI o VII; oppure interessamento dei



linfonodi a livello laterocervicali, mediastinico o retrofaringeo, uni- bi- o contro-lateralmente alla neoplasia (N1b)(58). In nessun caso, comunque, viene valorizzato il numero effettivo di LN interessati, né il rapporto tra LN metastatici sul totale dei LN asportati (i.e. *lymph node ratio*, LNR). Questo tipo di valutazione, secondo alcuni, potrebbe rendere più attendibile la stima del rischio di ripresa di malattia. In particolare, il LNR sembra esprimere in maniera più affidabile l'aggressività biologica del CMT, risultando migliore sia del numero netto di LN metastatici, che della classificazione TNM dell'AJCC/UICC (60). Il LNR sembra essere associato ad un maggior rischio di ripresa di malattia (HR=1.04, CI95%:1.02-1.06, p<0.001), indipendentemente da altri noti fattori prognostici sfavorevoli, tra cui una macroscopica estensione extra-tiroidea, lo stadio e valori postoperatori di CT e CEA rispettivamente > 5 pg/ml e > 5 ng/ml (61). Nella stessa analisi, una soglia di LNR superiore a 0.2 è stata individuata come valore con la maggior capacità predittiva di rischio clinico nel CMT (HR=10.29, CI95%:4.50–23.53, p <0.001) (61). Similmente, uno studio basato sui dati del registro americano SEER ha mostrato come un valore di LNR compreso tra 0.5-1.0 rappresenti un fattore predittivo sfavorevole indipendente di sopravvivenza correlata al tumore (HR=2.161, CI95%: 1.327–3.519, p=0.002) e che esso raggiunge il suo massimo potere predittivo nei casi in cui il numero di LN metastatici è  $\geq 9$  (62). Infine, nella popolazione studiata, il massimo impatto del LNR si esprimeva nelle donne caucasiche non-ispatiche e, come atteso, con malattia avanzata T3/T4 e metastasi a distanza (62).

L'insieme di questi dati suggerisce, quindi, una futura revisione delle modalità di stadiazione linfonodale, che porterebbero la capacità di predizione di malattia ad un livello significativamente più alto.

### **1.4.3 Stadiazione radiologica**

Lo studio radiologico dei pazienti con CMT è fondamentale per discriminare la presenza di metastasi e valutare eventuale ripresa di malattia. Infatti, anche in presenza di una chirurgia eccellente, fino al 40% dei pazienti presenta persistenza o recidiva di malattia (63).

Il primo presidio universalmente riconosciuto è rappresentato dall'ecografia del collo, che consente di individuare una recidiva in oltre la metà dei casi (1). L'ecografia è utile non solo per studiare la loggia tiroidea, ma anche per valutare i vari livelli linfonodali e guidare procedure diagnostiche mirate con FNA (1,64). Da un confronto tra ecografia e tomografia computerizzata (TC), la prima mostra un potere di risoluzione e un'accuratezza diagnostica superiore a livello cervicale (80.4% vs 67.6%), con un potere predittivo positivo del 96.5% vs 90% (65). Per tali motivi, visto anche la maneggevolezza e l'assenza di esposizione a radiazioni, l'ecografia in centri specializzati resta un supporto non sostituibile della diagnostica del CMT.

La TC e la risonanza magnetica (RM) rappresentano, d'altra parte, un presidio radiologico di secondo livello che trova applicazione nel monitoraggio di altre sedi corporee. La TC indaga in maniera esaustiva il torace e eventuali localizzazioni linfonodali mediastiniche, mentre, pur restando un strumento irrinunciabile nella valutazione dell'addome, può non essere sufficientemente sensibile nell'individuare secondarietà epatiche (64). Analogamente, la TC può svelare aree di rimaneggiamento osseo, che sono discretamente frequenti nell'ambito del CMT, ma è meno precisa nel valutare l'infiltrazione del midollo. Infatti, a livello del fegato, del rachide, del canale midollare e in generale dei tessuti molli, laddove la sensibilità della TC è inferiore, la RM riesce a fornire numerose informazioni diagnostiche e terapeutiche (64).

Va precisato, tuttavia, che la capacità diagnostica dei presidi radiologici tradizionali è estremamente variabile (dal 50 al 80%) (1) per via del volume di malattia spesso microscopico nell'ambito del CMT, motivo per cui la recidiva viene a lungo considerata solo "biochimica", in attesa di una progressione morfologica oggettivabile.

#### **1.4.4 Medicina Nucleare**

Diversi progressi sono stati, invece, effettuati nell'ambito medico-nucleare, dove numerose tecniche sono state sperimentate nell'ottica di individuare la metodica scintigrafica più appropriata. La European Association of Nuclear Medicine (EANM) (66) ha analizzato

l'applicabilità e i limiti ad oggi noti delle maggiori tecniche scintigrafiche nell'ambito del CMT, mettendo in risalto le questioni ancora aperte in tale ambito.

La 6-18F-fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine (18F-FDOPA) tomografia a emissione di positroni con TC (PET/CT) rappresenta la scintigrafia *tradizionale* del CMT. Diversi studi e metanalisi (66,67) hanno definito questa PET come la più performante nell'ambito di questa neoplasia, con una possibile applicazione sia in fase pre- che post-chirurgica. Il tasso diagnostico della 18F-FDOPA-PET per paziente si aggira attorno al 60-70% ed è fortemente influenzato dalla natura del CMT e dai livelli dei marcatori circolanti. Tra le maggiori limitazioni di questa tecnica ritroviamo la sua scarsa risoluzione spaziale, che rende inefficace la diagnostica per lesioni subcentimetriche (63). Inoltre, sebbene raramente, la 18F-FDOPA-PET può generare dei risultati falsamente positivi nei pazienti con infiammazioni acute, a causa di elevati livelli di aminoacidi di trasporto nei macrofagi (66).

La <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) (18F-FDG-PET) è stata a lungo valutata, in particolare nelle forme di neoplasia che mostrano una maggior aggressività biologica, per le quali questo tipo di diagnostica sembra essere particolarmente accurata. I dati di letteratura sono spesso discordanti, a causa di differenze nei periodi storici di utilizzo, nei macchinari e nei protocolli (66). Tuttavia, la 18F-FDG-PET mostra una sensibilità che è direttamente proporzionale all'incremento dei marcatori circolanti (CT e CEA) e alla riduzione del loro tempo di raddoppiamento, a cui si accompagna una maggior capacità nell'individuare lesioni ipermetaboliche (66). In una coorte retrospettiva, l'utilizzo della 18F-FDG-PET (68) ha influenzato positivamente il 40% delle scelte terapeutiche dei pazienti e ha mostrato un'accuratezza diagnostica di circa il 90%. Possibili falsi negativi sono legati alla presenza di lesioni piccole, calcificate o a lenta crescita, che rendono questa scintigrafia adatta a malattie con un elevato turnover metabolico (63,66), mentre possibili falsi positivi sono dovuti a stati infiammatori, oppure alla compresenza di altre neoplasie (66).

Tra le nuove scintigrafie con possibile applicazione nell'ambito del CMT vi sono la <sup>68</sup>Ga-somatostatin analogs PET/CT e quella con anticorpi monoclonali anti-CEA abbinati a studio con PET/TC. Infatti, nel primo caso, mutuando l'utilizzo di questa PET nell'ambito delle più *classiche* neoplasie neuroendocrine, sebbene sia noto che l'espressione dei recettori per somatostatina sia

globalmente inferiore nel CMT, si è visto che il range di fissazione per questi traccianti è variabile dal 25 al 100% (66,69). L'utilizzo della  $^{68}\text{Ga}$ -PET/TC ha una valenza *teranostica*, potendo candidare una quota di pazienti a trattamenti con analoghi della somatostatina freddi e radiomarcanti al Lutezio, aprendo potenziali scenari terapeutici in un ambito patologico storicamente povero di opportunità di trattamento.

Riguardo l'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-CEA abbinati a studio con PET/TC, studi su piccole coorti di pazienti hanno dato risultati estremamente promettenti nella valutazione di secondarietà da CMT, con sensibilità diagnostica persino superiore alla  $^{18}\text{F}$ -FDOPA-PET (92% vs 65%), eccetto che per la valutazione delle metastasi polmonari, dove la TC sembra restare lo strumento migliore (70).

In conclusione, nonostante i numerosi dati a disposizione, l'estesa disomogeneità di protocolli e degli studi effettuati ad oggi, non consente formalmente di omogeneizzare le raccomandazioni sull'utilizzo dei vari traccianti scintigrafici. L'utilizzo di PET/TC è caldeggiato nei casi di CMT in cui si evidenzia una progressione biochimica di malattia con riduzione dell'intervallo di raddoppiamento dei marcatori a <24 mesi o, comunque, un incremento significativo di CT (CT>150 pg/ml) e/o CEA. La  $^{18}\text{F}$ -FDOPA-PET/TC sembra confermarsi l'esame scintigrafico di prima scelta, sebbene la  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET possa essere preferita nei casi di verosimile maggior aggressività di patologia, rapida ascesa dei marcatori (raddoppiamento <1 anno) e elevati livelli di CEA (66). Il ruolo della  $^{68}\text{Ga}$ -PET è ancora poco chiaro, ma trova giustificazione in casi selettivi e in presenza di altra diagnostica non conclusiva (66).

## **1.5. Monitoraggio e fattori prognostici**

Come precedentemente spiegato, il monitoraggio biochimico post-operatorio prevede tradizionalmente la valutazione di due marcatori: la CT e il CEA. La CT, specifica per patologia, resta un presidio irrinunciabile anche in fase post-operatoria e ad oggi nessun ulteriore marcatore ha dimostrato una superiorità rispetto ad essa.

### **1.5.1 Nuovi marcatori**

#### **1.5.1.1 Ruolo del Ca19.9 e del fattore di rilascio della pro-gastrina**

Tra i marcatori biochimici esplorati per CMT ritroviamo il Ca19.9. Questa glicoproteina dall'elevato peso molecolare rappresenta un noto marcatore per l'adenocarcinoma pancreatico (71), ma è stato anche dimostrato in oltre l'85% dei campioni di CMT, con pattern ed intensità variabili (72). Il ruolo del Ca19.9 desta ancora perplessità in termini prognostici. Alcuni studi retrospettivi (73,74) hanno esaminato il suo valore nei casi di CMT metastatici, individuandone negli elevati livelli circolanti dei pazienti un marcatore di prognosi infausta a breve termine, con un incrementato rischio di exitus di oltre 3 volte (OR=3.78, p=0.04). Una maggior espressione del Ca19.9 è stata successivamente confermata a livello delle metastasi, rispetto al tumore primitivo (72) (p=0.002) e nei casi di neoplasia ereditaria, rispetto alle forme sporadiche (p=0.018). Tuttavia la presenza di Ca19.9 è stata osservata anche in forme di CMT limitate o in tumori di piccole dimensioni, senza individuare una chiara associazione con una maggior aggressività di patologia, biochimica, clinica o istologica. In quest'ottica, gli elevati livelli circolanti di Ca19.9 in soggetti con alto carico di malattia sono stati interpretati come epifenomeno della presenza di lesioni secondarie - data la maggior espressione di Ca19.9 a livello delle metastasi - incrinando l'ipotetico valore prognostico indipendente, attribuito in precedenza a questo marcatore (72-74).

Un altro marcatore recentemente attenzionato è stato il fattore di rilascio della pro-gastrina (pro-gastrin releasing peptide, proGRP). Analogamente ad altri marcatori, la presenza del fattore di rilascio della gastrina (GRP), una proteina bombesina-like responsabile del rilascio di gastrina, è stata associata al CMT, ma poco esplorata per le numerose criticità analitiche e metodologiche (75). Per ovviare a tali difficoltà, alcuni studi pilota sono stati effettuati sul suo precursore proGRP, già valutato con buoni risultati nell'ambito di alcuni sottotipi di neoplasia polmonare, in particolare nel carcinoma a piccole cellule (76). Dal punto di vista del CMT uno studio pilota (75) ha mostrato una buona sensibilità di questo marcatore, che sembra in grado di discriminare i pazienti con malattia attiva da quelli guariti. Inoltre, anche un suo utilizzo sul liquido di lavaggio potrebbe facilitare l'individuazione preoperatoria del CMT (77). Tuttavia, le evidenze disponibili sono ancora limitate e, ad oggi, l'utilizzo del proGRP è oggetto di sole valutazioni sperimentali.

### **1.5.1.2 Biopsia liquida**

Analogamente a quanto avvenuto per altre neoplasie, una crescente attenzione si è rivolta nei confronti della biopsia liquida. Essa consiste in un semplice prelievo ematico, a partire dal quale possono essere isolate diverse componenti tumorali, come: le cellule tumorali circolanti (CTC), il DNA libero circolante (cfDNA), l'RNA libero circolante (cfRNA) e i micro-RNA. Grazie a sofisticate tecniche analitiche, il materiale neoplastico può essere ricercato a livello sierico, in virtù di una più alta concentrazione rispetto a soggetti in salute o con patologia benigna, consentendo di evitare il ricorso a più invasive indagini tissutali (78). Inoltre, prelievi seriati e dosaggi regolari di questi biomarcatori possono aprire una finestra sui cambiamenti nella storia molecolare del tumore in tempo reale, così da rendere possibili aggiustamenti dell'orientamento terapeutico in base a nuovi eventuali bersagli.

Recenti evidenze hanno mostrato una certa eterogeneità nel profilo mutazionale del CMT, interrogando sulla complessità della sua storia naturale: infatti, in un considerevole numero di pazienti (fino al 20% dei campioni tradizionali analizzati) è stato riscontrato sia un differente stato

mutazionale, a livello metastatico, rispetto al primitivo o, meno spesso, due differenti tipi di mutazione nello stesso campione (79).

Il ruolo del cfDNA e delle CTC nel CMT è stato scarsamente esplorato. Cote et al (80) hanno investigato la fattibilità della ricerca della mutazione *RET* M918T sul cfDNA, nei pazienti con CMT avanzato con stato mutazionale noto da analisi tissutale. È stata riscontrata una prognosi peggiore nei pazienti con concordanza dei risultati su entrambi i campioni, con una correlazione più forte se paragonati ad altre neoplasie tiroidee. Inoltre, l'analisi del cfDNA è risultata essere una promettente alternativa in termini molecolari, nonostante la bassa sensibilità nella coorte esaminata (80). Infine, uno studio su una piccole coorte di CMT inviati a chirurgia ha mostrato come livelli post-operatori persistenti di cfDNA individuino una popolazione di pazienti a maggior rischio di recidiva, risultando, però, poco utili in fase diagnostica (81).

Al contrario, le CTC nell'ambito di CMT non sono state estesamente investigate. Potrebbero forse identificare una patologia persistente o recidivante e aiutare nell'interpretazione dei livelli di calcitonina nei pazienti senza evidenza di patologia morfologica. I dati disponibili in letteratura sono limitati, sebbene il riscontro di CTC in caso di CMT metastatico riveli un interessante potenziale nel predire la sopravvivenza complessiva o una prognosi peggiore (82), non necessariamente correlata ai tassi di CT (83).

## **1.5.2 Fattori prognostici**

La ricerca di efficaci fattori prognostici rappresenta un campo di studio ostico e sempre aperto nell'ambito del CMT. Sfortunatamente, nonostante gli sforzi profusi, pochi effettivi progressi sono stati raggiunti e il principale contributo è tuttora fornito dai dosaggi seriatì di calcitonina e CEA, vero campanello d'allarme di una persistenza e/o progressione di malattia. Tra i nuovi markers studiati ve ne sono alcuni anatomopatologici, come la presenza di necrosi i valori di Ki67, che possono suggerire un turnover cellulare più elevato (84), oppure alcuni parametri emocromocitometrici come il rapporto tra neutrofili o piastrine e linfociti, già valutato in altri ambiti oncologici e che sottende potenziali stati infiammatori correlati alla neoplasia (85).

Tuttavia, nessuno di questi parametri ha attualmente mostrato standard di solidità clinica e prognostica ed il loro utilizzo è ancora lasciato a soli contesti sperimentali.

Di seguito verranno, quindi, analizzati i fattori prognostici di maggior rilievo nella pratica clinica e in base ai quali viene attualmente stimata la prognosi dei pazienti affetti da CMT.

### 1.5.2.1 Fattori biochimici: Calcitonina e CEA *doubling time*

Come già introdotto in precedenza, la CT rappresenta il marcatore più specifico per il CMT e una persistenza o una comparsa di questo ormone nel post-operatorio sottende una persistenza o una progressione di malattia. I dosaggi seriati di CT e CEA consentono la valutazione del cosiddetto “tempo di raddoppiamento” (i.e. *doubling time*, *dt*), fortemente associato alla mortalità specifica per patologia (1). In particolare, in presenza di un *dt* > 24 mesi più dell’80% dei pazienti mostra una malattia stabile (86), mentre, quanto il *dt* scende al di sotto dei 6 mesi, la sopravvivenza a 10 anni scende al di sotto del 10% (1,87). Interessante notare come,

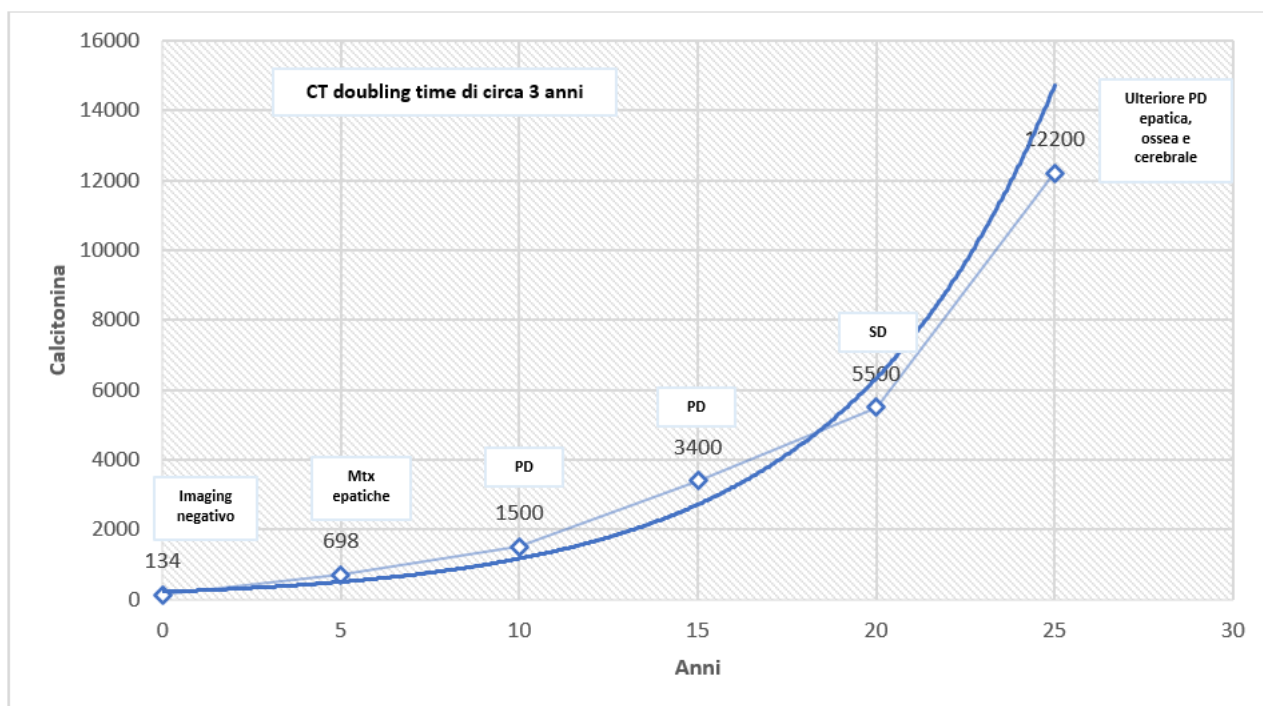


Figura 6. Andamento della calcitonina in un paziente con CMT e tempo di raddoppiamento dei marcatori a circa 3 anni. Adattato da Costante et al [www.nature.com/clinicalpractice](http://www.nature.com/clinicalpractice) doi:10.1038/ncpendmet1023. Acronimi: Mtx, metastasi; PD, progressive disease; SD, stable disease.

mentre i *dt* si sono mostrati efficaci fattori prognostici, la simultanea valutazione di Ki67 e indice mitotico, non si è rivelata parimenti associata alla progressione di malattia (86). La figura 6



mostra una stima dell'andamento della malattia in un paziente con *dt* a circa 3 anni e mostra un'ascesa di tipo esponenziale dei valori di CT, associata alla progressiva evoluzione del CMT in un arco temporale di circa 20 anni (41). Poiché i livelli di CT possono variare considerevolmente nell'arco di brevi periodi (dal 30% o oltre), sono necessarie almeno 4 valutazioni consecutive della CT per poter procedere ad una stima accurata del *dt* (87). Inoltre, è necessario procedere con una valutazione simultanea sia di CT, che del CEA, poiché una discrepanza nei *dt*, può indicare una maggior aggressività della patologia (41). In particolare, nei casi di CMT che mostrano processi di dedifferenziazione, i valori di CT possono restare stabili o addirittura ridursi nel tempo, a differenza di quelli del CEA che mostrano un progressivo incremento temporale, concorde con la progressione morfologica (88). In quest'ottica, i valori di CEA presentano un più alto valore predittivo, da cui si conferma la necessità di una valutazione seriata di entrambi i parametri (88).

Per tali ragioni, le attuali linee guida consigliano un monitoraggio dei marcatori almeno ogni 6 mesi in una prima fase, così da poter valutare i tempi di raddoppiamento individuali del paziente (1).

### **1.5.2.2 Fattori molecolari**

La presenza di mutazioni somatiche del gene *RET* è fortemente associata ad una maggior aggressività di patologia e ad una prognosi sfavorevole (4). Infatti, il riscontro di mutazioni tissutali è possibile dal 40% all'80% dei casi e si caratterizza per la presenza di tumori primitivi di maggiori dimensioni, metastasi linfonodali e tendenza alla progressione di malattia con una ridotta sopravvivenza a lungo termine (4). A rettifica parziale di quanto emerso in passato, uno studio focalizzato su CMT sporadici *RET* mutati è riuscito a stratificare ulteriormente il peso della mutazione somatica. Infatti, i portatori delle mutazioni dei codoni 15 e 16 sembrano gravati da prognosi peggiore (89), con la mutazione Met918Thr confermata come la più frequente (oltre il 60% delle mutazioni somatiche) e tra le più aggressive; mentre i casi di CMT con mutazione

*RET* non-codone 15 o 16 presentavano una malattia più indolente, persino rispetto ai casi privi di mutazione somatica, classificati, invece, come a rischio intermedio (89).

Al di là di *RET*, un altro gene che può essere valutato a livello tissutale è *RAS*. Le mutazioni di *RET* e *RAS* sembrano essere quasi mutuamente esclusive, in quanto solo in rari casi sono state individuate contestualmente nello stesso paziente (90). *RAS* rappresenta un proto-oncogene di cui si conoscono tre tipi: *H-*, *K-* e *N-RAS*. Nell'ambito del CMT la prevalenza di queste mutazioni appare molto variabile, passando dallo 0% all'80% e subendo differenti distorsioni anche in base al tipo di gene indagato: *H-RAS* sembra quello maggiormente interessato nel CMT, seguito da *K-RAS*, mentre sono noti pochi casi di mutazioni *N-RAS* a differenza di quanto accade nella controparte di neoplasie follicolari (90,91). Tuttavia, la presenza di mutazione dei geni *RAS* non sembra associarsi ad alcun particolare fenotipo clinico, né sottendere una maggior aggressività di patologia (90,91), al contrario alcuni studi sembrano individuare nei portatori di questa mutazione somatica un tipo di CMT con andamento più indolente (90).

L'interesse nello studio molecolare dei CMT sporadici, nasce non solo dalla necessità di individuare dei fattori prognostici che prevedano il fenotipo clinico della malattia, ma anche dalla volontà di personalizzare l'approccio terapeutico sulla specifica firma di queste neoplasie. In quest'ottica, le mutazioni di *RET* presentano maggiore attrattiva, non solo per una più consolidata associazione con l'aggressività biologica, ma anche per l'accesso che la loro presenza garantisce a specifiche terapie con bersaglio anti-*RET*. Infatti, la gran parte delle opzioni terapeutiche ad oggi disponibili, prevedono che venga provata l'esistenza di una mutazione germinale o somatica a livello di questo gene, dato che, la presenza di un gene *RET wild type* (wt), non supporta l'utilizzo della maggior parte dei farmaci a disposizione, per una apparente minor efficacia (5,6,92).

D'altro canto, i geni *RAS* presentano un minor impatto, non solo per una più dubbia associazione con il fenotipo clinico, ma anche perché ad oggi non si dispone di terapie molecolari che abbiano questi target. Sembra, tuttavia, che la presenza di mutazioni *RAS* determini una deregolazione di alcuni fattori di crescita (ad esempio, l'oncogene *MET* o il fattore di crescita derivato dalle piastrine) rendendo meno efficaci alcune terapie con ampi bersagli molecolari (ad esempio il

cabozantinib). Questa condizione sembra avvalorare gli studi che supportano una maggior efficacia delle terapie bersaglio nei pazienti *RET*-mutati e *RAS* wt (90,93).

## 1.6. Cenni di terapia medica

Nonostante la prolungata sopravvivenza del CMT, la tendenza alla progressione e l'insorgenza di metastasi a distanza rendono spesso necessario un approccio terapeutico sistemico nel corso della presa in carico. La presenza di secondarietà da CMT non costituisce di per sé un indicatore diretto dell'inizio della terapia, poiché molto spesso si è di fronte a patologie oligometastatiche, oppure stazionarie per diversi mesi o anni, nonostante un significativo carico tumorale, consentendo, quindi, un approccio più conservativo di tipo *watch and wait*. Tuttavia, in presenza di lesioni a rischio (esempio quelle ossee) o elevato carico tumorale, sebbene non vi sia un accordo univoco sull'esatto momento di inizio della terapia, vi è generale consenso nell'intraprendere un trattamento sistemico volto a controllare o ridurre il volume complessivo di malattia.

Dal punto di vista dei farmaci disponibili, in poco meno di un decennio, abbiamo assistito ad una notevole evoluzione delle terapie, dapprima confinate ai poco efficaci approcci chemioterapici "tradizionali" - a base di schemi con 5-fluoruracile e dacarbazina (94) - per approdare alle più moderne terapie mirate.

In generale, possiamo suddividere l'attuale offerta terapeutica in due ampi capitoli: le terapie a bersaglio molecolare ad ampio spettro con inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) mirati a diversi fattori di crescita e gli inibitori diretti di *RET*.

Nel primo caso, i due farmaci principali sono il vandetanib (5) e il cabozantinib (6).

Il vandetanib rappresenta il primo farmaco approvato per CMT avanzati in progressione e ha come target molecolare diversi fattori di crescita endoteliali (vascular endothelial growth factors, VEGF) come *VEGFR2*, *VEGFR3*, ma anche *RET* e l'epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (95). Il trial di fase 3 ZETA randomizzato contro placebo ha sancito ufficialmente la sua entrata nella pratica clinica, mostrando un significativo beneficio, con il 45% di risposte parziali e un periodo libero da progressione stimato a oltre 30 mesi (5); tuttavia, la possibilità di crossover da placebo a gruppo di trattamento in caso di progressione, ha impedito una stima in termini di sopravvivenza complessiva (5). Tra i maggiori effetti avversi si ricordano: diarrea, astenia, rash

cutaneo e una possibile significativa tossicità cardiaca che rende necessario uno stretto monitoraggio elettrocardiografico per il rischio di aumento dell'intervallo QT e torsioni di punta (95). Sebbene inizialmente il farmaco sia stato immesso in commercio con indicazione a tutti i pazienti con CMT - indipendentemente dallo stato mutazionale *RET* e eventualmente dalla sua negatività - una nota AIFA del 14 dicembre 2022 ha modificato l'indicazione terapeutica, limitando, di fatto, la prescrivibilità del farmaco ai soli pazienti con mutazione *RET*, in seguito ai risultati di una sub-analisi del trial con rivalutazione degli stati mutazionali, che non ne supporta l'utilizzo nei casi *RET* wild-type (<https://www.aifa.gov.it/-/nota-informativa-importante-su-caprelsa%20AE-vandetanib->).

Il cabozantinib rappresenta il secondo arrivato tra i TKI ad ampio spettro approvato per CMT. I suoi bersagli molecolari sono *VEGFR2*, *RET* e *c-met*. Il trial randomizzato contro placebo EXAM (6) ha mostrato un miglioramento significativo della sopravvivenza libera da progressione (11.4 mesi vs 4.0 mesi del gruppo placebo), con un tasso di risposta del 28%, indipendentemente dalla presenza di mutazione *RET* e *RAS*. Una successiva sub-analisi nel sottogruppo di pazienti con mutazione M918T (96) ha mostrato un beneficio in termini di sopravvivenza complessiva nel gruppo di trattamento rispetto al placebo (44.3 vs 18.9 mesi, HR, 0.60; 95% CI, 0.38–0.94; P=0.03), risultato, tuttavia, non confermato nell'analisi estesa a tutta la popolazione in studio. Il profilo di sicurezza appare favorevole, con effetti avversi quali fatica, diarrea ed eritrodissiestesia palmo-plantare (6,95). Ad oggi, cabozantinib resta l'unico TKI proponibile nei casi di CMT senza mutazione *RET*.

Infine, un nuovo capitolo nella storia delle terapie a bersaglio molecolare si è aperto con l'avvento dei farmaci anti-*RET*. Nel caso del CMT, il selpercatinib - inibitore diretto ATP competitivo di *RET*- ha mostrato una significativa efficacia nell'ambito dei pazienti con mutazione somatica di questo gene. I benefici di questo nuovo TKI sono stati valutati nel trial basket LIBRETTO-001, con tassi di risposta al 69% nei pazienti già trattati con altri TKI e 73% in quelli non sottoposti a precedenti terapie (92). Tra le maggiori tossicità riportate, ritroviamo l'ipertensione arteriosa, l'incremento delle transaminasi, l'iponatriemia e la diarrea (92). L'efficacia e la buona tolleranza

di questi nuovi farmaci enfatizzano l'importanza dei target genici e della necessità di uno screening molecolare accurato che personalizzi la terapia di queste rare neoplasie.

## 2. Obiettivo della tesi

Nonostante il dosaggio della CT resti centrale nella diagnosi e nel monitoraggio del CMT, l'interpretazione di questo marcatore nell'immediato post-operatorio è ancora controverso. Infatti, se da un lato il riscontro di livelli di CT indosabili rappresenta un fattore riconosciuto di guarigione e prognosi favorevole (1,9), la presenza di valori bassi, ma dosabili non è stata ad oggi ancora esplorata e il suo valore prognostico non ancora chiarito. Sebbene le vigenti linee guida suggeriscano una valutazione iniziale dei livelli di CT a tre mesi dall'intervento (1), questa indicazione non viene rispettata omogeneamente dai vari centri e, inoltre, potrebbe essere troppo precoce, per via di una clearance ritardata della CT tumorale, che può necessitare di maggior tempo per smaltire i depositi dell'ormone. È infatti noto che, nell'ambito del CMT, la CT può presentarsi sottoforma di aggregati o precursori ad elevato peso molecolare persistenti nel circolo, rispetto all'ormone presente in condizioni di normalità(9). Inoltre, la stessa manipolazione chirurgica della ghiandola, può favorire il rilascio di maggiori quantità di isoforme patologiche di CT, prolungando ulteriormente i tempi di bonifica (9).

Alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo del presente studio è stato di valutare il ruolo dei valori di CT a sei mesi dall'intervento, in una coorte omogenea di CMT inviati a chirurgia e senza presenza di metastasi a distanza alla diagnosi. Il potere predittivo di questo parametro è stato valutato alla luce del decorso clinico della patologia emerso durante il monitoraggio a medio e lungo termine, esplorando la capacità di individuare una sottopopolazione a rischio di ripresa di malattia, in una fase molto precoce della presa in carico.

### 3. Materiali e Metodi

Il presente studio retrospettivo ha considerato una serie consecutiva di pazienti adulti seguiti presso la struttura complessa di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, dal febbraio 2003 al febbraio 2022. Ciascun paziente ha fornito il proprio consenso informato. Criteri di inclusione: i) intervento di tiroidectomia totale con diagnosi istologica di CMT; ii) disponibilità dei dati clinici, biochimici e istologici; iii) assenza di metastasi a distanza (M0) alla diagnosi (mediante negatività di TC torace e addome). Criteri di esclusione: i) assenza delle informazioni biochimiche e istologiche; ii) presenza di significative comorbidità (ad esempio insufficienza renale cronica) e/o farmaci (ad esempio inibitori di pompa protonica) interferenti con la valutazione della CT.

Per ciascun paziente sono state raccolte le principali informazioni cliniche (genere, età alla diagnosi, durata dei controlli post-operatori al momento dello studio), istologiche (dimensioni del tumore primitivo, multifocalità, vascolarizzazione, numero dei linfonodi metastatici alla diagnosi), biochimiche (valori di CT e CEA alla diagnosi e durante i controlli) e strumentali. In particolare, i risultati delle ecografie del collo sono stati disponibili per il 79% dei casi a sei mesi ed il 77% dei casi ad un anno dall'intervento.

Gli esami ematici sono stati effettuati presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi e il dosaggio della CT è stato realizzato con saggio a chemiluminescenza LIAISON® XL (DiaSorin). In base al risultato delle valutazioni all'ultima visita di controllo, ciascun paziente è stato classificato come risposta completa (CR) nel caso di valori di CT indosabili (cioè al di sotto del limite di riferimento di 0.1 pg/ml), valori normali di CEA e indagini strumentali negative; persistenza di malattia (PM) nel caso di valori dosabili di CT e/o indagini strumentali positive per presenza di malattia.

Tutte le istologie sono state classificate secondo l'8° edizione dell'AJCC (58). Inoltre, sono state raccolte le informazioni inerenti alla valutazione germinale e/o somatica delle mutazioni RET, disponibile del 91% e nel 51% dei casi rispettivamente.



Il presente studio è stato condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki e approvato dal comitato etico locale (Comitato Etico Area Vasta Centro, CEAVC, Firenze, Toscana, Italia).

### **3.1 Analisi Statistica**

Le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard (SD), quando distribuite normalmente o come mediana [range inter-quartile], quando distribuite non-normalmente. Le variabili categoriche sono state espresse come numeri e percentuali. In base ai risultati dell'ultimo controllo disponibile è stata costruita una variabile categorica di esito (CR o PM).

In base alla dimensione della popolazione, le differenze tra sottogruppi sono state analizzate utilizzando il T-test di Student oppure Mann-Whitney per le variabili continue e il test Chi-quadro oppure Fisher-Yates per le variabili categoriche. Un'analisi ROC (Receiver Operating Characteristic) è stata effettuata per individuare i valori soglia. Le variabili significative sono state verificate in una serie di regressioni di Cox, in accordo con la numerosità del campione e utilizzando la variabile di esito come variabile dipendente.

Tutte le analisi sono state effettuate con IBM SPSS statistics per Window, versione 28.01.0 (142) e GraphPad Prism versione 9.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, 127 [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## 4. Risultati

È stata individuata una popolazione complessiva di 60 pazienti, di cui 55 elegibili per l'analisi finale e cinque esclusi per l'assenza di informazioni fondamentali. Considerando l'esito finale, i pazienti con sola malattia biochimica (N=13) e quelli che hanno successivamente sviluppato lesioni secondarie [sia linfonodali (LN) che metastasi a distanza (M1)] (N=14) sono stati raggruppati insieme all'interno del gruppo PM (N=27). La Tabella 5 mostra una panoramica delle principali caratteristiche della popolazione, in base all'esito finale (i.e. CR o PM). In sintesi, il 45% dei pazienti (25) era di genere maschile con un'età media di 59 anni, in entrambi i casi senza differenze significative tra gruppi. Analogamente, non sono state individuate differenze per quanto riguarda lo stato mutazionale sia germinale, che somatico. In particolare, sei pazienti con CR (21.4%) e due con PM (7.4%) hanno mostrato una mutazione germinale *RET* ( $p=0.150$ ), mentre due pazienti CR (7.1%) e otto PD (29.6%) hanno mostrato una mutazione somatica *RET* ( $p=0.291$ ) (Tabella 5). In merito alle caratteristiche istologiche, sono state osservate alcune differenze tra i gruppi CR e PM riguardo la dimensione del tumore primitivo ( $p=0.002$ ), l'invasione vascolare ( $p=0.018$ ) e la multifocalità ( $p=0.005$ ), mentre il riscontro incidentale (21%) è stato evidenziato solo nella coorte CR (6 casi vs. 0,  $p=0.0023$ ). In dieci casi (18%) è stato riscontrato un contestuale carcinoma differenziato tiroideo di origine follicolare, senza differenze tra gruppi ( $p=0.446$ ).

Alla diagnosi, i pazienti poi classificati come PD hanno mostrato un più esteso interessamento LN ( $p=0.001$ ) e uno stadio più avanzato ( $p=0.003$ ), con il 41% dei casi classificato come uno stadio IVA (Tabella 5). In particolare, il 64% dei pazienti CR è stato classificato come N0 e il numero di LN metastatici andava da zero a due, a differenza dei pazienti PM, che sono stati classificati come N0 in solo il 26% dei casi e hanno mostrato un numero medio di LN metastatici di 4 [0-41] ( $p<0.001$ ) (Tabella 5).

Dopo una mediana di 39.2 mesi [IQR: 16.3-83.7], sei pazienti sono deceduti, senza differenze tra i due gruppi (un paziente CR e cinque PM), mentre 12 pazienti (21%) hanno sviluppato metastasi a distanza.

Considerando le caratteristiche biochimiche, sono state osservate alcune differenze. I pazienti PM hanno mostrato valori di CT e CEA mediamente più elevati sia nel preoperatorio (rispettivamente  $p=0.028$  e  $p=0.011$ ), che nel controllo post-operatorio a sei mesi (rispettivamente  $p<0.001$  e  $p=0.010$ ), mentre al controllo ad un anno solo i livelli di CT sono risultati significativamente differenti tra i due gruppi ( $p<0.001$ ) (Tabella 5).

Tabella 5. Panoramica della popolazione in base all'esito finale				
	Gruppo	Esito finale*		p-value
		Risposta completa	Persistenza di malattia	
		Totale=28	Totale=27	
<b>Genere (%)</b>	Femminile	19 (67.9)	11 (40.7)	0.060
	Maschile	9 (32.1)	16 (59.3)	
<b>Età (anni)</b>	Media (SD)	58.63 (16.18)	60.15 (14.54)	0.720
<b>Mutazione RET germinale (%)</b>	Assente	21 (75.0)	21 (77.8)	0.150
	Presente	6 (21.4)	2 (7.4)	
	Non nota	1 (3.6)	4 (14.3)	
<b>Mutazione RET somatica (%)</b>	Assente	9 (32.1)	9 (33.3)	0.291
	Presente	2 (7.1)	8 (29.6)	
<b>Dimensioni del tumore (mm)</b>	Mediana (IQR)	10.00 [6.00, 19.50]	22.00 [13.00, 31.00]	<b>0.002</b>
<b>Invasione vascolare (%)</b>	Assente	17 (60.7)	11 (40.7)	<b>0.018</b>
	<4 foci	0 (0.0)	3 (11.1)	
	>4 foci	0 (0.0)	2 (7.5)	
	Non nota	11 (39.3)	11 (40.7)	
<b>Multifocalità (%)</b>	Assente	21 (75.0)	8 (29.6)	<b>0.005</b>
	Presente	7 (25.0)	15 (55.6)	
	Non nota	0	4 (14.8)	
<b>Incidentale (%)</b>		6 (20.7)	0 (0.0)	<b>0.023</b>
<b>T (%)</b>	T1a	15 (51.7)	4 (16.0)	<b>0.023</b>
	T1b	6 (20.7)	5 (20.0)	
	T2	7 (24.1)	10 (40.0)	
	T3	1 (3.4)	5 (20.0)	
	T4	0 (0.0)	1 (4.0)	
<b>N (%)</b>	N0	18 (64.3)	7 (25.9)	<b>0.001</b>
	N1a	3 (10.7)	8 (29.6)	
	N1b	1 (3.6)	10 (37.0)	
	Nx	6 (21.4)	2 (7.4)	
<b>Stadio</b>	I	18 (64.4)	4 (14.8)	<b>&lt;0.001</b>
	II	6 (21.4)	5 (18.5)	
	III	2 (7.1)	7 (25.9)	
	IVA	2 (7.1)	11 (40.7)	
<b>CT preoperatoria</b>	Mediana (IQR)	122.00 [72.70, 460.00]	1016.50 [213.10, 2000.0]	<b>0.028</b>
<b>CEA preoperatoria</b>	Mediana (IQR)	7.95 [4.05, 13.82]	34.00 [15.00, 67.50]	<b>0.011</b>
<b>CT a 6 mesi</b>	Mediana (IQR)	0.00 [0.00, 0.00]	25.40 [4.88, 346.25]	<b>&lt;0.001</b>
<b>CEA a 6 mesi</b>	Mediana (IQR)	2.20 [1.17, 2.45]	4.95 [2.25, 6.65]	<b>0.010</b>
<b>CT a un anno</b>	Mediana (IQR)	0.00 [0.00, 0.00]	31.75 [5.50, 431.25]	<b>&lt;0.001</b>
<b>CEA a un anno</b>	Mediana (IQR)	1.45 [1.00, 3.25]	4.50 [1.38, 7.35]	0.093
<b>Decesso (%)</b>		1 (3.4)	5 (19.2)	0.101

I numeri in grassetto evidenziano i valori significativi

\* L'esito finale è stato valutato in base al risultato dell'ultimo controllo disponibile.

Abbreviazioni: CT, calcitonina; CEA, antigene carcinoembrionario; SD, deviazione standard; IQR, range interquartile

Considerando il tasso di riduzione di CT dal preoperatorio (Figura 7), l'analisi ROC mostra che una riduzione dei valori di CT del 98.7% a sei mesi si associa a un esito positivo con una sensibilità del 87.5% e una specificità del 82.6% (AUC=0.921, CI95%:0.84-1.00,  $p<0.001$ ). La

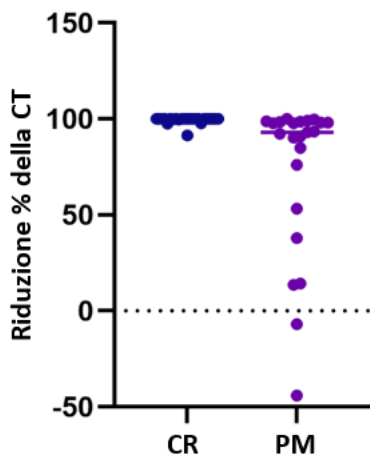


Figura 7. Rappresentazione della riduzione percentuale di CT dal preoperatorio a sei mesi nei pazienti classificati come risposta completa (CR) e come persistenza di malattia (PM). Acronimi: CT, calcitonina; CR, risposta completa; PM, persistenza di malattia.

regressione di Cox mostra che una riduzione della CT del 98.7% predice la guarigione da CMT con un *odds ratio* (OR)=0.198 (CI95%: 0.066-0.594,  $p=0.004$ ).

Riguardo i risultati dell'ecografia del collo, a sei mesi solo un paziente CR e tre PM hanno mostrato risultati dubbi, mentre nessun paziente CR e cinque pazienti PM hanno mostrato reperti suggestivi per persistenza di malattia (i.e. LN sospetti). Al controllo ad un anno, 11 pazienti CR presentavano ecografia del collo negativa.

Considerando i valori preoperatori di CT, sono stati realizzati una serie di curve di regressione, per esplorare la possibile correlazione con le dimensioni del tumore primitivo e il numero di LN patologici. La figura 8 mostra, sottoforma di *bubble plot*, la correlazione lineare presente tra il  $\text{Log}[CT]$  e la dimensione tumorale ( $F=31.22$ ,  $p<0.001$ ) (Fig.8 pannello A) e il numero di LN metastatici ( $F=8.14$ ,  $p=0.007$ ) (Fig.8 pannello B). Quando i valori preoperatori di CT, le dimensioni del tumore, il numero di LN metastatici, la multifocalità sono stati introdotti simultaneamente in un modello di regressione di Cox, avente l'esito finale di malattia come

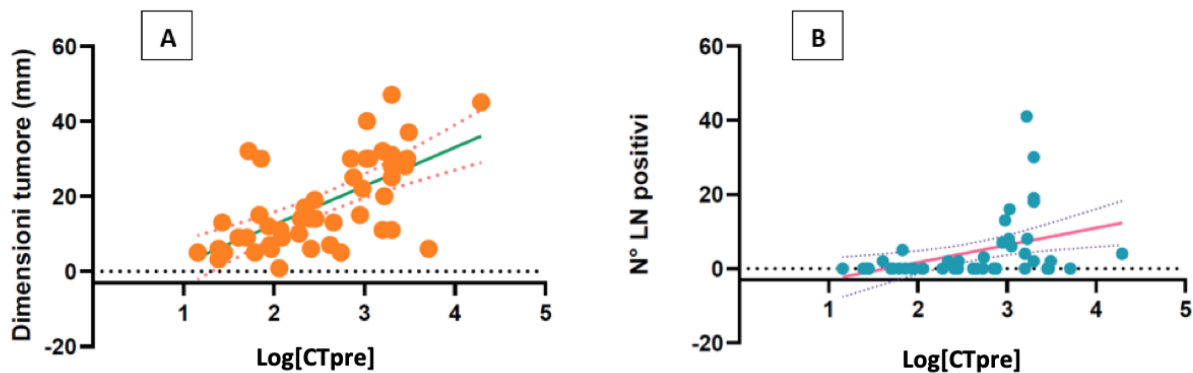


Figura 8. Rappresentazione della relazione lineare tra il Log dei valori preoperatori di CT e la dimensione del tumore primitivo ( $F=31.22$ ,  $p<0.001$ , Pannello A) ed il numero di linfonodi metastatici ( $F=8,14$ ,  $p=0.007$ , Pannello B).  
 Abbreviazioni: Log, Logaritmo; CTpre, calcitonina preoperatoria; LN, linfonodi; N°, numero.

variabile dipendente, solo i valori preoperatori di CT ( $p=0.016$ ) e le dimensioni del tumore ( $p=0.007$ ) sono risultate significative ed indipendentemente associate con lo stato di malattia (Tabella 6).

Al fine di individuare il miglior valore-soglia di CT preoperatoria capace di predire l'esito finale è stata eseguita un'analisi ROC mostrata in figura 9. Un valore di CT pari a 284 pg/ml mostra una sensibilità del 69.2% e una specificità del 68.0% nel predire l'esito finale ( $AUC=0.679$ ,  $CI95\%: 0.525-0.833$ ,  $p=0.028$ ). In un simile modello ROC, il valore più basso di CT osservato a controllo a sei mesi (i.e. 0.7 pg/ml) nella popolazione in studio è in grado di predire l'esito finale con una sensibilità e specificità, rispettivamente del 95.8% e 80% ( $AUC=0.958$ ,  $CI95\%: 0.900-1.00$ ,  $p<0.001$ ). In particolare, solo cinque pazienti (9.1%) che sono risultati alla fine guariti (CR) hanno mostrato valori dosabili di CT a sei mesi (da 0.7 a 5.69 pg/ml), che sono diventati gradualmente indosabili. Considerando questi risultati, è stata costruita una variabile categorica (si/no), denominata CT dosabile precoce (pCT), valutando se i valori di CT a sei mesi sono risultati dosabili o indosabili. Successivamente, sono state effettuate una serie di regressioni di Cox, considerando i valori-soglia individuati a partire dai livelli pre- e post-operatori di CT, assieme ad altri noti predittori. Quando la soglia preoperatoria di CT di 284 pg/ml e la variabile pCT sono state introdotte simultaneamente nella stessa regressione, la pCT e non la CT preoperatoria risulta incrementare di 16 volte il rischio di esito sfavorevole ( $OR= 16.28$ ,  $CI95\%: 2.05-129.02$ ,  $p=0.008$ ) (Tabella 7). Dopo aver aggiustato il modello per la dimensione del tumore, la multifocalità (si/no) ed l'interessamento LN (si/no), la pCT risulta incrementare di quasi 13 volte

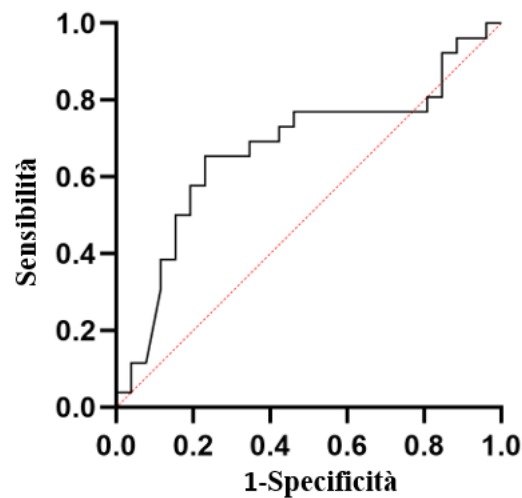


Figura 9. Curva ROC considerando i valori preoperatori di CT rispetto all'esito finale, i.e. CR o PM. Abbreviazioni: CR, risposta completa; PM, persistenza di malattia.

il rischio di PM da CMT (OR=12.9, CI95%: 1.6-102.2, p=0.016) (Tabella 8). Quando la pCT è stata introdotta in un ulteriore modello di Cox con la multifocalità e lo stadio di malattia alla diagnosi, solo la pCT è risultata significativamente associata all'esito finale (OR= 15.7, CI95%: 1.9-127.3, p=0.010) (Tabella 9). Al contrario, in un simile modello di Cox, la soglia preoperatoria di CT a 284 pg/ml non è capace di predire l'esito finale (non mostrato).

Infine, quando una variabile con valori soglia concordi (i.e. CT preoperatoria e a sei mesi) è stata introdotta come variabile categorica in un modello di regressione di Cox con multifocalità e LN positivi, la presenza sia di valori preoperatori di CT > 284 pg/ml, che di valori dosabili di CT a sei mesi, aumenta il rischio di PM di circa 20 volte (OR= 19.7, CI95%:1.9-201.6, p=0.012) (Tabella 10).

In una sub-analisi che considera solo i pazienti metastatici (M1) (N=12), una curva ROC dei valori di CT a sei mesi mostra che valori di CT>16 pg/ml sono in grado di predire lo sviluppo di metastasi a distanza con una sensibilità dell'89% e una specificità dell'82% (AUC=0.911, CI95%: 0.819-1000, p<0.001) (Figura 10).

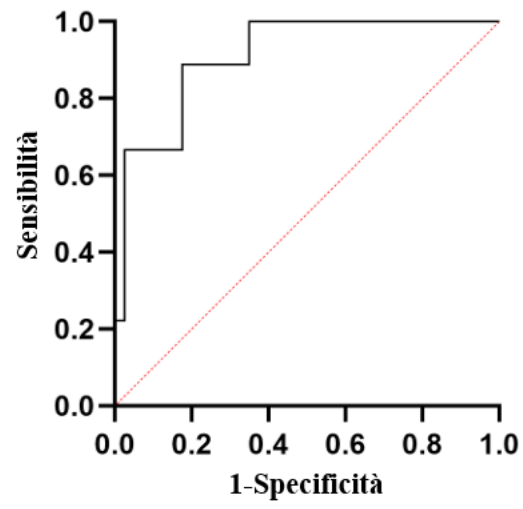


Figura 10. Curva ROC considerando i valori di CT a sei mesi nella sotto-coorte di pazienti che hanno sviluppato metastasi a distanza.



**Tabella 6. Regressione di Cox considerando i valori preoperatori di CT and le principali caratteristiche tumorali, usando l'esito finale come variabile dipendente**

	Wald	OR	Intervallo di confidenza 95%		p-value
			Inferiore	Superiore	
<b>Valori preoperatori di CT</b>	5.81	1.00	1.00	1.00	<b>0.016</b>
<b>Dimensioni del tumore</b>	7.35	1.07	1.02	1.12	<b>0.007</b>
<b>Multifocalità</b>	3.15	2.72	0.90	8.23	0.076
<b>Numero di LN metastatici</b>	0.07	0.99	0.94	1.04	0.789

Il grassetto evidenzia i valori significativi  
 Abbreviazioni: OR, odds ratio; CT, calcitonina; LN, linfonodi

**Tabella 7. Regressione di Cox considerando i valori preoperatori e quelli precoci (i.e. a sei mesi) di CT, usando l'esito finale come variabile dipendente**

	Wald	OR	Intervallo di confidenza 95%		p-value
			Inferiore	Superiore	
<b>pCT</b>	6.98	16.28	2.05	129.02	<b>0.008</b>
<b>CT ≥ 284 pg/ml</b>	0.706	0.65	0.24	1.76	0.401

Il grassetto evidenzia i valori significativi  
 Abbreviazioni: OR, odds ratio; CT, calcitonina; pCT, calcitonina precoce valutata a sei mesi

**Tabella 8. Regressione di Cox considerando i valori precoci (i.e. a sei mesi) di CT e le principali caratteristiche tumorali, usando l'esito finale come variabile dipendente**

	Wald	OR	Intervallo di confidenza 95%		p-value
			Inferiore	Superiore	
<b>pCT</b>	5.83	12.86	1.62	102.19	<b>0.016</b>
<b>Dimensioni del tumore</b>	1.40	1.02	0.99	1.05	0.236
<b>Multifocalità</b>	0.11	1.27	0.31	5.22	0.735
<b>N1</b>	0.19	0.73	0.18	2.97	0.665

Il grassetto evidenzia i valori significativi  
 Abbreviazioni: OR, odds ratio; CT, calcitonina; pCT, calcitonina precoce valutata a sei mesi; N1, linfonodi positivi

**Tabella 9. Regressione di Cox considerando i valori precoci (i.e. a sei mesi) di CT, la multifocalità e lo stadio, usando l'esito finale come variabile dipendente**

	Wald	OR	Intervallo di confidenza 95%		p-value
			Inferiore	Superiore	
<b>pCT</b>	6.66	15.71	1.94	127.34	<b>0.010</b>
<b>Multifocalità</b>	0.99	1.19	0.39	3.61	0.753
<b>Stadio</b>	0.34	0.87	0.55	1.39	0.558

Il grassetto evidenzia i valori significativi  
 Abbreviazioni: OR, odds ratio; CT, calcitonina; pCT, calcitonina precoce valutata a sei mesi; N1, linfonodi positivi

**Tabella 10. Regressione di Cox considerando la variabile valori-soglia CT concordi, la multifocalità e la presenza di linfonodi metastatici, usando l'esito finale come variabile dipendente**

	Wald	OR	Intervallo di confidenza 95%		p-value
			Inferiore	Superiore	
<b>Valori-soglia CT concordi<sup>a</sup></b>	6.32	19.72	1.93	201.57	<b>0.012</b>
<b>Multifocalità</b>	0.82	0.21	0.04	1.07	0.061
<b>N1</b>	0.95	4.03	0.62	26.02	0.143

a, sono considerati valori-soglia di CT concordi i casi in cui entrambi i parametri risultano contestualmente sopra o sotto le soglie individuate in fase preoperatoria e a sei mesi.

Il grassetto evidenzia i valori significativi  
 Abbreviazioni: OR, odds ratio; CT, calcitonina; N1, linfonodi positivi

## 5. Discussione

Il presente studio mostra che una valutazione precoce – a sei mesi dall'intervento – è economica ed altamente informativa nella predizione dell'esito della patologia per i pazienti che non presentano metastasi a distanza alla diagnosi. Una riduzione dei livelli di CT del 95% rispetto ai valori preoperatori riduce il rischio di persistenza di malattia del 96.7%. Inoltre, valori dosabili di CT ad una valutazione precoce – i.e. a sei mesi dall'intervento - rappresentano un campanello d'allarme affidabile di persistenza di malattia, aumentando il rischio di ripresa di CMT fino a 16 volte, indipendentemente da altri fattori prognostici sfavorevoli, come la multifocalità, la dimensione del tumore o la presenza di linfonodi positivi. Al contrario, i livelli preoperatori di CT si sono confermati come associati alla dimensione del tumore e al numero di linfadenopatie, ma sono risultati meno performanti nello stimare il rischio di malattia a medio e lungo termine. Nonostante i progressi in termini di trattamenti sistemici, il monitoraggio tradizionale e i fattori prognostici del CMT non hanno subito evoluzioni. Sebbene sia noto che valori indosabili di CT rappresentino un predittore favorevole di guarigione (1,9,11,97,98), una quota significativa di pazienti mostra uno spettro variabile di valori, rientrando, così, in un campo di incertezza prognostica (10). La CT è ancora il marcatore più specifico del CMT, ma ad oggi, il significato e le tempistiche di alcuni dosaggi non sono stati ancora chiariti. I tempi di raddoppiamento della CT e del CEA rappresentano un allarme per progressione di malattia, ma richiedono valutazioni seriate e, quindi, non rappresentano un predittore precoce (1).

Diversi studi hanno esplorato il significato di alcuni fattori prognostici per il CMT. In quest'ottica, il coinvolgimento linfonodale, la presenza di metastasi a distanza e, di conseguenza, lo stadio di malattia, sono convenzionalmente riconosciuti come fattori sfavorevoli (97,99–104). D'altro canto, il valore di alcune caratteristiche cliniche, come età e sesso, restano più controverse, a differenza del loro ruolo nella controparte dei tumori ad origine follicolare. Un solo studio su una coorte di soli 31 pazienti ha mostrato una netta incidenza del CMT nei soggetti di sesso femminile (101). Il ruolo dell'età è ancora più incerto. I pazienti più anziani sembrano essere gravati da una

prognosi peggiore, ma con evidenze discordanti e senza una soglia di età comunemente accettata (101,104,105).

Dal punto di vista biochimico, il ruolo dei dosaggi precoci di CT nel post intervento non è stato completamente esplorato. Le evidenze disponibili provengono da studi datati e spesso gravati da distorsioni metodologiche. Ad esempio, Modigliani e Colleghi (97) hanno analizzato un' ampia coorte storica di 889 CMT dal registro francese del *Groupe d'Etude des Tumeurs à Calcitonine* (GETC). Gli autori hanno osservato che solo l'età e lo stadio rappresentano fattori prognostici significativi e che la guarigione biochimica, intesa come normalizzazione (e non indosabilità) di CT e CEA prediceva una sopravvivenza a 10 anni del 98% (97). Tuttavia, sono stati utilizzati differenti metodi per la valutazione della CT, risentendo sia del periodo storico della diagnosi che del centro in cui il paziente era seguito e non sono stati forniti dati specifici sui valori post operatori di CT (97). Uno studio del 2020 di Kotwal e Collaboratori (100) su 163 MTC ha osservato che, quando i valori post-operatori di CT sono dosabili, la probabilità di sopravvivenza si riduce con un HR di 1.00 per ogni 100 pg/ml di CT. Ancora una volta, però, non sono state fornite specifiche sui dosaggi di CT a sei mesi, né alcun valore soglia; inoltre, questa popolazione ha considerato una proporzione significativa di soggetti M1 – i.e. con metastasi a distanza – a differenza del presente studio (100).

L'importanza di una valutazione postoperatoria precoce è stata osservata in uno studio su 193 CMT (102), dove lo stato di malattia evidenziato nel corso dell'ultimo controllo disponibile (cioè remissione completa o persistenza di malattia) è risultato associato a quello già presente a un anno. Gli Autori hanno riscontrato che la presenza di estensione extra-tiroidea e lo stato M1 alla diagnosi sono predittori di recidiva di malattia, mentre i dati biochimici non sono stati analizzati (102).

Le attuali linee guida suggeriscono di effettuare una prima valutazione della CT tre mesi dopo la chirurgia (1). Tuttavia, questa tempistica potrebbe essere troppo precoce per individuare il nadir del marcatore, poiché differenti isoforme di CT o aggregati tumorali dell'ormone possono persistere più a lungo nel torrente ematico, richiedendo maggior tempo per essere eliminati (9).

Il presente studio è il primo ad esplorare il valore prognostico dei livelli di CT a sei mesi dall'intervento. In linea con precedenti evidenze (97,99–104), la prognosi dei pazienti appare favorevole quando una tempestiva cura biochimica viene raggiunta. D'altro canto, nei pazienti non-M1, la persistenza di valori di CT bassi, ma dosabili, può celare una persistenza di malattia e individuare un gruppo di pazienti a rischio intermedio, che richiedono maggior attenzione nel monitoraggio postoperatorio. Infatti, solo il 10% dei pazienti con valori di CT ancora dosabili a sei mesi ha mostrato uno stato di remissione completa all'ultimo controllo disponibile.

La numerosità campionaria e il disegno monocentrico e retrospettivo dello studio rappresentano le debolezze maggiori dell'analisi. Tuttavia, la rarità della patologia e la popolazione estremamente selezionata, con la sola presenza di malattia locoregionale alla diagnosi, l'uniformità delle indagini cliniche, biochimiche ed istologiche, insieme alle informazioni sul monitoraggio a medio e lungo termine – necessarie per categorizzare l'esito a distanza della patologia – rendono i risultati di questa analisi di interesse nell'ambito del CMT.

## **6. Conclusioni**

Il CMT rappresenta una patologia rara e insidiosa, nella quale validi fattori prognostici sono difficili da individuare. Una valutazione precoce della CT sembra rappresentare un facile ed economico test per selezionare, nell'ambito di una popolazione senza metastasi a distanza alla diagnosi e con CMT sia sporadico che ereditario, un sottogruppo a maggior rischio di ripresa di malattia. Laddove confermato in una coorte più ampia, possibilmente prospettica e multicentrica, un valore-soglia di CT a sei mesi potrebbe aiutare a selezionare i casi meritevoli di valutazioni aggiuntive durante la presa in carico.

## 7. Referenze

1. Wells SA, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, Lee N, Machens A, Moley JF, Pacini F, Raue F, Frank-Raue K, Robinson B, Rosenthal MS, Santoro M, Schlumberger M, Shah M, Waguespack SG, American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2015;25(6):567–610.
2. Scollo C, Baudin E, Travagli J-P, Caillou B, Bellon N, Leboulleux S, Schlumberger M. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(5):2070–2075.
3. Machens A, Hinze R, Thomusch O, Dralle H. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World J. Surg.* 2002;26(1):22–28.
4. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, Agate L, Vivaldi A, Faviana P, Basolo F, Miccoli P, Berti P, Pacini F, Pinchera A. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(3):682–687.
5. Wells SA, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, Baudin E, Elisei R, Jarzab B, Vasselli JR, Read J, Langmuir P, Ryan AJ, Schlumberger MJ. Vandetanib in Patients With Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(2):134–141.
6. Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, Schöffski P, Brose MS, Shah MH, Licitra L, Jarzab B, Medvedev V, Kreissl MC, Niederle B, Cohen EEW, Wirth LJ, Ali H, Hessel C, Yaron Y, Ball D, Nelkin B, Sherman SI. Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(29):3639–3646.
7. Wirth LJ, Sherman E, Robinson B, Solomon B, Kang H, Lorch J, Worden F, Brose M, Patel J, Leboulleux S, Godbert Y, Barlesi F, Morris JC, Owonikoko TK, Tan DSW, Gautschi O, Weiss J, de la Fouchardière C, Burkard ME, Laskin J, Taylor MH, Kroiss M, Medioni J, Goldman JW, Bauer TM, Levy B, Zhu VW, Lakhani N, Moreno V, Ebata K, Nguyen M, Heirich D, Zhu EY, Huang X, Yang L, Kherani J, Rothenberg SM, Drilon A, Subbiah V, Shah MH, Cabanillas ME. Efficacy of Selpercatinib in RET-Altered Thyroid Cancers. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(9):825–835.
8. Kiriakopoulos A, Giannakis P, Menenakos E. Calcitonin: current concepts and differential diagnosis. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2022;13:20420188221099344.
9. Fugazzola L, Pinchera A, Luchetti F, Iacconi P, Miccoli P, Romei C, Puccini M, Pacini F. Disappearance rate of serum calcitonin after total thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma. *Int. J. Biol. Markers* 1994;9(1):21–24.
10. Rowland KJ, Jin LX, Moley JF. Biochemical cure after reoperations for medullary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* 2015;22(1):96–102.
11. Pellegriti G, Leboulleux S, Baudin E, Bellon N, Scollo C, Travagli JP, Schlumberger M. Long-term outcome of medullary thyroid carcinoma in patients with normal postoperative medical imaging. *Br. J. Cancer* 2003;88(10):1537–1542.
12. Vargatu I. WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. *Acta Endocrinol. Buchar.* 2016;12(1):113.

13. Miranda-Filho A, Lortet-Tieulent J, Bray F, Cao B, Franceschi S, Vaccarella S, Dal Maso L. Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(4):225–234.
14. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA* 2017;317(13):1338–1348.
15. Opsahl EM, Akslen LA, Schlichting E, Aas T, Brauckhoff K, Hagen AI, Rosenlund AF, Sigstad E, Grøholt KK, Mæhle L, Engebretsen LF, Jørgensen LH, Varhaug JE, Bjørø T. Trends in Diagnostics, Surgical Treatment, and Prognostic Factors for Outcomes in Medullary Thyroid Carcinoma in Norway: A Nationwide Population-Based Study. *Eur. Thyroid J.* 2019;8(1):31–40.
16. Zeng Z, Li K, Kang W, Yu J, Wang X, Zhang Z, Sun J, Ouyang S. Changing patterns of thyroid cancer in different stages of Universal Salt Iodization in Peking Union Medical College Hospital, 1986–2018. *Gland Surg.* 2020;9(5):1338345–1331345.
17. Zhao Z, Yin X, Zhang X, Li Z, Wang D. Comparison of pediatric and adult medullary thyroid carcinoma based on SEER program. *Sci. Rep.* 2020;10(1):13310.
18. Milićević S, Bergant D, Žagar T, Perić B. Crude annual incidence rate of medullary thyroid cancer and RET mutation frequency. *Croat. Med. J.* 2021;62(2):110–119.
19. Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, Stochholm K, Poulsen PL, Rasmussen ÅK, Feldt-Rasmussen U, Schytte S, Londero SC, Pedersen HB, Hahn CH, Djurhuus BD, Bentzen J, Möller S, Gaustadnes M, Rossing M, Nielsen FC, Brixen K, Frederiksen AL, Godballe C. Incidence and prevalence of sporadic and hereditary MTC in Denmark 1960–2014: a nationwide study. *Endocr. Connect.* 2018;7(6):829–839.
20. Lennon P, Deady S, White N, Lambert D, Healy ML, Green A, Kinsella J, Timon C, O’Neill JP. Aggressive medullary thyroid cancer, an analysis of the Irish National Cancer Registry. *Ir. J. Med. Sci.* 2017;186(1):89–95.
21. Lebbink CA, van den Broek MFM, Kwast ABG, Derikx JPM, Dierselhuis MP, Kruijff S, Links TP, van Trotsenburg ASP, Valk GD, Vriens MR, Verrijn Stuart AA, van Santen HM, Karim-Kos HE. Opposite Incidence Trends for Differentiated and Medullary Thyroid Cancer in Young Dutch Patients over a 30-Year Time Span. *Cancers* 2021;13(20):5104.
22. Frank-Raue K, Rondot S, Schulze E, Raue F. Change in the spectrum of RET mutations diagnosed between 1994 and 2006. *Clin. Lab.* 2007;53(5–6):273–282.
23. Shaha AR, Cohen T, Ghossein R, Tuttle RM. Late-onset medullary carcinoma of the thyroid: need for genetic testing and prophylactic thyroidectomy in adult family members. *The Laryngoscope* 2006;116(9):1704–1707.
24. Wells SA. Advances in The Management of MEN 2- From Improved Surgical and Medical Treatment to Novel Kinase Inhibitors. *Endocr. Relat. Cancer* 2018;25(2):T1–T13.
25. Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, Stochholm K, Poulsen PL, Rasmussen ÅK, Feldt-Rasmussen U, Schytte S, Pedersen HB, Hahn CH, Bentzen J, Möller S, Gaustadnes M, Rossing M, Nielsen FC, Brixen K, Frederiksen AL, Godballe C. Incidence and prevalence of multiple endocrine neoplasia 2A in Denmark 1901-2014: a nationwide study. *Clin. Epidemiol.* 2018;10:1479–1487.
26. Opsahl EM, Brauckhoff M, Schlichting E, Helset K, Svartberg J, Brauckhoff K, Mæhle L, Engebretsen LF, Sigstad E, Grøholt KK, Akslen LA, Jørgensen LH, Varhaug JE, Bjørø T. A Nationwide Study of

- Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A in Norway: Predictive and Prognostic Factors for the Clinical Course of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2016;26(9):1225–1238.
27. Machens A, Lorenz K, Sekulla C, Höppner W, Frank-Raue K, Raue F, Dralle H. Molecular epidemiology of multiple endocrine neoplasia 2: implications for RET screening in the new millennium. *Eur. J. Endocrinol.* 2013;168(3):307–314.
  28. Machens A, Lorenz K, Weber F, Dralle H. Geographic epidemiology of medullary thyroid cancer families: unearthing European ancestral heritage. *Endocr. Relat. Cancer* 2018;25(4):L27–L30.
  29. Romei C, Mariotti S, Fugazzola L, Taccaliti A, Pacini F, Opocher G, Mian C, Castellano M, degli Uberti E, Ceccherini I, Cremonini N, Seregni E, Orlandi F, Ferolla P, Puxeddu E, Giorgino F, Colao A, Loli P, Bondi F, Cosci B, Bottici V, Cappai A, Pinna G, Persani L, Verga U, Boscaro M, Castagna MG, Cappelli C, Zatelli MC, Faggiano A, Francia G, Brandi ML, Falchetti A, Pinchera A, Elisei R, ItaMEN network. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): results from the ItaMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *Eur. J. Endocrinol.* 2010;163(2):301–308.
  30. Loveday C, Josephs K, Chubb D, Gunning A, Izatt L, Tischkowitz M, Ellard S, Turnbull C. p.Val804Met, the Most Frequent Pathogenic Mutation in RET, Confers a Very Low Lifetime Risk of Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018;103(11):4275–4282.
  31. van Veelen W, de Groot JWB, Acton DS, Hofstra RMW, Höppener JWM, Links TP, Lips CJM. Medullary thyroid carcinoma and biomarkers: past, present and future. *J. Intern. Med.* 2009;266(1):126–140.
  32. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J-P, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2004;61(3):299–310.
  33. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2016;26(1):1–133.
  34. Elisei R, Bottici V, Luchetti F, Di Coscio G, Romei C, Grasso L, Miccoli P, Iacconi P, Basolo F, Pinchera A, Pacini F. 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. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89(1):163–168.
  35. Maino F, Dalmiglio C, Benenati N, Campanile M, Pilli T, Forleo R, Brilli L, Ciuoli C, Cantara S, Capezzone M, Cartocci A, Pacini F, Castagna MG. Calcitonin Levels in Thyroid Disease Are Not Affected by Autoimmune Thyroiditis or Differentiated Thyroid Carcinoma. *Eur. Thyroid J.* 2021;10(4):295–305.
  36. Weber T, Poplawski A, Vorländer C, Dotzenrath C, Ringelband R, Schabram J, Passler C, Zielke A, Schlegel N, Nies C, Krenz D, Jähne J, Schwab R, Bartsch DK, Binnebösel M, Kemen M, Klinger C, Buhr H, Lorenz K. Preoperative calcitonin testing improves the diagnosis of medullary thyroid carcinoma in female and male patients. *Eur. J. Endocrinol.* 2022;186(2):223–231.
  37. Silvestre C, Sampaio Matias J, Proença H, Bugalho MJ. Calcitonin Screening in Nodular Thyroid Disease: Is There a Definitive Answer? *Eur. Thyroid J.* 2019;8(2):79–82.



38. Rosario PW, Mourão GF. Diagnostic Utility of Procalcitonin for Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma in Patients with Nodular Disease and Mild or Moderate Hypercalcitoninemia. *Horm. Metab. Res.* 2022;54(04):220–223.
39. Giovanella L, Imperiali M, Piccardo A, Taborelli M, Verburg FA, Daurizio F, Trimboli P. Procalcitonin measurement to screen medullary thyroid carcinoma: A prospective evaluation in a series of 2705 patients with thyroid nodules. *Eur. J. Clin. Invest.* 2018;48(6):e12934.
40. Verbeek HH, Groot JWB de, Sluiter WJ, Kobold ACM, Heuvel ER van den, Plukker JT, Links TP. Calcitonin testing for detection of medullary thyroid cancer in people with thyroid nodules. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020;(3). doi:10.1002/14651858.CD010159.pub2.
41. Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2009;5(1):35–44.
42. Fugazzola L. Stimulated calcitonin cut-offs by different tests. *Eur. Thyroid J.* 2013;2(1):49–56.
43. Asa SL, Mete O. Cytology and Pathology: Pitfalls and Challenges. In: Wang TS, Evans DB, eds. *Medullary Thyroid Cancer*. Cham: Springer International Publishing; 2016:33–46.
44. Trimboli P, Giannelli J, Marques B, Piccardo A, Crescenzi A, Deandrea M. Head-to-head comparison of FNA cytology vs. calcitonin measurement in FNA washout fluids (FNA-CT) to diagnose medullary thyroid carcinoma. A systematic review and meta-analysis. *Endocrine* 2022;75(1):33–39.
45. Thomas CM, Asa SL, Ezzat S, Sawka AM, Goldstein D. Diagnosis and pathologic characteristics of medullary thyroid carcinoma-review of current guidelines. *Curr. Oncol. Tor. Ont* 2019;26(5):338–344.
46. Takahashi M. RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2022;98(3):112–125.
47. Randle RW, Bates MF, Schneider DF, Sippel RS, Pitt SC. Survival in patients with medullary thyroid cancer after less than the recommended initial operation. *J. Surg. Oncol.* 2018;117(6):1211–1216.
48. Juez LD, Mercader E, Amunategui I, Febrero B, Rodríguez JM, Gómez-Ramírez J, MECANO Collaboration Group. Extension of Prophylactic Surgery in Medullary Thyroid Carcinoma. Differences Between Sporadic and Hereditary Tumours According to Calcitonin Levels and Lymph Node Involvement. *World J. Surg.* 2022;46(4):820–828.
49. Haddad RI, Nasr C, Bischoff L, Busaidy NL, Byrd D, Callender G, Dickson P, Duh Q-Y, Ehya H, Goldner W, Haymart M, Hoh C, Hunt JP, Iagaru A, Kandeel F, Kopp P, Lamonica DM, McIver B, Raeburn CD, Ridge JA, Ringel MD, Scheri RP, Shah JP, Sippel R, Smallridge RC, Sturgeon C, Wang TN, Wirth LJ, Wong RJ, Johnson-Chilla A, Hoffmann KG, Gurski LA. NCCN Guidelines Insights: Thyroid Carcinoma, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 2018;16(12):1429–1440.
50. Scerrino G, Cocorullo G, Orlando G, Rotolo G, Corigliano A, Amato C, Proclamà MP, Vitale I, Melfa G, Paladino NC. Predictive factors for lymph node involvement in sporadic medullary thyroid microcarcinoma: a systematic review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2022;26(3):1004–1016.
51. Zhang D, Colombo C, Sun H, Kim HY, Pino A, De Leo S, Gazzano G, Persani L, Dionigi G, Fugazzola L. Unilateral Surgery for Medullary Thyroid Carcinoma: Seeking for Clinical Practice Guidelines. *Front. Endocrinol.* 2022;13. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.875875>. Accessed January 13, 2023.

52. Park J-W, Chung K-W, Yun J-S, Kwon H, Kim HY, Nam KH, Park KS, Park MH, Bae JS, Youn HJ, Lee KE, Lim CY, Jung JH, Choe J-H, Taskforce TKA of T and ES (KATES) G, Kim LS, Lee SJ, Yoon JH. Surgical Treatment Guidelines for Patients with Differentiated Thyroid Cancer: The Korean Association of Thyroid and Endocrine Surgeons (KATES) Guidelines Taskforce. *Korean J. Endocr. Surg.* 2017;17(1):1–18.
53. Mitchell AL, Gandhi A, Scott-Coombes D, Perros P. Management of thyroid cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J. Laryngol. Otol.* 2016;130(S2):S150–S160.
54. Tuttle RM, Haddad RI, Ball DW, Byrd D, Dickson P, Duh Q-Y, Ehya H, Haymart M, Hoh C, Hunt JP, Iagaru A, Kandeel F, Kopp P, Lamonica DM, Lydiatt WM, McCaffrey J, Moley JF, Parks L, Raeburn CD, Ridge JA, Ringel MD, Scheri RP, Shah JP, Sherman SI, Sturgeon C, Waguespack SG, Wang TN, Wirth LJ, Hoffmann KG, Hughes M. Thyroid carcinoma, version 2.2014. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 2014;12(12):1671–1680; quiz 1680.
55. Dralle H, Musholt TJ, Schabram J, Steinmüller T, Frilling A, Simon D, Goretzki PE, Niederle B, Scheuba C, Clerici T, Hermann M, Kußmann J, Lorenz K, Nies C, Schabram P, Trupka A, Zielke A, Karges W, Luster M, Schmid KW, Vordermark D, Schmoll H-J, Mühlenberg R, Schober O, Rimmele H, Machens A, German Societies of General and Visceral Surgery; Endocrinology; Nuclear Medicine; Pathology; Radiooncology; Oncological Hematology; and the German Thyroid Cancer Patient Support Organization Ohne Schilddrüse leben e.V. German Association of Endocrine Surgeons practice guideline for the surgical management of malignant thyroid tumors. *Langenbecks Arch. Surg.* 2013;398(3):347–375.
56. Schmid KW. Histopathology of C Cells and Medullary Thyroid Carcinoma. In: Raue F, ed. *Medullary Thyroid Carcinoma: Biology – Management – Treatment*. Recent Results in Cancer Research. Cham: Springer International Publishing; 2015:41–60.
57. Moura MM, Cabrera RA, Esteves S, Cavaco BM, Soares P, Leite V. Correlation of molecular data with histopathological and clinical features in a series of 66 patients with medullary thyroid carcinoma. *J. Endocrinol. Invest.* 2021;44(9):1837–1846.
58. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing; 2017. Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9783319406176>. Accessed May 27, 2020.
59. Park SY, Cho YY, Kim HI, Choe J-H, Kim J-H, Kim JS, Oh YL, Hahn SY, Shin JH, Kim K, Kim SW, Chung JH, Kim TH. Clinical Validation of the Prognostic Stage Groups of the Eighth-Edition TNM Staging for Medullary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018;103(12):4609–4616.
60. Machens A, Lorenz K, Weber F, Dralle H. Superiority of metastatic lymph node ratio over number of node metastases and TNM/AJCC N classification in predicting cancer-specific survival in medullary thyroid cancer. *Head Neck* 2022;44(12):2717–2726.
61. Kim J, Park J, Park H, Choi MS, Jang HW, Kim TH, Kim SW, Chung JH. Metastatic Lymph Node Ratio for Predicting Recurrence in Medullary Thyroid Cancer. *Cancers* 2021;13(22):5842.
62. Qu N, Shi R-L, Lu Z-W, Liao T, Wen D, Sun G-H, Li D-S, Ji Q-H. Metastatic lymph node ratio can further stratify risk for mortality in medullary thyroid cancer patients: A population-based analysis. *Oncotarget* 2016;7(40):65937–65945.

63. Castinetti F, Taïeb D. Positron Emission Tomography Imaging in Medullary Thyroid Carcinoma: Time for Reappraisal? *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2021;31(2):151–155.
64. Kushchayev SV, Kushchayeva YS, Tella SH, Glushko T, Pacak K, Teytelboym OM. Medullary Thyroid Carcinoma: An Update on Imaging. *J. Thyroid Res.* 2019;2019:e1893047.
65. Wang L, Kou H, Chen W, Lu M, Zhou L, Zou C. The Diagnostic Value of Ultrasound in Medullary Thyroid Carcinoma: A Comparison With Computed Tomography. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020;19:1533033820905832.
66. Giovanella L, Treglia G, Iakovou I, Mihailovic J, Verburg FA, Luster M. EANM practice guideline for PET/CT imaging in medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2020;47(1):61–77.
67. Treglia G, Cocciolillo F, Di Nardo F, Poscia A, de Waure C, Giordano A, Rufini V. Detection rate of recurrent medullary thyroid carcinoma using fluorine-18 dihydroxyphenylalanine positron emission tomography: a meta-analysis. *Acad. Radiol.* 2012;19(10):1290–1299.
68. Saponjski J, Macut D, Saranovic DS, Radovic B, Artiko V. Clinical relevance of 18F-FDG PET/CT in the postoperative follow-up of patients with history of medullary thyroid cancer. *Radiol. Oncol.* 2020;55(1):18–25.
69. Hayes AR, Crawford A, Al Riyami K, Tang C, Bomanji J, Baldeweg SE, Wild D, Morganstein D, Harry A, Grozinsky-Glasberg S, Oleinikov K, Khoo B, Caplin ME, Nicolas GP, Grossman AB. Metastatic Medullary Thyroid Cancer: The Role of 68Gallium-DOTA-Somatostatin Analogue PET/CT and Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2021;106(12):e4903–e4916.
70. Bodet-Milin C, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Ansquer C, Rauscher A, Frampas E, Toulgoat F, Masson D, Bourgeois M, Cerato E, Rohmer V, Couturier O, Drui D, Goldenberg DM, Sharkey RM, Barbet J, Kraeber-Bodere F. Anti-CEA Pretargeted Immuno-PET Shows Higher Sensitivity Than DOPA PET/CT in Detecting Relapsing Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Post Hoc Analysis of the iPET-MTC Study. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 2021;62(9):1221–1227.
71. Hess V, Glimelius B, Grawe P, Dietrich D, Bodoky G, Ruhstaller T, Bajetta E, Saletti P, Figer A, Scheithauer W, Herrmann R. CA 19-9 tumour-marker response to chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer enrolled in a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2008;9(2):132–138.
72. Vargas CVF, Ceolin L, Scheffel RS, Benini AF, Graudenz MS, Maia AL. The tissue expression pattern of CA 19.9 is associated with oncological features in medullary thyroid carcinoma. *Endocrine* 2020;70(3):544–551.
73. Elisei R, Lorusso L, Piaggi P, Torregrossa L, Pellegrini G, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Pani F, Cacciato Insilla A, Casella F, Ciampi R, Tognetti I, Materazzi G, Basolo F, Romei C. Elevated level of serum carbohydrate antigen 19.9 as predictor of mortality in patients with advanced medullary thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.* 2015;173(3):297–304.
74. Lorusso L, Romei C, Piaggi P, Fustini C, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Viola D, Pellegrini G, Elisei R. Ca19.9 Positivity and Doubling Time Are Prognostic Factors of Mortality in Patients with Advanced Medullary Thyroid Cancer with No Evidence of Structural Disease Progression According to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2021;31(7):1050–1055.
75. Giovanella L, Fontana M, Keller F, Campenni A, Ceriani L, Paone G. Circulating pro-gastrin releasing peptide (ProGRP) in patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* 2021;59(9):1569–1573.

76. Barchiesi V, Simeon V, Sandomenico C, Cantile M, Cerasuolo D, Chiodini P, Morabito A, Cavalcanti E. Circulating progastrin-releasing peptide in the diagnosis of Small Cell Lung Cancer (SCLC) and in therapeutic monitoring. *J. Circ. Biomark.* 2021;10(1):9–13.
77. Liang X, Zhu J, Cai M, Dai Z, Fang L, Chen H, Yu L, Lin Y, Lin E, Wu G. ProGRP AS A NOVEL BIOMARKER FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MEDULLARY THYROID CARCINOMA IN PATIENTS WITH THYROID NODULES. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 2020;26(5):514–522.
78. Alves TG, Kasamatsu TS, Yang JH, Meneghetti MCZ, Mendes A, Kunii IS, Lindsey SC, Camacho CP, Dias da Silva MR, Maciel RMB, Vieira JGH, Martins JRM. Macrocalcitonin Is a Novel Pitfall in the Routine of Serum Calcitonin Immunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(2):653–658.
79. Romei C, Ciampi R, Casella F, Tacito A, Torregrossa L, Ugolini C, Basolo F, Materazzi G, Vitti P, Elisei R. RET mutation heterogeneity in primary advanced medullary thyroid cancers and their metastases. *Oncotarget* 2018;9(11):9875–9884.
80. Cote GJ, Evers C, Hu MI, Grubbs EG, Williams MD, Hai T, Duose DY, Houston MR, Bui JH, Mehrotra M, Waguespack SG, Busaidy NL, Cabanillas ME, Habra MA, Luthra R, Sherman SI. Prognostic Significance of Circulating RET M918T Mutated Tumor DNA in Patients With Advanced Medullary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017;102(9):3591–3599.
81. Ciampi R, Romei C, Ramone T, Matrone A, Prete A, Gambale C, Materazzi G, De Napoli L, Torregrossa L, Basolo F, Castagna MG, Brilli L, Ferretti E, Elisei R. Pre- and Post-operative Circulating Tumoral DNA in Patients With Medullary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2022;107(8):e3420–e3427.
82. Xu JY, Handy B, Michaelis CL, Waguespack SG, Hu MI, Busaidy N, Jimenez C, Cabanillas ME, Fritsche HA, Cote GJ, Sherman SI. Detection and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Metastatic Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(11):4461–4467.
83. Sriramareddy SN, Hamoir E, Chavez M, Louis R, Beckers A, Willems L. Tumor cells may circulate in medullary thyroid cancer patients independently of serum calcitonin. *Endocr. Relat. Cancer* 2018. doi:10.1530/ERC-18-0180.
84. Alzumaili B, Xu B, Spanheimer PM, Tuttle RM, Sherman E, Katabi N, Dogan S, Ganly I, Untch BR, Ghossein RA. Grading of medullary thyroid carcinoma on the basis of tumor necrosis and high mitotic rate is an independent predictor of poor outcome. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 2020;33(9):1690–1701.
85. Li C, Zhang H, Li S, Zhang D, Li J, Dionigi G, Liang N, Sun H. Prognostic Impact of Inflammatory Markers PLR, LMR, PDW, MPV in Medullary Thyroid Carcinoma. *Front. Endocrinol.* 2022;13:861869.
86. Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Aupérin A, Leboulleux S, Chehboun A, Troalen F, Dromain C, Lumbroso J, Baudin E, Schlumberger M. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur. J. Endocrinol.* 2008;158(2):239–246.
87. Barbet J, Champion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal J-F, GTE Study Group. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90(11):6077–6084.

88. Meijer JAA, le Cessie S, van den Hout WB, Kievit J, Schoones JW, Romijn JA, Smit JWA. Calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times as prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: a structured meta-analysis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2010;72(4):534–542.
89. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, Bugalho MJ, Leite V. Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* 2009;100(11):1777–1783.
90. Moura MM, Cavaco BM, Leite V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 2015;22(5):R235-252.
91. Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, Cosci B, Romei C, Barollo S, Cirello V, Bottici V, Marconcini G, Rosa PM, Borrello MG, Basolo F, Ugolini C, Materazzi G, Pinchera A, Elisei R. Evidence of a low prevalence of RAS mutations in a large medullary thyroid cancer series. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2013;23(1):50–57.
92. Wirth LJ, Brose MS, Elisei R, Capdevila J, Hoff AO, Hu MI, Tahara M, Robinson B, Gao M, Xia M, Maeda P, Sherman E. LIBRETTO-531: a phase III study of selpercatinib in multikinase inhibitor-naïve RET-mutant medullary thyroid cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* 2022;18(28):3143–3150.
93. Mancikova V, Inglada-Pérez L, Curras-Freixes M, de Cubas AA, Gómez Á, Letón R, Kersten I, Leandro-García LJ, Comino-Méndez I, Apellaniz-Ruiz M, Sánchez L, Cascón A, Sastre-Marcos J, García JF, Rodríguez-Antona C, Robledo M. VEGF, VEGFR3, and PDGFRB Protein Expression Is Influenced by RAS Mutations in Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2014;24(8):1251–1255.
94. Puerto M, Borson-Chazot F, Tabarin A. Updates on therapy for medullary thyroid cancer in 2021. *Ann. Endocrinol.* 2022;83(2):114–118.
95. Hadoux J, Pacini F, Tuttle RM, Schlumberger M. Management of advanced medullary thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(1):64–71.
96. Schlumberger M, Elisei R, Müller S, Schöffski P, Brose M, Shah M, Licitra L, Krajewska J, Kreissl MC, Niederle B, Cohen EEW, Wirth L, Ali H, Clary DO, Yaron Y, Mangeshkar M, Ball D, Nelkin B, Sherman S. Overall survival analysis of EXAM, a phase III trial of cabozantinib in patients with radiographically progressive medullary thyroid carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2017;28(11):2813–2819.
97. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A, Schlumberger M, Bigorgne JC, Dumontier P, Leclerc L, Corcuff B, Guilhem I. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'étude des tumeurs à calcitonine. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1998;48(3):265–273.
98. Ismailov SI, Piulatova NR. Postoperative calcitonin study in medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 2004;11(2):357–363.
99. Miccoli P, Minuto MN, Ugolini C, Molinaro E, Basolo F, Berti P, Pinchera A, Elisei R. Clinically unpredictable prognostic factors in the outcome of medullary thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2007;14(4):1099–1105.
100. Kotwal A, Erickson D, Geske JR, Hay ID, Castro MR. Predicting Outcomes in Sporadic and Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma over Two Decades. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 2021;31(4):616–626.

101. Hamdy O, Awny S, Metwally IH. Medullary thyroid cancer: epidemiological pattern and factors contributing to recurrence and metastasis. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 2020;102(7):499–503.
102. Twito O, Grozinsky-Glasberg S, Levy S, Bachar G, Gross DJ, Benbassat C, Rozental A, Hirsch D. Clinico-pathologic and dynamic prognostic factors in sporadic and familial medullary thyroid carcinoma: an Israeli multi-center study. *Eur. J. Endocrinol.* 2019;181(1):13–21.
103. Wu X, Li B, Zheng C. Clinical Characteristics, Surgical Management, and Prognostic Factors of Medullary Thyroid Carcinoma: A Retrospective, Single-Center Study. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2022;21:15330338221078436.
104. Machens A, Lorenz K, Dralle H. Prediction of biochemical cure in patients with medullary thyroid cancer. *Br. J. Surg.* 2020;107(6):695–704.
105. Matrone A, Gambale C, Prete A, Piaggi P, Cappagli V, Bottici V, Romei C, Ciampi R, Torregrossa L, De Napoli L, Molinaro E, Materazzi G, Basolo F, Elisei R. Impact of Advanced Age on the Clinical Presentation and Outcome of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Cancers* 2020;13(1):E94.