



UNIVERSITÀ DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE

CICLO XXIX

**VALUTAZIONE DI NODULI TIROIDEI CITOLOGICAMENTE
INDETERMINATI DIAGNOSTICATI CONSECUTIVAMENTE IN UN
PERIODO DI TRE ANNI IN UN'AREA A MODERATA CARENZA IODICA:
RISULTATI DI ECOGRAFIA, ANALISI BIOMOLECOLARE
AGOASPIRATIVA ED ISTOLOGIA.**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Riccardo Bonadonna

Tutore:
Chiar.mo Prof. Graziano Ceresini

Dottorando: Dott.ssa Michela Marina

Anni 2014/2017

*“Medicine is a science of uncertainty
and an art of probability”*

Sir William Osler

INDICE

ABSTRACT	8
PARTE INTRODUTTIVA.....	11
EPIDEMIOLOGIA	12
IL NODULO TIROIDEO.....	15
CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE DEI TUMORI TIROIDEI	18
CARCINOMA TIROIDEO DIFFERENZIATO.....	18
Carcinoma papillare.....	18
Carcinoma follicolare	21
CARCINOMA SCARSAMENTE DIFFERENZIATO	22
CARCINOMA ANAPLASTICO (INDIFFERENZIATO)	23
CARCINOMA MIDOLLARE	25
TUMORI TIROIDEI NON EPITELIALI.....	26
Linfoma tiroideo	26
METASTASI	27
DIAGNOSTICA DEI NODULI TIROIDEI.....	28
ECOGRAFIA TIROIDEA	28

Dimensione e numero.....	30
Struttura ed ecogenicità.....	31
Margini e forma	32
Calcificazioni	34
Vascolarizzazione.....	35
Caratteristiche ecografiche nei differenti tipi di neoplasia tiroidea	35
Varianti istologiche del carcinoma papillare variante follicolare	36
Carcinoma follicolare e a cellule di Hurthle	36
Carcinoma midollare	37
ELASTOSONOGRAFIA.....	38
CLASSIFICAZIONE ULTRASONOGRAFICA DEI NODULI TIROIDEI	41
CITOLOGIA TIROIDEA E SISTEMI DI CLASSIFICAZIONE....	46
LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEL NODULO TIROIDEO.....	49
PARTE SPERIMENTALE.....	57
PREMESSA	58
SCOPO DELLO STUDIO.....	62
MATERIALI E METODI	63
POPOLAZIONE DELLO STUDIO.....	63

DISEGNO DELLO STUDIO	63
Ecografia tiroidea.....	65
Elastosonografia	66
Citoaspirazione con ago sottile per indagini biomolecolari.....	67
Analisi mutazionale	68
Estrazione del DNA	68
Discriminazione allelica.....	69
Esame istologico	71
Variabili registrate	71
ANALISI STATISTICA	73
RISULTATI	75
DISCUSSIONE.....	89
BIBLIOGRAFIA	94

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Score elastografici.....	39
Figura 2. Classificazione ATA 2015 dei noduli tiroidei e relativo rischio ecografico di malignità.	42
Figura 3. Classificazione AME/AACE 2016 dei noduli tiroidei e relativo rischio ecografico di malignità.....	43
Figura 4. Immagini ecografiche relative alle tre classi di rischio ecografico dei noduli tiroide secondo la classificazione AME/AACE 2016.	45
Figura 5. Sistema di classificazione Bethesda 2010 per la citologia tiroidea.	48
Figura 6. Confronto tra diametro ecografico e diametro istologico relativamente al numero totale di casi sottoposti a intervento chirurgico.	85
Figura 7. Confronto tra diametro ecografico e diametro istologico relativamente al numero totale di casi sottoposti a intervento chirurgico, distinto tra noduli benigni e maligni.	85
Figura 8. Correlazione tra diametro ecografico e diametro istologico nella totalità dei casi sottoposti a intervento chirurgico.	86

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione.....	75
Tabella 2.....	77
Tabella 3.....	80
Tabella 4.....	83
Tabella 5. Predittività del rischio ecografico di malignità stimato utilizzando le classificazioni ATA 2015 e AME/AACE 2016 (A) e la combinazione di diverse caratteristiche ecografiche (B).....	88

ABSTRACT

Background

I noduli tiroidei a citologia indeterminata rappresentano a tutt'oggi un'importante sfida diagnostica. Diverse strategie sono state messe in atto allo scopo di migliorare sensibilità ed accuratezza diagnostica con particolare attenzione nei confronti di tecniche ecografiche e marcatori biomolecolari. I dati qui riportati rappresentano una valutazione ad interim di un disegno sperimentale il cui obiettivo è quello di verificare la valutazione combinata dei risultati derivanti da: a) caratteristiche ecografiche e b) biologia molecolare su citoaspirazione nella diagnosi di tali noduli tiroidei.

Materiali e metodi

Sono stati arruolati consecutivamente 80 pazienti con nodulo/i tiroideo/i già sottoposti ad agoaspirazione con ago sottile con riscontro di diagnosi citologica di Classe 3, Classe 4 e Classe 5 secondo Bethesda. Ogni nodulo è stato rivalutato con ecografia, inclusa elastografia, e sottoposto nuovamente ad agoaspirato per studio biomolecolare su citoaspirato. Per ogni nodulo sono state stimate le classi ecografiche di rischio basate sulle classificazioni AME/AACE 2016 ed ATA 2015. Il rischio elastografico è stato suddiviso in 3 classi (score 1, 2, 3) come indicato dalla Letteratura. Al momento della raccolta dati, le indagini biomolecolari erano disponibili solo per analisi mutazionale di BRAFV600E. Analisi statistica: per valutare la relazione tra variabili

qualitative/quantitative ed una singola variabile dicotomica (es. benignità vs malignità) sono stati usati modelli di regressione logistica univariata. La relazione tra variabili qualitative/quantitative ed una singola variabile politomica è stata valutata mediante: chi quadrato o test esatto di Fisher-Freeman-Halton, ANOVA o test di Kruskal-Wallis come più appropriato. Per valutare la combinazione di due variabili nella stima del rischio di malignità, è stata considerata come combinazione negativa l'assenza di due fattori di rischio e come combinazione positiva la presenza di almeno un fattore di rischio. E' stata successivamente calcolata sensibilità, specificità, potere predittivo positivo (PPV) e potere predittivo negativo (NPV) con relativi intervalli di confidenza al 95%.

Risultati

In totale, 82 noduli sono stati esaminati: 21 (26%) appartenenti alla classe citologica 3, 53 (65%) alla classe citologica 4, e 8 (9%) alla classe citologica 5. Per 69 (84%) noduli era disponibile l'esame istologico; di questi casi il 38% aveva un'istologia maligna. Nessuna differenza tra le classi citologiche è stata riscontrata per: età, sesso, caratteristiche ecografiche inclusa elastografia. La mutazione BRAV600E è stata riscontrata in 1 nodulo della classe citologica 4 e in 2 noduli della classe citologica 5, ma in nessun nodulo della classe citologica 3. La prevalenza di malignità è risultata sovrapponibile ai dati della letteratura per le classi 4 e 5 mentre per la classe 3 essa è risultata maggiore.

Suddividendo i noduli secondo le classi di rischio ecografico, una maggiore sensibilità (73% vs 50%) ed una minore specificità (33% vs 58%) sono state riscontrate applicando la classificazione ATA 2015, rispetto a quella AME/AACE mentre sovrapponibili tra le due classificazioni apparivano PPV ed NPV.

Nessuna delle singole caratteristiche ecografiche era predittiva di malignità. Tuttavia, la combinazione tra l'assenza di disomogeneità all'ecografia ed un pattern elastografico a basso rischio (score 1 versus score 2+3) rappresentava una condizione caratterizzata da un NPV dell'80% con una sensibilità del 84,6%. Non è stato possibile valutare alcuna combinazione tra caratteristiche ecografiche e test mutazionale la cui prevalenza era troppo bassa.

Conclusioni

I dati di questo studio, pur rappresentando una valutazione preliminare, suggeriscono che nei noduli a citologia indeterminata gli aspetti ecografici non sembrano utili nel predire il rischio di malignità. All'opposto, la combinazione tra assenza di disomogeneità ecografica e pattern elastografico a basso rischio appare altamente correlata ad istologia benigna. Di scarso significato, in questa tipologia di noduli, sembra essere la valutazione mutazionale di BRAF.

PARTE INTRODUTTIVA

EPIDEMIOLOGIA

I noduli tiroidei rappresentano una rilevante problematica clinica. Studi epidemiologici hanno mostrato che la prevalenza di noduli tiroidei rilevabili all'ispezione oppure palpatoriamente è approssimativamente del 3-7%^{1,2}. Al contrario, l'ecografia tiroidea può evidenziare nodularità tiroidee nel 20-76% di individui selezionati in modo random^{3,4}, con una frequenza maggiore nelle donne e nei soggetti anziani^{5,6}, prevalenza simile a quella dei rilievi autoptici⁷. Inoltre, nel 20-48% dei pazienti con un solo nodulo palpabile, l'esame ecografico rileva la presenza di altre formazioni nodulari⁸. I noduli tiroidei sono più frequenti nei soggetti anziani, di sesso femminile, nei residenti in area a carenza iodica e negli esposti a radiazioni ionizzanti⁹. I noduli tiroidei possono essere rilevati occasionalmente durante indagini diagnostiche per immagine che coinvolgono il distretto tiroideo; in particolare, è dimostrato che tali formazioni vengono diagnosticate nel 67% dei casi ecograficamente¹⁰, nel 16% durante indagini TAC e/o RMN¹¹, nel 9,4% durante ecocolordoppler dei tronchi sovraortici¹², e nel 2-3% durante indagini PET¹³. Recentemente, è stato descritto¹⁴, come, in una popolazione di soggetti residenti in un'area a moderata carenza iodica (Provincia di Parma), oltre il 75% di noduli risultati poi maligni sia stato diagnosticato in maniera incidentale. Inoltre, ad eccezione dei casi in cui i noduli sono stati rilevati nel follow-up di preesistenti tireopatie,

la prima causa di riscontro è risultato essere rappresentata da indagini di imaging non primariamente rivolte allo studio della patologia tiroidea e fra esse, la maggior parte è costituita da ecografie di screening. Solamente in una minoranza di casi (22%) il rilevamento è stato sintomatico o visivo.

Tutto questo ha inevitabilmente condotto ad una “epidemia” di noduli tiroidei non palpabili, spesso di piccole dimensioni o comunque ai limiti della capacità di risoluzione ecografica¹⁵.

Dal punto di vista clinico, di primaria importanza risulta la necessità di escludere la presenza di cancro tiroideo, che può essere riscontrato nel 7-15% dei noduli tiroidei, a seconda di età, sesso, esposizione a radiazioni ionizzanti, familiarità o altri fattori^{16,17}. Il carcinoma tiroideo differenziato (differentiated thyroid cancer, DTC), che include il carcinoma papillare e il carcinoma follicolare, rappresenta la maggior parte di tutti i tumori tiroidei (>90%)¹⁸. Negli Stati Uniti nel 2014 sono stati diagnosticati circa 63.000 nuovi casi di neoplasia tiroidea¹⁹, rispetto ai 37.200 casi del 2009. L'incidenza annua in circa 35 anni è triplicata, passando da 4,9 casi/100.000 soggetti nel 1975 a 14,3 casi/100.000 nel 2009²⁰. Queste variazioni sono in gran parte attribuibili all'incremento di incidenza del carcinoma tiroideo papillare (papillary thyroid cancer, PTC). Inoltre, il 25% dei carcinomi tiroidei diagnosticati negli anni 1988-89 aveva dimensioni inferiori a 1 cm, rispetto al 39% dei nuovi casi diagnosticati nel biennio 2008-09²¹. Questi cambiamenti possono essere ricondotti ad una maggior

diffusione dell'impiego dell'ecografia del collo e quindi ad una diagnosi più precoce²², condizioni queste che stanno modificando l'approccio iniziale, il trattamento e il follow-up per molti pazienti con carcinoma tiroideo. Uno studio ha previsto che nel 2019 il carcinoma papillare diventerà il terzo tumore per frequenza nelle donne²³. E' pertanto di fondamentale importanza migliorare l'outcome a lungo termine dei soggetti con neoplasie tiroidee.

IL NODULO TIROIDEO

Storicamente, il nodulo tiroideo è stato sempre descritto come una formazione palpabile all'interno della ghiandola tiroidea. Attualmente, risulta molto più appropriato definirlo come una lesione che è distinguibile alla rilevazione ecografica oppure mediante l'impiego di altre tecniche di imaging²⁴. Pertanto, tutte le formazioni rilevate palpatoriamente meritano di essere approfondite ecograficamente²⁵.

Non tutte le anomalie rilevabili radiograficamente rientrano perfettamente nei criteri per la definizione e pertanto non possono essere considerate come tali. I noduli non palpabili riscontrati ecograficamente o mediante altre tecniche di imaging vengono definiti "incidentalomi". I noduli non palpabili, e confermati ecograficamente, hanno lo stesso rischio di malignità dei noduli palpabili, a parità di dimensioni²⁶. In linea generale, solamente i noduli di dimensioni superiori a 1-1,5 cm sono meritevoli di valutazione, in quanto possono potenzialmente essere più probabilmente maligni; tuttavia anche noduli di dimensioni inferiori a 1 cm possono richiedere attenzione, soprattutto in particolari tipi di pazienti e se presentano caratteristiche ecografiche di sospetto, se si associano a linfadenopatie, o ad altri fattori di rischio clinici.

In seguito al riscontro di nodulo tiroideo è raccomandata, in accordo con le linee guida di riferimento²⁷, un'accurata valutazione della

ghiandola tiroidea e delle stazioni linfonodali laterocervicali; un'attenta valutazione anamnestica al fine di valutare la presenza di fattori di rischio specifici, quali storia di irradiazione nella regione testa-collo in età giovanile, pregressa irradiazione total-body per trapianto di midollo osseo²⁸, esposizione a radiazioni ionizzanti in età infantile e adolescenziale²⁹, familiarità per carcinoma tiroideo (parenti di primo grado) o sindromi familiari associate a carcinoma tiroideo (es. sindrome di Cowden, poliposi adenomatosa familiare, complesso di Carney, neoplasia endocrina multipla [MEN], sindrome di Wermer); caratteristiche di sospetto quali rapida crescita del nodulo e/o comparsa di disfonia, e/o nodulo dotato di elevata captazione alla FDG-PET. Infatti, una recente metanalisi ha confermato che circa un terzo (35%) dei noduli tiroidei captanti alla FDG-PET risultano essere maligni, con un più alto SUVmax nei noduli maligni rispetto ai benigni (6,9 vs 4,8, $p < 0.001$)³⁰.

In tutti i soggetti con sospetto nodulo tiroideo, gozzo o riscontro occasionale di nodulo tiroideo deve essere eseguita una ecografia tiroidea, volta alla valutazione del parenchima tiroideo (volume e struttura); del nodulo (dimensioni, posizione e caratteristiche); e delle stazioni linfonodali del compartimento centrale e laterocervicale.

Se clinicamente indicato, l'agoaspirazione è la metodica di scelta per la valutazione dei noduli tiroidei e consente una diagnosi di certezza di benignità o malignità nella maggior parte dei casi (70-80%)^{31, 32}. Tuttavia, nel rimanente 20-30% dei noduli, la diagnosi citologica risulta

indeterminata, in quanto le caratteristiche citologiche del materiale agoaspirativo non sono tali da consentire una diagnosi definitiva di benignità o malignità³³.

CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE **ISTOPATOLOGICHE DEI TUMORI TIROIDEI**

Sono descritti diversi tipi di neoplasie tiroidee; qui di seguito vengono descritti i principali; una argomentazione più completa e dettagliata può essere trovata nei trattati di patologia endocrina di riferimento³⁴.

CARCINOMA TIROIDEO DIFFERENZIATO

Il DTC deriva dalle cellule epiteliali follicolari tiroidee e rappresenta la neoplasia più frequente tra tutti i tumori tiroidei (oltre il 90%). Tra le forme differenziate, l'85% dei casi è rappresentato da forme papillari, il 12% da forme follicolari, tra cui le forme classiche e ossifile (a cellule di Hurthle)³⁵. In linea generale, a parità di stadio, la prognosi del PTC e del carcinoma follicolare è simile^{36,37}.

Carcinoma papillare

Il carcinoma papillare tiroideo (papillary thyroid carcinoma, PTC) deriva dalle cellule epiteliali follicolari della tiroide e rappresenta il più frequente fra tutti i tumori tiroidei. Spesso il riscontro è occasionale in quanto la neoplasia è clinicamente silente e difficilmente individuabile alla palpazione. Può essere multifocale fino ad un terzo

dei casi e si associa a metastasi linfonodali fino al 50% dei casi; le metastasi a distanza sono invece rare (<5%).

Macroscopicamente può avere dimensioni variabili e può presentare un colorito dal bianco al grigio, con frequenti fenomeni degenerativi cistico-emorragici. Microscopicamente, sono evidenziabili strutture papillari con asse centrale fibrovascolare, talora possono essere associate a strutture follicolari con conseguente identificazione di forme miste. Alle caratteristiche architettrali sono associate tipiche modificazioni nucleari delle cellule neoplastiche quali nuclei chiari, pseudoinclusi ed incisure nucleari o grooves. Raramente si osservano mitosi; in circa il 50% delle lesioni possono essere presenti corpi psammomatosi: la loro presenza risulta uno dei parametri diagnostici fortemente suggestivo per diagnosi di carcinoma papillare. Sono descritte numerose varianti (es. variante classica o usuale, cistica, follicolare, solida, morulare-cribriforme, sclerosante diffusa, a cellule alte, a cellule colonnari), alcune delle quali sono note per essere caratterizzate da comportamento biologico più aggressivo, in particolare:

- Carcinoma papillare, variante diffusa sclerosante: si caratterizza per il totale coinvolgimento di uno o di entrambi i lobi con sclerosi massiva, numerosi corpi psammomatosi, focolai solidi, metaplasia squamosa e marcato infiltrato infiammatorio linfocitario. Frequenti le metastasi linfonodali e polmonari;

intervallo libero da malattia inferiore a quello del carcinoma papillare classico.

- Carcinoma papillare variante a cellule colonnari/alte: strutture papillari rivestite da cellule con abbondante citoplasma simil-oncocitario, di dimensioni doppie in altezza rispetto alle cellule neoplastiche del carcinoma papillare variante classica, senza le caratteristiche nucleari tipiche. Insorge in pazienti in età più avanzata ed ha comportamento biologico aggressivo.

In ogni caso, tra tutte le varianti quella che merita una menzione a parte è la variante follicolare del carcinoma papillare (Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma, FVPTC), per la quale vengono comunemente descritti tre tipi:

- Non capsulato o infiltrante. Il comportamento biologico-clinico e l'assetto di biologia molecolare sono simili al PTC.
- Capsulato. Il comportamento biologico-clinico e l'assetto di biologia molecolare sono sovrapponibili a quelli del carcinoma follicolare:
 - FVPTC capsulato non-invasivo, a basso rischio di recidiva e/o metastasi.
 - FVPTC capsulato con invasione capsulare e/o vascolare.

Recentemente, una lesione pre-cancerosa è stata descritta e classificata come neoplasia follicolare non invasiva con caratteristiche nucleari di tipo papillare (NIFTP)³⁸. Queste neoplasie mostrano alterazioni geniche

RAS-like e mostrano architettura follicolare e caratteristiche nucleari del carcinoma papillare e non sono invasive. Quando asportato in questo stadio pre-invasivo, il NIFTP ha un rischio di recidiva inferiore all'1% a 15 anni. Si ritiene che queste neoplasie siano i precursori delle forme invasive dei FVPTC incapsulati. A causa quindi della possibilità di progressione in forme carcinomatose invasive, il NIFTP deve essere asportato chirurgicamente e la emitiroidectomia sembra essere l'approccio terapeutico più indicato³⁹. E' importante sottolineare che il NIFTP non è un tumore maligno, ma non può essere neppure essere classificato tra le lesioni maligne, in quanto necessita di un trattamento chirurgico.

- Diffuso/aggressivo/multinodulare. Questo sottotipo è raro, compare più frequentemente nei soggetti giovani e ha una prognosi peggiore⁴⁰.

Carcinoma follicolare

Il carcinoma follicolare è definito come un qualsiasi tumore maligno della tiroide con differenziazione cellulare follicolare. Non avendo peculiari caratteristiche morfologiche, criteri certi di malignità sono: presenza di invasione capsulare, invasione vascolare ed infiltrazione del parenchima adiacente. Anche per il carcinoma follicolare è possibile individuare sottogruppi a diversa prognosi:

- Carcinoma follicolare minimamente invasivo: si presenta come una lesione capsulata con pattern di crescita di tipo adenomatoso embrionale o fetale. Determinante per la diagnosi risulta essere la presenza di focolai di infiltrazione capsulare con rottura della stessa o la presenza di invasione vascolare, entrambi rilevabili microscopicamente.
- Carcinoma follicolare invasivo: può presentarsi come una lesione estesamente invasiva senza conservazione della capsula, parenchima interamente ed estesamente infiltrato, o come una lesione a capsula conservata con vari gradi di aggressività, dalla sola capsula infiltrata fino ad arrivare ad una invasione vascolare di più vasi rilevabili microscopicamente.

Il carcinoma oncocitico o a cellule di Hurthle mostra un pattern di crescita di tipo follicolare ma è costituito da cellule con abbondante citoplasma granulare eosinofilo; questo particolare aspetto è dovuto all'accumulo di numerosi mitocondri. Il carcinoma a cellule di Hurthle è considerato secondo la classificazione WHO una variante istopatologica del carcinoma follicolare⁴¹.

CARCINOMA SCARSAMENTE DIFFERENZIATO

Il carcinoma tiroideo scarsamente differenziato è un tipo di tumore tiroideo aggressivo, caratterizzato da una perdita parziale delle caratteristiche tipiche dei carcinomi tiroidei differenziati e si colloca

pertanto dal punto di vista morfologico e di comportamento biologico in posizione intermedia tra il carcinoma papillare e follicolare e il carcinoma indifferenziato o anaplastico. In passato tale tipo di tumore era anche definito col termine di “carcinoma insulare”. I criteri diagnostici per il carcinoma scarsamente differenziato si basano sulla Consensus proposal di Torino e includono le seguenti tre caratteristiche:

- pattern microscopico di crescita di tipo solido/trasecolare/insulare
- perdita delle caratteristiche nucleari tipiche del carcinoma papillare
- una tra le seguenti: nuclei convoluti (evidenza di perdita parziale della differenziazione nei carcinomi papillari), necrosi tumorale, o presenza di 3 o più mitosi per 10 campi ad alto ingrandimento⁴².

CARCINOMA ANAPLASTICO (INDIFFERENZIATO)

Il carcinoma tiroideo anaplastico (Anaplastic Thyroid Cancer, ATC) è il più raro tra tutti i sottotipi di tumore tiroideo⁴³.

Sono stati stimati circa 70-90 nuovi casi annui di ATC in tutto il Regno Unito, corrispondenti al 3-4% tra tutti i carcinomi tiroidei⁴⁴. Una riduzione di incidenza è riportata in letteratura ed è stata attribuita ad una più accurata diagnosi istopatologica, ad un trattamento più aggressivo dei carcinomi tiroidei differenziati e ad un aumento dell'apporto di iodio^{45,46}. Il carcinoma anaplastico tipicamente insorge

in età più avanzata rispetto al DTC, con una età media di insorgenza superiore ai 65 anni; meno del 10% dei pazienti ha un'età inferiore ai 50 anni alla diagnosi. Come nelle forme differenziate, vi è una predilezione per il sesso femminile (60-70%). I fattori di rischio non sono ancora ben chiari anche se è noto che l'ATC si possa sviluppare nel contesto di un carcinoma ben differenziato, con un tasso di associazione compreso tra il 7 e l'89%^{47, 48, 49, 50, 51, 52, 53}. L'evento precipitante che scatena il pathway di de-differenziazione è sconosciuto, anche se sono state riportate numerose mutazioni che più frequentemente vengono riscontrate in questo tipo di neoplasia, tra cui mutazione di p53, RAS, BRAF, beta-catenina, PIK3CA, APC, PTEN^{54,55}.

Sfortunatamente il carcinoma anaplastico è caratterizzato da una prognosi infausta e nella maggior parte dei pazienti, indipendentemente dal tipo di approccio terapeutico, il tumore tende a crescere rapidamente e a invadere estesamente i tessuti circostanti. L'esito infausto caratterizza la maggior parte dei casi ed è legato a estesa diffusione locale (invasione tracheale nel 69% dei casi, invasione delle strutture vascolari del collo nel 39% dei casi)⁵⁶ e metastatizzazione a distanza (15-50% dei casi)⁵⁷. Le sedi più frequentemente interessate sono polmone e pleura (90%), osso (5-15%) e encefalo (5%)⁵⁸.

Dal punto di vista anatomopatologico, i più frequenti sottotipi istomorfologici sono a cellule fusate, a cellule giganti pleomorfe e a cellule squamoidi; ogni tipo di ATC può mostrare uno specifico pattern predominante oppure una coesistenza di due o più diversi tipi di patterns

cellulari^{59,60,61,62}. I sottotipi istologici non hanno differente significato prognostico. La diagnosi differenziale deve essere fatta nei confronti dei carcinomi scarsamente differenziati, dei carcinomi a cellule squamose, dei linfomi, dei sarcomi e delle lesioni metastatiche.

CARCINOMA MIDOLLARE

Il carcinoma midollare (Medullary Thyroid Carcinoma, MTC) deriva dalle cellule tiroidee parafollicolari (o cellule C) producenti calcitonina⁶³. Tale tipo di tumore è considerato raro e rappresenta circa il 3-4% dei tumori tiroidei dell'adulto e il 10% circa dei tumori tiroidei pediatrici⁶⁴. Il 25% dei MTC è di tipo familiare e compare nel contesto di sindromi a trasmissione autosomica dominante (neoplasia endocrina multipla o MEN di tipo 2A e 2B), nella restante parte dei casi è di tipo sporadico^{65,66,67,68}. La mutazione del protooncogene RET (REarranged during Transfection) nella linea germinale è responsabile dello stato costitutivamente attivato della proteina Ret in tutte le cellule nelle quali è responsabile delle alterazioni tipiche delle sindromi familiari. La mutazione somatica di RET è presente invece solamente delle cellule C e si riscontra nel 40-50% dei MTC sporadici^{69,70,71}.

La prognosi del carcinoma midollare è peggiore rispetto a quella del DTC. Frequenti sono le metastasi linfonodali⁷² (oltre il 75% dei pazienti con nodulo palpabile ha localizzazioni linfonodali)⁷³. Per quanto riguarda le metastasi a distanza, le sedi più comunemente interessate

sono osso, fegato e polmone⁷⁴; secondarismi cerebrali e cutanei sono meno frequenti e si associano a malattia multisistemica e prognosi infausta⁷⁵.

TUMORI TIROIDEI NON EPITELIALI

In questa categoria sono incluse neoplasie che originano dal tessuto non epiteliale della ghiandola tiroide. Tra queste sono da ricordare i sarcomi, tumori molto rari e solitamente ad alto grado di malignità, e i linfomi.

Linfoma tiroideo

Il linfoma rappresenta lo 0,5-5% delle neoplasie tiroidee e l'1-2,5% di tutti i linfomi. Insorge generalmente tra la V e VIII decade di vita con un picco di incidenza tra 60 e 69 anni e ha una predilezione per il sesso femminile. Frequentemente (fino al 60% dei casi) è associato a tiroidite cronica autoimmune. Il 98% è rappresentato da linfoma non Hodgkin e il 2% da linfoma di Hodgkin, più frequentemente di origine B-cellulare; può trattarsi di linfoma a basso o alto grado⁷⁶. Spesso si presenta come una massa a rapido accrescimento con sintomatologia compressiva, come disfagia, dispnea e disfonia; i sintomi generali caratteristici del linfoma (febbre, prurito, sudorazione notturna, calo ponderale) compaiono al massimo nel 15% dei pazienti⁷⁷.

METASTASI

La metastatizzazione alla ghiandola tiroidea è un evento nel complesso raro e principalmente di riscontro autoptico (2-3%). Derivano soprattutto da carcinoma renale, polmonare, mammario, gastroenterico⁷⁸, ma possono metastatizzare a livello tiroideo anche carcinoma del nasofaringe, corio carcinoma, osteosarcoma, leiomiosarcoma, melanoma, neoplasie neuroendocrine. Sono solitamente lesioni asintomatiche, più frequentemente riscontrate in quanto lesioni ipercaptanti alla FDG-PET durante il follow-up delle neoplasie primitive⁷⁹.

DIAGNOSTICA DEI NODULI TIROIDEI

ECOGRAFIA TIROIDEA

L'ecografia ad alta risoluzione è la metodica più sensibile per la diagnosi dei noduli tiroidei, in quanto consente di misurarne le dimensioni, identificarne la struttura e individuare le caratteristiche maggiormente suggestive di benignità o malignità⁸⁰.

Per lo studio di strutture superficiali come la tiroide, poiché il percorso che il fascio incidente deve percorrere è limitato in profondità, si impiegano sonde ecografiche lineari con un'elevata frequenza in trasmissione (da 7,5 a 13 MHz) che consentono un'ottimale risoluzione spaziale⁸¹ (inferiore ai 3 mm). La tiroide è situata nella regione sottoioidea e il suo punto di repere palpatorio è il margine inferiore della laringe. L'esame si effettua con sonde lineari a paziente supino e con collo iperesteso sopra un cuscino o sopra un supporto a cuneo di gommapiuma o materiale simile. L'ecografo usualmente è posto a destra del letto d'esame nello stesso lato dell'operatore, che con la mano destra può manovrare la sonda ed eseguire la scansione del collo del paziente, mentre con la mano sinistra può configurare le caratteristiche fisiche dell'ecografo necessarie all'indagine sia all'inizio che durante l'esecuzione dell'esame. La tiroide deve essere esplorata in tutta la sua interezza, con scansioni trasversali e longitudinali di entrambi i lobi tiroidei per definirne le dimensioni, l'ecogenicità e la presenza di

lesioni focali. Si studiano anche le regioni laterocervicali e sovraclaveari per escludere la presenza di linfadenopatie.

L'ecografia B-mode unitamente allo studio color-Doppler è una metodica a basso costo e priva di rischi per il paziente; essa rappresenta l'indagine di prima scelta per una corretta valutazione del numero, dei margini e delle dimensioni delle lesioni nodulari: di queste ultime, la tecnica ad ultrasuoni consente di apprezzarne la natura (solida, cistica oppure mista), l'eventuale presenza di calcificazioni e di discriminare strutture nodulari di dimensioni anche inferiori al millimetro. Integrando lo studio ecografico con la valutazione del flusso vascolare al Color-Doppler è possibile avere informazioni sulla vascolarizzazione della lesione nodulare.

E' riportato che l'ecografia B-mode unitamente allo studio color Doppler può essere in grado di predire il rischio di malignità di un nodulo tiroideo. Una recente meta-analisi che ha incluso 41 studi per un totale di 29.678 noduli tiroidei⁸² ha stimato il rischio di malignità (espresso come odds ratio, OR) per numerose caratteristiche ecografiche e ha concluso che un più alto rischio di malignità era associato alle seguenti: forma più alta che larga nella scansione trasversale ("taller than wide shape") (OR 10,15), assenza di orletto periferico (OR 7,14), microcalcificazioni (OR 6,76), margini irregolari (OR 6,12), ipoecogenicità (OR 5,07), struttura solida (OR 4,69) e vascolarizzazione intranodulare (OR 3,76). Un ulteriore studio ha valutato il rischio di malignità di 2.000 noduli tiroidei (63,4% benigni

e 36,6% maligni)⁸³: la distribuzione degli OR per la malignità era simile anche se non identica: marcata ipoecogenicità (OR 6,8), margini spiccati o microlobulati (OR 5,9), microcalcificazioni (OR, 3,3), struttura solida (OR 2,6), debole ipoecogenicità (OR 2,6), forma “taller than wide” (OR 2,3).

L'accuratezza diagnostica di queste caratteristiche nel predire il rischio di malignità è fortemente limitata dalla loro bassa sensibilità. Pertanto, nella maggior parte dei casi, la presenza di segni ecografici di sospetto non è chiaramente predittiva di malignità, e viceversa la loro assenza non può chiaramente predire la benignità del nodulo⁸⁴. Occorre tuttavia tener presente che la coesistenza di due o più caratteristiche ecografiche di sospetto accresce sensibilmente il rischio di tumore tiroideo^{85,86}.

Nel successivo paragrafo ognuna di queste caratteristiche viene presentata e discussa.

Dimensione e numero

Anche se, di per sé, la dimensione del nodulo non predice la sua natura benigna o maligna, occorre tenere in considerazione che il rischio di malignità è modestamente superiore per noduli di dimensioni maggiori di 4 cm⁸⁷. Inoltre, dimensioni >4 cm sono un fattore di rischio per malattia più avanzata nei soggetti con carcinoma tiroideo differenziato^{88,89}.

Il numero dei noduli tiroidei ha un basso impatto sul rischio di malignità^{90,91}. Questo parametro pertanto può essere omesso nel referto ecografico.

Struttura ed ecogenicità

Molti carcinomi tiroidei si presentano ecograficamente come noduli ipoecogeni, ma circa un terzo dei noduli benigni ha il medesimo aspetto ecografico. L'ipoecogenicità in un nodulo tiroideo solido è un predittore di malignità sensibile (80-85%) ma poco specifico (15-25%)^{92,93}. La marcata ipoecogenicità, definita come texture ecografica che appare più scura dei muscoli pretiroidei, conferisce un rilevante rischio di malignità, essendo descritto un valore predittivo positivo (PPV) che può arrivare fino al 94%^{94,95}. Purtroppo, la variabilità interoperatore rappresenta un limite non trascurabile nella valutazione della ecogenicità dei noduli tiroidei⁹⁶. Inoltre, la coesistenza di tiroidite nel parenchima extranodulare può rendere difficoltosa la corretta interpretazione dell'ecogenicità delle strutture nodulari⁹⁷.

In noduli con una predominante componente cistica raramente rappresentano un tumore tiroideo. In una serie di 392 noduli misti appartenente a un gruppo di 1056 casi consecutivi sottoposti ad agoaspirazione, nei noduli parzialmente cistici è stata dimostrata una prevalenza di 5,4% di malignità⁹⁸.

Un gruppo di noduli a struttura parzialmente cistica merita interesse in quanto essi sono quasi sempre benigni: si tratta dei cosiddetti noduli "spongiformi". Queste lesioni, dal tipico aspetto ecografico che ricorda una spugna, sono caratterizzate, per più del 50% del volume nodulare, dall'aggregazione di multiple componenti microcistiche e un tasso di benignità prossimo al 100%⁹⁸.

Margini e forma

La maggior parte dei noduli benigni hanno forma ovale o tondeggiante^{99,100}. Pertanto, qualsiasi aspetto ecografico che si discosta da essa merita attenzione. La forma e i margini di ogni nodulo devono essere valutati in maniera indipendente, in quanto un nodulo di forma ovale può presentare margini irregolari o mal definiti e un nodulo di forma non tondeggiante o polilobulata può presentare margini ben definiti. Occorre tenere in considerazione che per i noduli di grandi dimensioni (>4 cm) una accurata valutazione dei suddetti parametri può risultare difficoltosa.

La presenza di margini mal-definiti è considerata una caratteristica suggestiva di malignità, tuttavia, essendo tale termine spesso utilizzato per descrivere diversi pattern ecografici, la riproducibilità interosservatore è bassa¹⁰¹. I margini irregolari sono così definiti quando hanno un aspetto infiltrativo, spiculato o microlobulato, ma il confine tra nodulo e parenchima circostante è ben evidente. I margini sfumati, invece, appaiono mal definiti, ossia il confine tra nodulo e parenchima circostante è scarsamente delineabile. Il reperto di margini frastagliati e spiculati è fortemente predittivo di malignità, perché è espressione di accrescimento infiltrativo e non espansivo. Al contrario, margini indistinti e mal definiti possono essere presenti sia in lesioni maligne che benigne. Alcuni noduli benigni, infatti, sono incompletamente incapsulati e i loro margini possono confondersi con il tessuto tiroideo circostante¹⁰².

Per quanto riguarda l'orletto solitamente ipoecogeno che circonda il nodulo, esso è un rilievo tipico dei noduli benigni iperplastici che si presentano quindi con un profilo liscio. Nella maggior parte dei casi, tale orletto è legato alla presenza di vasi pericapsulari che decorrono alla periferia del nodulo, come viene dimostrato dall'integrazione color Doppler¹⁰³. Diversamente, un orletto ipoecogeno irregolarmente spesso o incompleto, legato alla presenza di strutture fibrotiche pseudocapsulari o a modificazioni necrotico-infiammatorie, si riscontra nel 10-12% dei carcinoma papillari e solitamente si associa ad un profilo irregolare dei margini¹⁰⁴. Quindi, un orletto ipoecogeno periferico sottile in noduli con forma regolare è suggestivo di benignità, mentre un orletto irregolarmente spesso e ipoecogeno in un nodulo con forma sospetta accresce la probabilità che si tratti di lesione maligna¹⁰⁵. Per quanto riguarda la forma, caratteristica di sospetto è il cosiddetto aspetto "taller than wide", ossia nodulo con forma più alta che larga nella scansione trasversale. Una forma "taller than wide" è fortemente predittiva di malignità, perché è espressione di una crescita centrifuga della lesione attraverso i piani tissutali. Le lesioni benigne, al contrario, tendono ad accrescersi orizzontalmente, lungo una direzione parallela ai piani ghiandolari. Questo aspetto è altamente specifico per malignità (circa il 90% nelle maggior parte delle casistiche), ma è molto meno sensibile, con un tasso di falsi negativi che può raggiungere il 40%¹⁰⁶.

Calcificazioni

Tre pattern principali possono essere descritti: microcalcificazioni, macrocalcificazioni o calcificazioni grossolane, e calcificazioni perinodulari o a guscio^{107,108,109}. Le microcalcificazioni si presentano come piccole (<1 mm) puntature iperecogene prive di cono d'ombra posteriore. Sono un reperto ecografico molto specifico di malignità, ma poco sensibile, che prevale nei carcinomi papillari (espressione della presenza di aggregati di corpi psammomatosi) e midollari (depositi di sali di calcio nella sostanza amiloide) rispetto ai follicolari¹¹⁰. Le microcalcificazioni, a differenza degli aggregati colloidei, non presentano la cosiddetta sfumatura iperecogena posteriore (“comet tail”). La specificità per quanto riguarda la malignità delle microcalcificazioni è elevata (85-95%), ma la sensibilità è bassa, soprattutto se si considerano i noduli piccoli (diametro <1 cm)¹¹¹.

Le macrocalcificazioni sono frequentemente causate da fenomeni regressivi o necrotici e si riscontrano spesso nei grandi noduli benigni tipici dei gozzi di vecchia data. Quando presenti in noduli solitari, esse possono essere considerate come un potenziale segno suggestivo di malignità¹¹².

Le calcificazioni capsulari cosiddette “a guscio d'uovo” sono calcificazioni sottili e regolarmente curvilinee che appaiono come un cerchio iperecogeno che tipicamente circonda il nodulo; sono tipiche dei noduli iperplastici di vecchia data. Carattere di sospetto di malignità è invece la presenza di calcificazione a guscio interrotta, in particolare

se è presente estrusione di piccola componente di tessuto nodulare, indicante probabile infiltrazione da parte della neoplasia^{113,114}.

Vascolarizzazione

La metodica color e power Doppler è in grado di fornire informazioni circa l'architettura vascolare del nodulo tiroideo. Tre tipi principali di pattern vascolare possono essere descritti: pattern perinodulare (la vascolarizzazione è presente principalmente lungo il margine del nodulo), pattern intranodulare (marcata vascolarizzazione nella porzione centrale del nodulo), assenza di segnale vascolare (assenza di segnale doppler alla periferia o al centro del nodulo). L'utilità della vascolarizzazione nella stima del rischio neoplastico di un nodulo tiroideo è limitata, e questo a causa del fatto che non esistono chiare differenze, in termini di pattern vascolare, tra lesioni benigne e maligne¹¹⁵. La maggior parte dei noduli maligni presentano vascolarizzazione intranodulare, ma tale aspetto è presente anche nei noduli benigni, in particolare se iperfunzionanti. Il 20% dei tumori tiroidei presenta vascolarizzazione prevalentemente perinodulare ma talvolta piccoli carcinomi papillari possono anche presentarsi non vascolarizzati¹¹⁶.

Caratteristiche ecografiche nei differenti tipi di neoplasia tiroidea

Le tradizionali caratteristiche suggestive di malignità per i noduli tiroidei sono derivate da casistiche in cui i carcinomi papillari erano le

neoplasie più rappresentate. Tali aspetti ecografici non sono tipici di neoplasie più rare, quali i carcinomi follicolari o a cellule di Hurthle o i carcinomi midollari.

Varianti istologiche del carcinoma papillare variante follicolare

Il carcinoma papillare variante follicolare può presentarsi con un aspetto ecografico non francamente sospetto, caratterizzato da forma ovale, margini regolari e ben definiti e assenza di microcalcificazioni. Spesso è più grande del carcinoma papillare variante classica^{117,118}.

Il carcinoma papillare variante a cellule alte nella maggior parte dei casi mostra il tipico aspetto suggestivo di malignità. Frequentemente questi tumori sono marcatamente ipoecogeni, con margini lobulati e irregolari, con microcalcificazioni. Invasione extratiroidea e metastasi linfonodali laterocervicali sono spesso presenti alla diagnosi¹¹⁹.

La variante sclerosante diffusa del carcinoma papillare rappresenta una sfida diagnostica all'indagine ecografica, in quanto la ghiandola può apparire ingrandita e diffusamente ipoecogena, così come avviene nelle tiroiditi croniche autoimmuni; la presenza di multiple microcalcificazioni può ricordare l'aspetto di "cielo stellato"^{120,121,122}.

Carcinoma follicolare e a cellule di Hurthle

Nei carcinomi follicolari frequentemente mancano gli aspetti tipici di malignità descritti per i carcinomi papillari¹²³. L'ipoecogenicità è osservata solamente in una minoranza di casi (30-35%), mentre un orletto ipoecogeno è descritto nell'87% dei carcinomi follicolari^{124,125}.

Le microcalcificazioni sono rare, mentre nel 15-20% dei casi si possono riscontrare macrocalcificazioni¹²⁶. La maggior parte dei carcinomi follicolari sono tumori solidi anche se le componenti cistiche sono più frequenti (fino al 18%) rispetto ai carcinomi papillari (4-6%). Queste caratteristiche sono condivise dalle lesioni follicolari benigne e maligne, ma la presenza di ipoecogenicità, orletto periferico irregolarmente spesso e grandi dimensioni sono suggestive di carcinoma follicolare^{127,128}.

Il carcinoma a cellule di Hurthle si può presentare con un aspetto ecografico alquanto eterogeneo¹²⁹. L'ecogenicità è spesso ridotta, tuttavia lesioni iso- o iperecogene non sono rare. La vascolarizzazione può variare da scarsa a intensa e diffusa. Come per i carcinomi follicolari, grandi dimensioni, margini irregolari, orletto spesso e irregolare, struttura solida disomogenea sono aspetti di frequente riscontro¹³⁰.

Carcinoma midollare

L'aspetto ecografico dei carcinomi midollari è molto variabile e spesso elusivo. Possono essere presenti ipoecogenicità, aspetto "taller than wide", forma ovale o tondeggiante, struttura talvolta cistica, microcalcificazioni e/o macrocalcificazioni¹³¹. In molti casi l'aspetto è comunque suggestivo di malignità, anche se una frazione non trascurabile di carcinomi midollari si presenta con caratteristiche indeterminate o talvolta anche suggestive di benignità¹³².

ELASTOSONOGRAFIA

Un nodulo che si presenta rigido o duro palpatariamente è clinicamente sospetto. Negli ultimi anni si è sviluppata una nuova tecnica ecografica denominata elastosonografia o più semplicemente elastografia. Essa permette di stimare l'elasticità del tessuto in esame, misurando il grado di distorsione sotto l'applicazione di una forza esterna. Si basa sul principio che sotto compressione le parti soffici del tessuto si deformano più facilmente delle parti dure, permettendo una determinazione oggettiva della consistenza del tessuto. La sonda viene appoggiata sul collo del paziente effettuando ripetute piccole compressioni sulla cute sovrastante il nodulo. Ne risulta una distorsione degli ultrasuoni che viene analizzata, elaborata e visualizzata sullo schermo dal software dell'ecografo secondo un elastogramma a colori sovrapposto all'immagine B-mode. Quando lo strumento riconosce che è stata impressa una compressione adeguata l'operatore potrà visualizzare sullo schermo un piccolo simbolo di riconoscimento. Nell'immagine elastografica il nodulo assume diverse colorazioni secondo una scala di colore che va dal rosso (alta elasticità, tessuto soffice) al blu (bassa elasticità, tessuto duro). Ai noduli così analizzati può pertanto venire assegnato, a seconda delle caratteristiche elastografiche, un punteggio (score) differente: Score 1= soffice (colore rosso/giallo/verde); Score 2=elasticità intermedia/mista (giallo-verde/azzurro); Score 3= duro (blu)¹³³ (Figura 1).

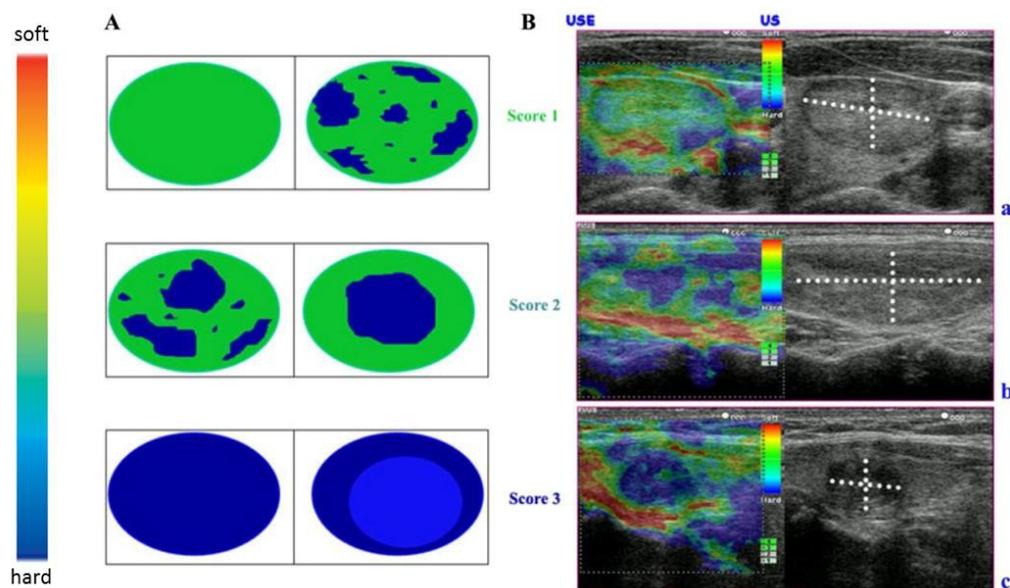


Figura 1. Score elastografici.

L'elastografia permette quindi di stimare la elasticità di noduli palpabili ma anche non palpabili. Il carcinoma tiroideo è solitamente ritenuto meno elastico del nodulo tiroideo benigno, pertanto, nella diagnostica per immagine del nodulo tiroideo, la metodica elastografica potrebbe risultare di particolare utilità in quanto consente di stimarne la durezza, misurando il grado di distorsione degli ultrasuoni nel loro impatto con il tessuto che si sta analizzando. Tale indagine sta emergendo come un promettente strumento per migliorare la caratterizzazione dei noduli tiroidei anche se la sua applicazione nella pratica clinica non è ancora routinaria.

Dati recenti evidenziano alta sensibilità nel carcinoma tiroideo, con un elevato valore predittivo negativo (fino al 97%)¹³⁴. In uno studio prospettico multicentrico¹³⁵, la presenza di rigidità in almeno il 50% del

nodulo è stato dimostrato avere una sensibilità nella stima del rischio di malignità simile all'ecografia convenzionale. In una meta-analisi¹³⁶ che ha coinvolto 12 studi per un totale di 1180 noduli (817 benigni e 363 maligni), l'elastografia (score elastografici 2 e 3) ha mostrato sensibilità pari al 86% e specificità pari al 66,7% nel predire il rischio di malignità.

La diagnostica elastografica presenta alcune limitazioni, in gran parte legate al fatto che essa è estremamente operatore-dipendente e non sono disponibili metodi standardizzati per la refertazione dei risultati. Inoltre, le lesioni cistiche e i noduli calcifici, a causa della loro struttura, non possono essere sottoposti a valutazione elastografica. In aggiunta, lesioni nodulari localizzate in aree difficilmente studiabili ecograficamente, micronoduli, noduli in tiroidite cronica, complessi nodulari risultano poco adatti per questo tipo di valutazione¹³⁷.

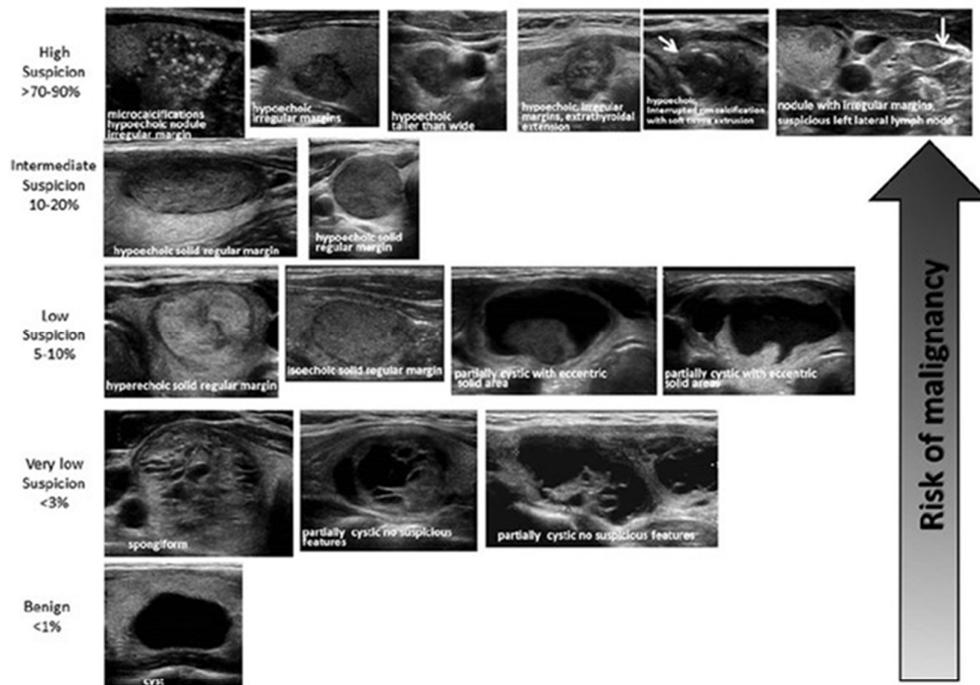
Tuttavia, il potenziale dell'elastografia potrebbe essere applicato nello studio dei noduli per i quali la diagnosi citologica non è stata conclusiva. Rago e collaboratori¹³⁸ hanno studiato 142 noduli a citologia indeterminata; in questa coorte l'elastografia ha mostrato una sensibilità del 96,8% e una specificità del 91,8% con un elevato valore predittivo negativo nel predire il rischio di malignità. Pertanto, i dati derivanti dall'indagine elastosonografica potrebbero essere considerati come un criterio diagnostico addizionale nel perfezionamento del management dei noduli tiroidei citologicamente indeterminati.

CLASSIFICAZIONE ULTRASONOGRAFICA DEI NODULI TIROIDEI

Le informazioni derivanti dalla valutazione ecografica dei noduli tiroidei devono essere tradotte in un sistema che consenta la stratificazione del rischio di malignità in modo tale da poter discriminare con accuratezza i noduli meritevoli di agoaspirazione dai noduli per i quali è sufficiente una sorveglianza ecografica nel tempo¹³⁹.

La sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica dei criteri ecografici di sospetti di malignità sono differenti nei diversi studi pubblicati in letteratura e risultano marcatamente operatore-dipendenti¹⁴⁰. La combinazione di due o più caratteristiche di sospetto ne aumenta la specificità ma, sfortunatamente, è associata a bassa sensibilità¹⁴¹. Queste problematiche hanno reso evidente la necessità di introdurre sistemi di classificazione ecografica dei noduli tiroidei che prevedessero una stratificazione del rischio di malignità.

Le linee guida di riferimento per la diagnostica e il management dei noduli tiroidei pubblicate negli ultimi due anni hanno in infatti previsto tale tipo di stratificazione. In particolare, secondo le linee guida dell'American Thyroid Association (ATA) pubblicate nel 2015¹⁴², i noduli tiroidei possono essere distinti, in base alle loro caratteristiche ecografiche, in cinque categorie a rischio di malignità progressivamente crescente (Figura 2).



<i>Sonographic pattern</i>	<i>US features</i>	<i>Estimated risk of malignancy, %</i>
High suspicion	Solid hypoechoic nodule or solid hypoechoic component of a partially cystic nodule <i>with</i> one or more of the following features: irregular margins (infiltrative, microlobulated), microcalcifications, taller than wide shape, rim calcifications with small extrusive soft tissue component, evidence of ETE	>70–90 ^a
Intermediate suspicion	Hypoechoic solid nodule with smooth margins <i>without</i> microcalcifications, ETE, or taller than wide shape	10–20
Low suspicion	Isoechoic or hyperechoic solid nodule, or partially cystic nodule with eccentric solid areas, <i>without</i> microcalcification, irregular margin or ETE, or taller than wide shape.	5–10
Very low suspicion	Spongiform or partially cystic nodules <i>without</i> any of the sonographic features described in low, intermediate, or high suspicion patterns	<3
Benign	Purely cystic nodules (no solid component)	<1

Figura 2. Classificazione ATA 2015 dei noduli tiroidei e relativo rischio ecografico di malignità.

Più recentemente sono state pubblicate le linee guida AME/AACE per la diagnosi e la gestione del nodulo tiroideo¹⁴³.

Classificazione AME-AACE del rischio ecografico nei noduli tiroidei		
Classe	Aspetti ecografici	Rischio atteso di malignità
1 (basso rischio)	Cisti semplici Noduli prevalentemente cistici ($\geq 80\%$) con presenza di comet-tails e senza caratteri di sospetto ecografico Noduli isoecogeni spongiformi, fra loro confluenti o con orletto regolare e sottile	circa 1%
2 (rischio intermedio)	Noduli debolmente ipoecogeni (vs tiroide circostante) o isoecogeni, con forma ovoide o rotondeggiante e margini regolari Possono essere presenti: vascolarizzazione intra-nodulare, macro-calcificazioni, calcificazioni a guscio, o pattern elastografico rigido	5-15%, in accordo con i vari caratteri presenti
3 (rischio alto)	<u>Noduli con almeno un carattere di sospetto:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ipoecogenicità marcata (vs muscoli pre-tiroidei) • Margini spiculati o micro-lobulati • Micro-calcificazioni • Forma più alta che larga • Crescita extra-tiroidea o adenopatia patologica 	50%-90%, in accordo con la presenza di uno o più caratteri di sospetto

Figura 3. Classificazione AME/AACE 2016 dei noduli tiroidei e relativo rischio ecografico di malignità.

Diversamente dalla classificazione ATA 2015, in quella AME/AACE 2016 sono previste solamente tre classi di rischio ecografico (Figure 3 e 4), così definite:

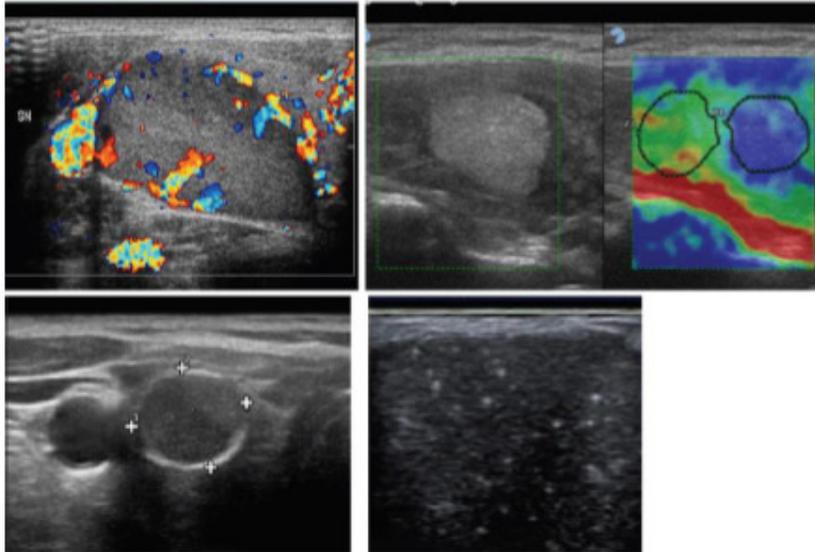
- Classe 1. Lesioni a basso rischio (rischio atteso di malignità circa 1%): cisti semplici; noduli in gran parte cistici (contenuto fluido $> 80\%$) con artefatti da riverberazione (“comet tail”) e senza segni ecografici di sospetto; o noduli spongiformi, confluenti o con alone regolare.
- Classe 2. Lesioni a rischio intermedio (rischio atteso di malignità circa 5-15%): noduli debolmente ipoecogeni (confrontati col tessuto tiroideo circostante) e noduli isoecogeni di forma

ovoidale o arrotondata e margini regolari o indefiniti; possono essere presenti: vascolarizzazione intra-nodulare, elevata rigidità all'elastografia, macrocalcificazioni o calcificazioni marginali, o spot iperecogeni di incerto significato (non definibili con certezza come microcalcificazioni), che modificano il rischio di malignità.

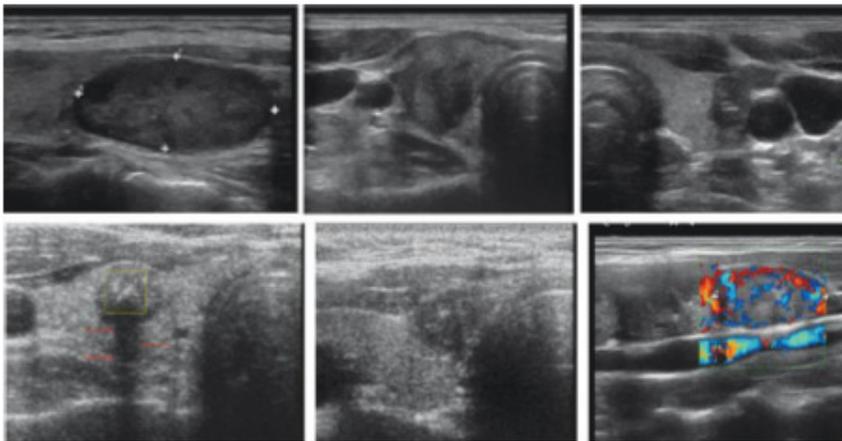
- Classe 3. Lesioni ad alto rischio (rischio atteso di malignità circa 50-90%, in rapporto al numero di caratteri di sospetto). Sono presenti uno o più dei seguenti segni: marcata ipoecogenicità (rispetto ai muscoli pre-tiroidei); margini spiculati o lobulati (in almeno tre punti); microcalcificazioni; forma "taller than wide"; crescita extra-tiroidea o adenopatia patologica.



A: lesioni a basso rischio



B: lesioni a rischio intermedio



C: lesioni ad alto rischio

Figura 4. Immagini ecografiche relative alle tre classi di rischio ecografico dei noduli tiroide secondo la classificazione AME/AACE 2016.

Indipendentemente dal sistema classificativo utilizzato, la stratificazione dei noduli in relazione al loro rischio ecografico

consente una rapida individuazione delle lesioni sospette per malignità e può guidare l'indicazione all'agoaspirazione.

CITOLOGIA TIROIDEA E SISTEMI DI CLASSIFICAZIONE

L'agoaspirazione eco-guidata o eco-assistita con lettura citologica è considerata la metodica gold standard per la diagnosi di benignità/malignità dei noduli tiroidei¹⁴⁴. Solitamente viene effettuata utilizzando aghi di piccolo calibro (da 23- a 27-gauge), con o senza aspirazione. Dati della letteratura suggeriscono che questa metodica è caratterizzata da sensibilità del 88-97%, specificità del 47-98%, PPV del 52-98% e valore predittivo negativo (NPV) del 89-96%, con un tasso di falsi negativi del 0,5-10% e di falsi positivi del 1-7%^{145,146}.

Numerosi sistemi di classificazione per citologia tiroidea, ciascuno costituito da varie sottoclassi, sono stati proposti da diverse istituzioni per standardizzare la comunicazione tra patologi e clinici e per fornire un migliore supporto alle decisioni cliniche. Attualmente, tre sono i principali sistemi di classificazione per la citologia tiroidea^{147, 148, 149}; essi, pur differendo per alcuni aspetti, possono essere considerati in gran parte sovrapponibili. La loro rilevanza clinica è legata soprattutto alla correlazione tra ogni categoria citologica e l'outcome istologico, e quindi alla possibilità di stimare il rischio neoplastico di ogni lesione studiata. Fra le tre classificazioni, il sistema Bethesda è quello più utilizzato a livello internazionale. Esso (Figura 5) fornisce, per ognuna

delle sei categorie diagnostiche in cui è suddiviso, una stima del rischio neoplastico che è basata su revisioni della letteratura e opinioni di esperti. Le categorie sono le seguenti: classe 1, reperto non diagnostico o materiale insufficiente; classe 2, reperto citologico benigno; classe 3, atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato (AUS/FLUS); classe 4, neoplasia follicolare/sospetto per neoplasia follicolare (FN/SFN) oppure neoplasia a cellule di Hurthle/sospetto per neoplasia a cellule di Hurthle; classe 5, sospetto per malignità (SUSP); classe 6, reperto citologico maligno. Per ognuna di queste classi citologiche il rischio stimato di malignità è il seguente: classe 1, 1-4%; classe 2, 0-3%; classe 3, 5-15%; classe 4, 15-30%, classe 5, 60-75%; classe 6, 97-99%.

The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Recommended Diagnostic Categories*

I. Nondiagnostic or Unsatisfactory

- Cyst fluid only
- Virtually acellular specimen
- Other (obscuring blood, clotting artifact, etc)

II. Benign

- Consistent with a benign follicular nodule (includes adenomatoid nodule, colloid nodule, etc)
- Consistent with lymphocytic (Hashimoto) thyroiditis in the proper clinical context
- Consistent with granulomatous (subacute) thyroiditis
- Other

III. Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance

IV. Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm

- Specify if Hürthle cell (oncocytic) type

V. Suspicious for Malignancy

- Suspicious for papillary carcinoma
- Suspicious for medullary carcinoma
- Suspicious for metastatic carcinoma
- Suspicious for lymphoma
- Other

VI. Malignant

- Papillary thyroid carcinoma
- Poorly differentiated carcinoma
- Medullary thyroid carcinoma
- Undifferentiated (anaplastic) carcinoma
- Squamous cell carcinoma
- Carcinoma with mixed features (specify)
- Metastatic carcinoma
- Non-Hodgkin lymphoma
- Other

* Adapted with permission from Ali and Cibas.³

Figura 5. Sistema di classificazione Bethesda 2010 per la citologia tiroidea.

Una recente metanalisi di Bongiovanni¹⁵⁰, ha calcolato il rischio di malignità nella reale pratica clinica per noduli con citologia Bethesda sottoposti a intervento chirurgico e ha osservato che vi era una buona corrispondenza con il rischio stimato dalla classificazione Bethesda, per ognuna delle sei categorie. In ogni caso, il rischio di malignità correlato ad ognuna delle sei categorie diagnostiche andrebbe definito per ogni centro che si occupa di citologia tiroidea in modo tale da poter correttamente guidare il clinico nelle scelte più appropriate per ogni tipo di nodulo, in particolare per quelli a citologia indeterminata (classi 3, 4 e 5).

LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEL NODULO TIROIDEO

Come già esposto in precedenza, la citologia agoaspirativa consente una diagnosi di certezza di benignità o malignità nel 70-80% dei casi. Nel rimanente 20-30% dei noduli la diagnosi citologica ricade in una delle tre categorie indeterminate (classe 3, 4 e 5 della classificazione Bethesda), in quanto le cellule analizzate mancano delle caratteristiche distintive e peculiari indispensabili per poter produrre una diagnosi definitiva¹⁵¹. L'incertezza legata alla differente e non perfettamente stimabile probabilità di cancro in questi noduli complica le decisioni terapeutiche e rende difficoltoso il management di questi pazienti. Alcuni vengono sottoposti alla ripetizione dell'agoaspirato, altri ad intervento chirurgico, spesso una lobectomia, che potrebbe tuttavia essere evitato per la maggior parte dei pazienti con noduli risultati istologicamente benigni. All'opposto, la lobectomia potrebbe non garantire la radicalità oncologica per alcuni pazienti, che devono quindi effettuare un intervento aggiuntivo per la totalizzazione. La rilevanza di questo problema è notevole; negli Stati Uniti, infatti, sono eseguiti circa 500.000 aghi aspirati all'anno, e di quasi 100.000 risultano a citologia indeterminata¹⁵². Pertanto, è necessaria una più accurata diagnosi dei noduli tiroidei, che sia essa di benignità oppure di malignità, in modo tale da poter ottimizzare il management medico e chirurgico per molti soggetti che hanno ricevuto una diagnosi citologica indeterminata.

Nelle ultime decadi la conoscenza dei meccanismi genetici delle neoplasie tiroidee si è espansa drammaticamente. Se nel 1990 era conosciuto circa il 25% delle alterazioni geniche del tumore tiroideo, ad oggi la genetica è in grado di spiegare oltre il 96% dell'eziopatogenesi molecolare di queste neoplasie¹⁵³. Le alterazioni geniche determinano nella maggior parte dei casi una disregolazione del pathway di segnalazione delle MAP-kinasi (MAPK) e delle fosfatidilinositol-3-kinasi(PI3K)/AKT; le MAPK sono frequentemente attivate attraverso mutazioni puntiformi dei geni BRAF e RAS e dai riarrangiamenti dei geni RET/PTC e TRK, mentre le PI3K/AKT sono frequentemente attivate attraverso mutazioni puntiformi di PI3CA e mutazioni o delezioni inattivanti di PTEN (regolatore negativo di questa cascata di segnalazioni). BRAF è una serina-treonina chinasi che è in grado di fosforilare e attivare MEK e tutta la cascata delle MAPK. Nel 98-99% la mutazione riscontrata consiste nella sostituzione della valina in posizione 600 con il glutammato (mutazione puntiforme BRAFV600E); essa si riscontra nel 45% dei PTC, in particolare la variante classica e la variante a cellule alte, ma anche nelle forme scarsamente differenziate che derivano dai carcinomi papillari¹⁵⁴. Più raramente (1-2% dei casi) si può riscontrare la mutazione BRAFK601E, la quale è frequentemente associata alla variante follicolare incapsulata del carcinoma papillare. I geni RAS (HRAS, KRAS e NRAS) codificano per proteine G che possono attivare sia la via delle MAPK sia quella di PI3K/AKT. Le mutazioni puntiformi di RAS tipicamente interessano i

codoni 12, 13 e 61, e si riscontrano nel 40-50% dei FTC, nel 10-20% dei PTC, in particolare la variante FVPTC, ma anche nel 20-40% degli adenomi follicolari. Il gene RET codifica per un recettore di membrana ad attività tirosino-chinasica che è espresso dalle cellule parafollicolari della tiroide (cellule C), ma non dalle cellule follicolari. Questo gene può essere attivato dalla fusione con numerosi geni; questo porta alla dimerizzazione del recettore e al suo stato costitutivamente attivato. In questo modo è in grado di stimolare la proliferazione cellulare in maniera incontrollata. I riarrangiamenti più comuni sono RET/PTC1 (formato dalla fusione di RET con il gene CCDC6) e RET/PTC3 (formato dalla fusione di RET con il gene NCOA4). Questi riarrangiamenti genici si riscontrano nel 10-20% dei carcinomi papillari, con maggior frequenza nei bambini o giovani adulti e in pazienti con pregressa esposizione a radiazioni ionizzanti. Le mutazioni di RET sono inoltre caratteristiche dei carcinomi midollari, sia sporadici sia familiari. Il riarrangiamento PAX8/PPAR γ deriva dalla fusione tra la regione legante il DNA del gene PAX8, fattore di trascrizione tiroideo, ed il gene PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), fattore di trascrizione che induce la differenziazione cellulare ed inibisce la proliferazione cellulare, determinando un arresto della funzione di PPAR γ . Questo riarrangiamento si riscontra nel 30-40% dei carcinomi follicolari, ma è stato descritto anche in alcuni FVPTC e in alcuni adenomi follicolari.

Recentemente, il progetto denominato The Cancer Genome Atlas (TCGA) ha consentito di analizzare 496 PTC, la più vasta coorte mai studiata prima, e ha fornito la caratterizzazione genetica di queste neoplasie, identificandone oltre il 97% delle alterazioni, comprese mutazioni puntiformi o fusioni geniche¹⁵⁵. Inoltre, è stato possibile comprendere gli effetti delle singole mutazioni, i differenti pathway di segnalazione attivati e il conseguente diverso aspetto istopatologico e comportamento biologico delle varie neoplasie studiate. Sono state infatti identificate due differenti popolazioni di PTC, definite “BRAFV600E-like” e “RAS-like”, ognuno con le proprie peculiari caratteristiche biologiche e cliniche¹⁵⁶. In particolare, i tumori “BRAFV600E-like”, esprimenti la mutazione puntiforme BRAFV600E e numerose altre alterazioni di analogo significato, erano caratterizzati da istologia di tipo papillare classico o a cellule alte e mostravano down-regolazione dell’espressione dei marker di differenziazione tiroidea, quali tireoglobulina, tireoperossidasi e simporto NA/I. In contrasto, i tumori “RAS-like”, esprimenti la mutazione di RAS e alte specifiche mutazioni o fusioni geniche, erano in gran parte rappresentati da forme incapsulate di FVPTC e mantenevano inalterata l’espressione dei geni di differenziazione tiroidea.

I progressi nell’applicazione dei marcatori molecolari alla diagnostica delle neoplasie tiroidee sono avvenuti parallelamente all’espansione delle conoscenze dei meccanismi genetici della carcinogenesi tiroidea e all’introduzione di tecniche di genotipizzazione. Nei primi anni ’90 è

stato dimostrato che il materiale prelevato mediante agoaspirazione dei noduli tiroidei è in grado di fornire un quantitativo di cellule sufficienti per poter effettuare indagini biomolecolari e poter individuare mutazioni puntiformi¹⁵⁷ o fusioni geniche¹⁵⁸. Tuttavia, solamente con l'identificazione della mutazione di BRAF nei primi anni 2000, l'analisi biomolecolare ha iniziato ad avere un'applicabilità clinica^{159, 160}. L'analisi mutazionale per BRAFV600E possiede un'altissima specificità e PPV per malignità¹⁶¹, ma possiede bassa sensibilità. La sensibilità diagnostica delle indagini di biologia molecolare è stata migliorata attraverso l'introduzione dei pannelli molecolari, disponibili per l'uso clinico a partire dagli ultimi anni 2000. Essi, oltre a BRAF, comprendevano l'analisi di altri geni frequentemente alterati nei carcinomi tiroidei, quali NRAS, HRAS e KRAS, e anche geni di fusione quali RET/PTC1, RET/PTC3 e PAX8/PPAR γ . Tipicamente, questo pannello a 7 geni era in grado di rilevare le alterazioni geniche presenti in circa il 70% di tutti i carcinomi tiroidei¹⁶². La performance di questo pannello molecolare, di particolare utilità nella diagnostica dei noduli tiroidei a citologia indeterminata, è stata valutata in numerosi studi, i quali hanno mostrato, per ognuna delle tre classi citologiche indeterminate, elevata specificità ed elevato PPV per la diagnosi di malignità in presenza di almeno una mutazione fra quelle ricercate^{163,164}. Pertanto, come concludevano questi Autori, il riscontro di mutazione (con la possibile esclusione di RAS, la cui alterazione si può riscontrare anche negli adenomi follicolari) poteva essere considerato

un'indicazione alla chirurgia, e in particolare alla tiroidectomia totale, in quanto il rischio di malignità aumentava rispetto a quello stimato in base alla sola citologia. Viceversa, l'assenza di mutazione riduceva il rischio di malignità per ognuna delle tre categorie indeterminate, in particolare dal 14 al 6% per la classe citologica 3 Bethesda (AUS/FLUS), dal 27 al 14% per la classe citologica 4 (FN/SFN), e dal 54 al 28% per la classe citologica 5 (SUSP), suggerendo la possibilità di un trattamento più conservativo (lobectomia). Tuttavia, i valori di sensibilità e NPV del pannello a 7 geni appaiono comunque non sufficientemente elevati per poter evitare la chirurgia nei pazienti con assenza di mutazioni¹⁶⁵. Pertanto, tale pannello, caratterizzato da elevata specificità ed elevato valore predittivo positivo, può essere considerato come un "rule-in test", in grado cioè di identificare quali noduli sono più probabilmente maligni¹⁶⁶.

La necessità di avere a disposizione un valido "rule-out test", caratterizzato da elevata sensibilità ed elevato NPV e quindi in grado di discriminare i noduli più probabilmente benigni, ha portato allo sviluppo dei cosiddetti "gene expression classifier", tra i quali il più conosciuto è commercializzato da Veracyte con il nome Afirma®. Questo test è in grado di valutare l'espressione genica di 142 geni attraverso l'analisi di 167 RNA messaggeri e fornisce un risultato di "benignità" o di "sospetto". La performance di questo test è stata inizialmente valutata da Alexander e collaboratori¹⁶⁷ in uno studio prospettico multicentrico in doppio cieco che ha coinvolto 129 noduli

di classe 3 Bethesda e 81 noduli di classe 4 Bethesda, dimostrando un elevato NPV, rispettivamente del 95% e 94% per queste categorie citologiche, ma un basso PPV (37-38%). In altre parole, due terzi circa dei pazienti con citologia 3 e 4 Bethesda e risultato “sospetto” a questo test avevano in realtà noduli benigni all’istologico.

Il passo successivo nell’evoluzione delle indagini di biologia molecolare è stato rappresentato dall’applicazione del cosiddetto “next generation sequencing” test (NGS). Esso consente di identificare numerose alterazioni geniche mediante l’utilizzo di un piccolo quantitativo di cellule ed è pertanto eseguibile anche sul materiale proveniente dalla citoaspirazione¹⁶⁸. ThyroSeq v2 è un avanzato e vasto pannello multi-gene specifico per le neoplasie tiroidee che è in grado di testare la presenza di mutazioni puntiformi e piccole delezioni o inserzioni in 14 geni, 42 tipi di geni di fusione e valutare l’espressione di 16 geni¹⁶⁹, alterazioni che si riscontrano in circa il 90% delle neoplasie tiroidee. In particolare, oltre alle mutazioni e riarrangiamenti già previsti dal pannello a 7 geni, esso può ricercare mutazioni di TP53, TERT, RET, BRAF, NTRK1 e NTRK3, ALK e altre alterazioni riscontrate nelle neoplasie follicolari e midollari, restituendo una valutazione della probabilità di cancro. La performance di questo test è stata valutata in studi effettuati da Nikiforov e collaboratori^{169,170} e condotti su 143 pazienti con noduli a citologia 4 Bethesda e su 96 pazienti con noduli a citologia 3 Bethesda sottoposti a intervento chirurgico. Questi studi hanno mostrato che un risultato negativo al test

era caratterizzato da un NPV del 96-97%, corrispondente a un rischio di malignità residuo del 3-4% per questi noduli, rischio comparabile a quello dello dei noduli definiti citologicamente benigni¹⁷¹, pur con un PPV ragionevolmente elevato (77-83%). Pertanto anche questa metodica potrebbe essere definita come un test che è contemporaneamente “rule-in” e “rule-out”.

Altre metodiche introdotte recentemente, ma ancora sperimentali, si basano sull'identificazione dei microRNA (miRNA), porzioni non codificanti di RNA in grado di regolare l'espressione genica. Fra questi, il ThyGenX/ThyraMIR combina un pannello a 7 geni (ThyGenX) con un pannello di 10 miRNA (ThyraMIR). La performance di questo test è stata indagata in uno studio¹⁷² multicentrico su 58 noduli di classe 3 Bethesda e 51 noduli di classe 4 Bethesda e ha mostrato un NPV del 94% e un PPV del 74%. Il Rosetta GX Reveal test è basato esclusivamente sulla individuazione di 24 miRNA; esso è stato validato in uno studio¹⁷³ retrospettivo multicentrico condotto su 150 noduli a citologia 3 e 4 Bethesda e ha mostrato un NPV del 91% e un PPV del 59%.

PARTE SPERIMENTALE

PREMESSA

Come già accennato in precedenza, negli ultimi 30 anni è stata riportata un aumento dell'incidenza del carcinoma tiroideo in tutto il mondo^{174,175,176,177,178,179}. Tale aumento è stato registrato anche in Europa, dove l'incidenza media, stimata mediante una survey nel 2004, appare essere compresa tra 5,0 e 12,9 casi/100.000 abitanti/anno rispettivamente negli uomini e nelle donne¹⁸⁰. In Italia, l'incidenza media è stata calcolata essere rispettivamente di 5,2 e di 15,5/100.000 abitanti/anno in maschi e femmine¹⁸¹. Questo andamento epidemiologico nell'ambito della patologia tumorale tiroidea è stato dimostrato in numerose aree geografiche inclusa la provincia di Parma¹⁸², dove l'incidenza media è passata dal 12,6/100.000 abitanti/anno nel periodo 1998-2003 al 21,3/100.000 abitanti/anno nel periodo 2004-2009, con un aumento proporzionale simile tra maschi e femmine.

Tipicamente, il carcinoma tiroideo insorge nei noduli tiroidei. Tuttavia, nella maggior parte dei casi i noduli sono benigni e il carcinoma tiroideo si riscontra solamente nel 5-15%^{183,184,185,186,187} dei noduli tiroidei, in relazione a diversi fattori di rischio, quali principalmente età, sesso, esposizione a radiazioni ionizzanti, familiarità. Pertanto, risulta di fondamentale importanza diagnosticare con accuratezza i noduli

neoplastici in modo tale da evitare interventi di chirurgia tiroidea per patologia benigna.

Attualmente, la metodica più comunemente utilizzata e affidabile per la diagnostica del nodulo tiroideo è l'analisi citologica su agoaspirazione con ago sottile (FNAC). Tale indagine consente infatti una diagnosi di benignità o malignità nella maggior parte dei casi. Tuttavia, nel 25% circa dei noduli tiroidei, la citologia agoaspirativa non è in grado di escludere la malignità e pertanto tali casi vengono classificati in una delle categorie di citologia cosiddetta indeterminata^{188, 189, 190, 191}. Nel sistema attualmente universalmente accettato di classificazione per la citologia tiroidea (Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology¹⁹²) la categoria indeterminata include tre specifiche diagnosi citologiche: atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato (*atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance, AUS/FLUS*), neoplasia follicolare o sospetto per neoplasia follicolare (*follicular neoplasm/suspicious for follicular, FN/SFN*) e sospetto di malignità (*suspicious for malignancy, SUSP*) rispettivamente denominate Classe 3, Classe 4 e Classe 5 con un rischio di malignità rispettivamente del 5-15, 15-30 e 60-75%. Non essendo in questi casi la sola citologia in grado di fornire una diagnosi definitiva, la maggior parte dei pazienti con citologia indeterminata viene sottoposta a intervento chirurgico per stabilire una diagnosi istopatologica. Solamente nel 10-40% dei casi però i noduli tiroidei con citologia

indeterminata asportati chirurgicamente risultano essere maligni^{193,194,195}. Tali interventi chirurgici potrebbero essere evitati se le procedure di citoaspirazione realmente consentissero un'accurata discriminazione preoperatoria tra patologia nodulare benigna e maligna.

Già da diversi anni, indagini biomolecolari atte ad individuare mutazioni e riarrangiamenti genici su citoaspirato hanno aumentato l'efficacia della diagnosi prechirurgica anche nell'ambito della patologia neoplastica tiroidea^{196,197,198,199}. In particolare, le alterazioni geniche comunemente ricercate, e che vengono riscontrate nel 70% circa delle neoplasie tiroidee, sono rappresentate da: mutazioni puntiformi quali BRAFV600E, NRAS codone 61, HRAS codone 61 e KRAS codone 12/13, e riarrangiamenti genici quali RET/PTC1, RET/PTC3 e PAX8/PPAR γ . E' stato dimostrato che nelle categorie citologiche tiroidee indeterminate le indagini molecolari su citoaspirato hanno un'accuratezza diagnostica che va dall'80% al 94%, pur con una sensibilità inferiore al 70%²⁰⁰.

L'ecografia B-mode è attualmente la tecnica di imaging più accurata e affidabile nella diagnostica dei noduli tiroidei; infatti, caratteristiche come la presenza di microcalcificazioni, margini irregolari, ipervascolarizzazione, aspetto "taller than wide", assenza di alone ipoecogeno periferico e ipoecogenicità rappresentano caratteri di sospetto per malignità²⁰¹. Sfortunatamente, tali aspetti sonografici non hanno sensibilità e specificità sufficienti per predire con accuratezza la malignità del nodulo²⁰². Recentemente, la diagnostica strumentale

tiroidea si è arricchita di una nuova metodica capace di oggettivare la durezza tissutale, denominata elastografia (UltraSound Elastography, USE). Tale indagine sta emergendo come un promettente strumento per migliorare la caratterizzazione dei noduli tiroidei anche se la sua applicazione nella pratica clinica non è ancora routinaria. Il carcinoma tiroideo è solitamente ritenuto meno elastico del nodulo tiroideo benigno. Pertanto, nella diagnostica per immagine del nodulo tiroideo risulta di particolare utilità l'impiego di una metodica quale l'elastografia, che consente di stimare la durezza del nodulo tiroideo, misurando il grado di distorsione degli ultrasuoni nel loro impatto con il tessuto che si sta analizzando; un software dedicato consente di misurare tale grado di distorsione, quantificandolo e rappresentandolo mediante una scala di colori.

E' dimostrato che noduli con elevata durezza all'elastografia presentano un maggior rischio di malignità²⁰³, tuttavia i risultati dell'elastografia da sola o in combinazione con la citologia classica nella diagnosi dei noduli tiroidei sono ancora discordanti²⁰⁴.

Ad oggi non esistono dati circa l'effetto dell'utilizzo combinato di elastografia e biologia molecolare su citoaspirazione nella diagnosi dei noduli tiroidei. Risulta pertanto interessante indagare gli effetti dell'applicazione combinata di elastografia ed indagini biomolecolari su citoaspirato sul miglioramento dell'accuratezza e della sensibilità diagnostica dei noduli tiroidei. Ciò potrebbe risultare particolarmente utile nella diagnostica prechirurgica dei noduli a citologia

indeterminata, nei quali la combinazione delle due metodiche diagnostiche potrebbe portare ad un miglioramento della stima di rischio di malignità e quindi, potenzialmente, ad una sensibile riduzione del numero di interventi chirurgici.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è pertanto quello di valutare le caratteristiche ecografiche, biomolecolari ed istologiche di noduli citologicamente indeterminati diagnosticati consecutivamente in un'area a moderata carenza iodica e verificare se l'utilizzo combinato di ecografia e analisi di biologia molecolare condotta su materiale ottenuto per citoaspirazione è in grado di migliorarne l'accuratezza diagnostica nella stima del rischio di malignità.

L'analisi molecolare prevista dal presente studio prevede la ricerca delle seguenti mutazioni: BRAFV600E, NRAS codone 61, HRAS codone 61 e KRAS codone 12/13, e dei seguenti riarrangiamenti genici: RET/PTC1, RET/PTC3 e PAX8/PPAR γ .

Qui di seguito vengono presentati i risultati di una analisi ad interim dello studio dopo la valutazione della sola mutazione di BRAFV600E.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE DELLO STUDIO

Sono stati raccolti ed analizzati, consecutivamente, i dati di 80 pazienti con nodulo/i tiroideo/i già sottoposto/i a routinaria agoaspirazione con ago sottile con riscontro di diagnosi citologica indeterminata in attesa di eseguire, come da normale pratica clinica, intervento di tiroidectomia, afferiti presso la Struttura Semplice di Endocrinologia Metabolica Geriatrica di UO Clinica Geriatrica, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, dal 1° ottobre 2014 al 30 aprile 2017.

DISEGNO DELLO STUDIO

Si tratta di uno studio sperimentale, monocentrico, prospettico che è stato condotto su pazienti con nodulo/i tiroideo/i già sottoposto/i ad agoaspirazione con ago sottile routinariamente diagnostica e con riscontro di diagnosi citologica indeterminata in attesa di eseguire, come da normale pratica clinica, intervento di tiroidectomia. Sono stati arruolati consecutivamente tutti i pazienti con nodulo/i indeterminato/i che hanno avuto accesso agli ambulatori del Centro Endocrino-Metabolico, Unità Semplice di Endocrinologia Geriatrica, Clinica Geriatrica, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma/Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Il protocollo dello studio è stato redatto in conformità alle Norme di Buona Pratica Clinica e nel rispetto dei principi etici stabiliti nelle dichiarazioni internazionali ed è stato approvato dal Comitato Etico per la Parma in data 16/07/2014. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i singoli partecipanti inclusi nello studio.

In accordo con la classificazione Bethesda¹¹, sono stati considerati tutti i noduli con diagnosi appartenente alle categorie cosiddette indeterminate. Esse sono:

- Classe 3: atipia di significato indeterminato/lesione follicolare di significato indeterminato (*atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance, AUS/FLUS*)
- Classe 4: neoplasia follicolare o sospetto per neoplasia follicolare (*follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm, FN/SFN*)
- Classe 5: sospetto di malignità (*suspicious for malignancy, SUSP*).

Ogni singolo nodulo, appartenente o meno allo stesso soggetto, è stato considerato e ad esso è stato associato un codice univoco corrispondente. Su ogni singolo nodulo sono state quindi eseguite le seguenti procedure: ecografia, elastosonografia, citoaspirato con ago sottile per indagine biomolecolare, analisi mutazionale.

Ecografia tiroidea

L'elastografia è stata eseguita mediante l'utilizzo di ecografo apposito (X-Vision MyLab 70 Esaote, Milano, Italy) con sonda lineare da 5-13 MHz. Il paziente viene disposto sul lettino in posizione supina e con collo iperesteso sopra un cuscino o sopra un supporto a cuneo di gommapiuma o materiale similare. L'ecografo è posto a destra del letto d'esame nello stesso lato dell'operatore, che con la mano destra manovra la sonda ed esegue la scansione del collo del paziente, mentre con la mano sinistra configura le caratteristiche fisiche dell'ecografo necessarie all'indagine sia all'inizio che durante l'esecuzione dell'esame. La tiroide deve essere esplorata in tutta la sua interezza, prima con scansioni preliminari trasversali e longitudinali. La sonda viene posizionata in maniera diversa a seconda dei piani di scansione: nel piano assiale o trasversale la sonda viene posta orizzontalmente sul collo e consente la misurazione dei diametri anteroposteriore e laterolaterale o trasverso; nel piano longitudinale o sagittale la sonda viene posizionata lungo il diametro maggiore della ghiandola, parallelamente alla trachea, con una leggera inclinazione mediale dall'alto e consente la misurazione del diametro longitudinale.

Per ogni nodulo a citologia indeterminata sono state valutate e registrate le seguenti variabili: dimensioni del nodulo, ecogenicità (ipoecogeno, isoecogeno, iperecogeno), struttura (solido, misto, spongiforme, cistico), disomogeneità, forma (in particolare se presentava una forma più alta che larga nella scansione trasversale ossia con diametro

anteroposteriore maggiore rispetto al diametro laterolaterale - cosiddetta forma “taller than wide”), aspetto dei margini (regolari o irregolari), presenza di microcalcificazioni, vascolarizzazione (intranodulare e/o perinodulare).

Tutte le indagini ecografiche sono state eseguite da un singolo operatore (G.C.).

Elastosonografia

L’elastografia è stata eseguita mediante l’utilizzo di ecografo apposito (X-Vision MyLab 70 Esaote, Milano, Italy) con sonda lineare da 5-13 MHz. Secondo le istruzioni sull’esecuzione di tale indagine, dopo aver appoggiato la sonda ecografica sul collo del paziente in posizione trasversale, vengono effettuate ripetute piccole compressioni sulla cute sovrastante il nodulo fino ad ottenere un grado di compressione che viene contrassegnato da apposito segnale dal software. Tale segnale contraddistingue un grado di compressione adatto per considerare la metodica valida permettendo, al tempo stesso, il confronto dei risultati tra diversi noduli. A tale compressione consegue una distorsione degli ultrasuoni che viene analizzata, elaborata e visualizzata sullo schermo dal software dell’ecografo secondo un elastogramma a colori sovrapposto all’immagine B-mode. Quando lo strumento riconosce che è stata impressa una compressione adeguata l’operatore può visualizzare sullo schermo un piccolo simbolo di riconoscimento. Nell’immagine

elastografica il nodulo assume diverse colorazioni secondo una scala di colore che va dal rosso (alta elasticità, tessuto soffice) al blu (bassa elasticità, tessuto duro). Ai noduli analizzati è stato assegnato, a seconda delle caratteristiche elastografiche, il seguente punteggio: score 1= soffice (colore rosso/giallo); score 2= elasticità intermedia/mista (giallo/azzurro); score 3= duro (blu).

Tutte le indagini ecografiche sono state eseguite da un singolo operatore (G. C.).

Citoaspirazione con ago sottile per indagini biomolecolari

La citoaspirazione tiroidea è stata effettuata mediante eco-assistenza con tecnica cosiddetta “per capillarità”^{205,206,207} (senza aspirazione) utilizzando aghi mandrinati con lunghezza pari a 90 mm e calibro pari a 27 Gauge (Artsana, Grandate, Italy). Una volta che la punta dell’ago, visualizzata mediante l’immagine B-mode, ha raggiunto il nodulo, il mandrino viene rimosso e si procede alla raccolta del materiale citologico. Il materiale citologico viene quindi raccolto all’interno di una provetta di 1,5 ml e stoccato a -80°C in attesa dell’esecuzione delle analisi molecolari. Viene inoltre eseguito il lavaggio dell’ago con 500 µL di soluzione fisiologica e tale materiale viene anch’esso raccolto all’interno di una provetta di 1,5 ml e stoccato a -80°C in attesa dell’esecuzione delle analisi molecolari.

Tutte le indagini di citoaspirazione sono state eseguite da un singolo operatore (M. M.).

Analisi mutazionale

Le analisi genetiche che vengono effettuate sul materiale prelevato mediante citoaspirazione consistono nell'individuazione di specifiche mutazioni e/o riarrangiamenti genici che sono noti per essere caratteristici dei carcinomi tiroidei differenziati. In particolare, nel presente studio è stata effettuata la ricerca della mutazione puntiforme BRAFV600E.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato isolato dal tessuto mediante mini-kit apposito, utilizzando il kit *QIAamp DNA Investigator Kit®* (*Qiagen, Milano, Italia*) con procedimento manuale o completamente automatizzato sul QIAcube (*Qiagen, Milano, Italia*). E' stata prelevata un'aliquota di 100 µL di agoaspirato tiroideo e trasferita in una provetta da 2 mL, cui sono stati aggiunti 10 µL di proteinasi K e 100 µL di buffer AL. Le provette sono state poste poi in un termoblocco a 56°C per 10/15 minuti. Al termine di questa prima fase, che consente una parziale digestione del campione, sono stati aggiunti 50 µL di etanolo assoluto. La soluzione ottenuta veniva lasciata qualche minuto a temperatura ambiente e poi trasferita all'interno di apposite colonnine fornite dal kit dotate di una membrana in grado di trattenere il DNA. Si effettuava dunque un primo

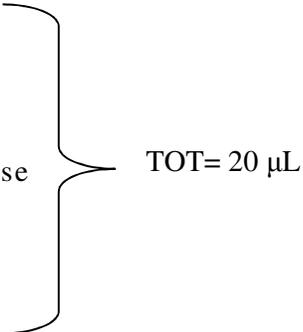
passaggio in centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto. Si eliminavano i tubi di raccolta contenenti il liquido di scarto e se ne disponevano di nuovi, cui venivano aggiunti 500 μ L di buffer AW1, effettuando un secondo passaggio in centrifuga, identico al precedente. Venivano nuovamente eliminati i tubi di raccolta e sostituiti. A questo punto venivano aggiunti 700 μ L di buffer AW2 ed eseguiti due passaggi in centrifuga; questo consente di asciugare la membrana ed eliminare qualsiasi residuo di buffer precedente. L'ultimo passaggio prevedeva l'aggiunta di 50 μ L di buffer AE, che grazie alla sua composizione consente di eluire il DNA finora trattenuto dalla membrana. Sono stati ottenuti dunque 50 μ L di DNA all'interno di provette da 1,5 mL.

Discriminazione allelica

La discriminazione allelica è una metodica basata su tecnologia real time che permette una rapida e precisa genotipizzazione del campione da analizzare. In un sistema biallelico, come nel nostro caso, sono previste nella stessa reazione due sonde (TaqMan MGB), una per allele, ciascuna marcata con un diverso fluoroforo emettitore in 5' (FAM per l'allele mutato e VIC per l'allele wildtype) ed uno smorzatore di fluorescenza in 3' (quencher). Una sonda complementare alla sequenza target viene tagliata dall'attività 5' esonucleasica della Taq DNA Polimerasi durante la PCR, liberando il fluoroforo emettitore, che non essendo più smorzato dal quencher, emette fluorescenza. La sonda non complementare alla sequenza target, invece, rimane intatta durante la reazione, per cui non ci sarà emissione di fluorescenza.

Le sequenze target riconosciute dalle specifiche sonde sono contenute nell'amplicone prodotto con primer specifici per BRAF, ottenuto amplificando il DNA somatico proveniente dai nostri campioni, similmente per quanto avviene per il sequenziamento. Durante la fase dell'annealing entrambe le sonde si ibridano, venendo poi degradate diversamente a seconda del genotipo del campione. L'aumento della fluorescenza alla lunghezza d'onda specifica di uno dei due fluorofori (analizzato mediante il software 7700 SDS) corrisponde ad uno stato di omozigosi per quell'allele, mentre l'aumento contemporaneo di entrambe corrisponde all'eterozigosi. Le condizioni di allestimento della PCR sono però ovviamente diverse da quelle predisposte per il sequenziamento.

MIX per la discriminazione:

- 5 µl TaqMan Genotyping Master Mix
 - 250 nM sonda-FAM
 - 250 nM sonda VIC 900 nM primer reverse
 - 900 nM primer forward
 - 15 ng DNA somatico
- 
- TOT= 20 µL

Le condizioni di temperatura della reazione sono: 10 min a 95°C per attivare la Amply Taq Gold Polymerase contenuta nella master mix, 50 cicli a 92°C per 15 sec, seguiti da 90 sec a 60°C per lo step di

annealing/estensione. Tutte le reazioni sono state eseguite sullo strumento 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Esame istologico

I pazienti con nodulo a citologia indeterminata sono stati sottoposti, secondo pratica clinica e secondo le linee guida di riferimento^{142,208}, a intervento chirurgico. L'esame istologico del tessuto tiroideo dopo esecuzione di tiroidectomia ha permesso di conoscere con certezza quali noduli a citologia indeterminata sono stati effettivamente caratterizzati da una diagnosi di malignità.

Variabili registrate

Per ogni paziente sono stati individuati e considerati i seguenti parametri:

- età
- genere (maschile [M] o femminile [F])
- funzionalità tiroidea (eutiroidismo, ipotiroidismo, ipertiroidismo)
- ormone tireostimolante (TSH)
- referto citologico (Classe 3, Classe 4, Classe 5 sec. Bethesda 2010)
- caratteristiche ecografiche del nodulo:

- dimensioni del nodulo (diametri ecografici)
- ecogenicità (ipoecogeno, isoecogeno, iperecogeno)
- struttura (solido, misto, spongiforme, cistico)
- disomogeneità (omogeneo o disomogeneo)
- forma (in particolare se presentava una forma più alta che larga nella scansione trasversale ossia con diametro anteroposteriore maggiore rispetto al diametro laterolaterale – cosiddetta forma “taller than wide”)
- aspetto dei margini (regolari o irregolari)
- presenza di microcalcificazioni
- vascolarizzazione (intranodulare, perinodulare, intranodulare e perinodulare, assente)
- caratteristiche elastosonografiche: Score 1= soffice (colore rosso/giallo); Score 2= elasticità intermedia/mista (giallo/azzurro); Score 3= duro (blu)
- analisi mutazionale (presenza o assenza di mutazione BRAFV600E)
- referto istologico (benignità o malignità del nodulo)
- istotipo (carcinoma papillare, PTC; variante follicolare del carcinoma papillare, FVPTC; PTC altre varianti, carcinoma follicolare, FTC; adenoma follicolare, iperplasia adenomatosa)
- diametro istologico della lesione
- presenza di tiroidite linfocitaria all’istologico
- presenza di iperplasia adenomatosa all’istologico

ANALISI STATISTICA

Le variabili qualitative sono descritte attraverso frequenze assolute (frequenze relative), mentre le variabili quantitative come media \pm deviazione standard oppure come mediana (range interquartile) a seconda della distribuzione dei dati. Per valutare la relazione tra variabili qualitative/quantitative e una singola variabile dicotomica (es. benignità vs malignità) sono stati usati modelli di regressione logistica univariata. Per valutare la relazione tra variabili qualitative/quantitative e una singola variabile politomica (es. grado 3 vs grado 4 vs grado 5) sono stati usati: (a) chi quadrato o test esatto di Fisher-Freeman-Halton per variabili qualitative; (b) ANOVA ad una via per variabili quantitative normali e/o con modeste deviazioni dalla normalità; (c) test di Kruskal-Wallis per variabili quantitative con grosse deviazioni dalla normalità.

Per valutare l'accordo tra diametro ecografico e istologico, è stato costruito il grafico di Bland Altman²⁰⁹ ed un test di regressione semplice, calcolando i valori di intercetta e di pendenza con relativi errori standard ed il coefficiente di correlazione lineare (R e R²).

Per valutare la combinazione di due variabili, è stata considerata come combinazione negativa l'assenza di due fattori di rischio e come combinazione positiva la presenza di almeno un fattore di rischio. E' stata successivamente calcolata sensibilità, specificità, potere

predittivo positivo (PPV) e potere predittivo negativo (NPV) con relativi intervalli di confidenza al 95%. Tutti i calcoli statistici sono stati effettuati utilizzando diversi software: IBM SPSS Statistics versione 24.0 (IBM, Armonk, NY), Statsdirect v. 3.1.4 (Statsdirect LTD, Cheshire, UK) ed il software gratuito on-line Vassarstats (www.vassarstats.net). La soglia di significatività è sempre stata fissata a $p=0,05$.

RISULTATI

Le caratteristiche generali della popolazione sono mostrate in Tabella 1. Sono stati esaminati 80 soggetti, di cui 54 (66%) femmine, con un'età pari a $55,6 \pm 14,5$ (media \pm deviazione standard). Il 68% della popolazione era costituito da soggetti eutiroidei, il 17% da ipotiroidei ed il 3% da ipertiroidei.

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione (n= 80 soggetti)

Variabili		
Età (anni), M \pm DS		55,6 \pm 14,5
Sesso (F), n (%)		54 (66)
Funzione tiroidea, n (%)		
	eutiroidismo	55 (68)
	ipotiroidismo	14 (17)
	ipertiroidismo	3 (3)
	mancanti	10 (12)
Classe citologica, n (%)		
	3	21 (26)
	4	53 (65)
	5	8 (9)
	mancante	0 (0)
Soggetti non operati, n (%)		13 (16)
Noduli in soggetti operati, n (%)		
	istologia benigna	43 (62)
	istologia maligna	26 (38)
	mancanti	0 (0)
	tiroidite linfocitaria	26 (38)
	mancanti	15 (18)
	iperplasia adenomatosa	56 (81)
	mancanti	15 (18)

M = media; DS = deviazione standard.

In totale, 82 noduli sono stati esaminati: 21 (26%) appartenenti alla classe citologica 3, 53 (65%) alla classe citologica 4, e 8 (9%) alla classe citologica 5. Per 69 (84%) noduli era disponibile l'esame

istologico su intervento chirurgico; di questi casi il 38% aveva un'istologia maligna. Nel 38% dei casi, all'esame istologico è stata documentata la presenza di tiroidite linfocitaria e nell'81% di iperplasia adenomatosa.

Nella tabella 2A sono riportate le caratteristiche demografiche dei soggetti stratificate per classe citologica. Non vi era differenza significativa di età ($p=0,727$) né di sesso ($p=0,280$) tra i soggetti relativamente alle classi citologiche. I valori mediani di TSH non presentavano differenze significative nel confronto tra le tre classi citologiche ($p=0,863$).

Nella tabella 2B sono riportate le caratteristiche dei noduli stratificate per classe citologica. La mediana del diametro ecografico era pari a 19 mm (IQ: 13,5-28,5) per le classi citologiche 3 e 4, e 17,5 mm (IQ: 10,5-24,5) per la classe citologica 5 ($p=0,743$). Nessuna differenza statisticamente significativa tra le classi è stata riscontrata per le seguenti caratteristiche ecografiche dei noduli: ecogenicità ($p=0,880$), struttura ($p=0,480$), disomogeneità ($p=0,830$), irregolarità dei margini ($p=0,220$), microcalcificazioni ($p=0,690$). A causa della insufficiente numerosità campionaria, non è stato possibile calcolare la differenza tra i gruppi per le seguenti caratteristiche ecografiche: forma "taller than wide" e vascolarizzazione del nodulo. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra le tre classi citologiche riguardo le caratteristiche elastosonografiche dei noduli esaminati ($p=0,830$). La mutazione BRAV600E è stata riscontrata in 1

nodulo della classe citologica 4 e in 2 noduli della classe citologica 5, ma in nessun nodulo della classe citologica 3. In 8 (38%) casi della classe citologica 3, e in 5 (9%) casi della classe citologica 4 il paziente non è stato sottoposto a intervento chirurgico. Tutti i pazienti i cui noduli ricadevano nella classe 5 sono stati sottoposti a intervento chirurgico.

Tabella 2

2A. Caratteristiche demografiche del totale dei soggetti (n= 80) stratificate per classe citologica

	Classe 3 (n=21)	Classe 4 (n=53)	Classe 5 (n=8)	p*
Età (anni), M ± DS	55,8 ± 12,9	54,9 ± 14,7	59,4 ± 18,3	0,727
Sesso (F), n (%)	12 (57)	38 (72)	4 (50)	0,280
TSH (uU/mL), mediana (IQ)	1,6 (1,3-2,4)	1,7 (1,2-2,5)	1,6 (0,8-2,3)	0,863
	mancanti 1	6	0	

2B. Caratteristiche del totale dei noduli (n= 82) stratificate per classe citologica

	Classe 3 (n=21)	Classe 4 (n=53)	Classe 5 (n=8)	p*	
Diametro ecografico (mm), mediana (IQ)	mediana (IQ)	19 (13,5-28,5)	19 (13,5-28,5)	17,5 (10,5-24,5)	0,743
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Ecogenicità	ipoecogeno	13 (62)	32 (60)	4 (50)	0,880
	isoecogeno	8 (38)	21 (40)	4 (50)	
	iperecogeno	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Struttura	solido	17 (81)	46 (87)	6 (75)	0,480
	misto	4 (19)	7 (13)	2 (25)	
	spongiforme	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	cistico	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Disomogeneità		8 (38)	21 (40)	2 (25)	0,830
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Forma "taller than wide"		0 (0)	4 (7)	1 (12)	NC
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Margini irregolari		2 (9)	9 (17)	3 (37)	0,220
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Microcalcificazioni		4 (19)	6 (11)	1 (12)	0,690
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Vascularizzazione	intranodulare	9 (43)	32 (60)	4 (50)	NC
	perinodulare	5 (24)	16 (30)	3 (37)	
	intranodulare e perinodulare	7 (33)	5 (10)	0 (0)	
	assente	0 (0)	0 (0)	1 (13)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Elastosonografia	score 1	7 (33)	23 (43)	2 (28)	0,830
	score 2	10 (48)	19 (36)	3 (44)	
	score 3	4 (19)	11 (21)	2 (28)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	1 (12)	
Mutazione BRAFV600E	mancante	0 (0)	1 (2)	2 (25)	NC
Non eseguito intervento chirurgico		8 (38)	5 (9)	0 (0)	NC

M = media; DS = deviazione standard; IQ = range interquartile

* ANOVA, Kruskal-Wallis, chi-quadrato o test esatto di Fisher-Freeman-Halton

Nella tabella 3A sono riportate le caratteristiche demografiche dei soggetti sottoposti a intervento chirurgico stratificate per classe citologica. Non vi era differenza significativa di età ($p=0,481$) né di sesso ($p=0,160$) tra i soggetti relativamente alle classi citologiche. I valori mediani di TSH non presentavano differenze significative nel confronto tra le tre classi citologiche ($p=0,863$).

Nella tabella 3B sono riportate le caratteristiche dei noduli sottoposti a intervento chirurgico stratificate per classe citologica. La mediana del diametro ecografico era pari a 19 mm (IQ: 13,5-30) per la classe citologica 3, 19 mm (IQ: 13-28) per la classe citologica 4, e 17,5 mm (IQ: 10,5-24,5), senza differenze significative fra le tre classi ($p=0,760$). Nessuna differenza statisticamente significativa tra le classi è stata riscontrata per le seguenti caratteristiche ecografiche dei noduli: ecogenicità ($p=0,690$), struttura ($p=0,300$), disomogeneità ($p=0,590$), irregolarità dei margini ($p=0,250$), microcalcificazioni ($p=0,460$). A causa della insufficiente numerosità campionaria, non è stato possibile

calcolare la differenza tra i gruppi per le seguenti caratteristiche ecografiche: forma “taller than wide” e vascolarizzazione del nodulo. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra le tre classi citologiche riguardo le caratteristiche elastosonografiche dei noduli esaminati ($p=0,970$). La mutazione BRAV600E è stata riscontrata in 1 nodulo della classe citologica 4 e in 2 noduli della classe citologica 5, ma in nessun nodulo della classe citologica 3. Istologia maligna è stata documentata in 4 (31%) noduli della classe citologica 3, 16 (32%) noduli della classe citologica 4, e 6 (75%) noduli della classe citologica 5. Istologia benigna è stata riscontrata in 9 (69%) noduli della classe citologica 3, 32 (68%) noduli della classe citologica 4, e 2 (25%) noduli della classe citologica 5. Nel complesso, è stato documentato un trend verso una minor frequenza di benignità e maggior frequenza di malignità della classe 5 nei confronti delle altre due classi citologiche, pur senza raggiungere la significatività statistica ($p=0,106$). La mediana del diametro istologico era pari a 18 mm (IQ:13,5-31,5) per la classe citologica 3, 19 mm (IQ: 12-25) per la classe citologica 4, e 13,5 mm (IQ: 10-27) per la classe citologica 5, senza differenze significative fra le tre classi ($p=0,371$). L'istotipo più rappresentato in ognuna delle tre classi citologiche era l'FVPTC. L'FTC veniva riscontrato solo nella classe citologica 4 (4 casi, 8%), mentre il PTC veniva riscontrato solo nella classe 5 (1 caso, 13%). Nessuna differenza statisticamente significativa veniva documentata tra le tre

classi citologiche nel riscontro istologico di tiroidite linfocitaria (p=0,795) e di iperplasia adenomatosa (p=0,769).

Tabella 3.

3A. Caratteristiche demografiche dei soggetti sottoposti a intervento chirurgico (n= 67) stratificate per classe citologica

	Classe 3 (n=13)	Classe 4 (n=48)	Classe 5 (n=8)	p*
Età (anni), M ± DS	59,6 ± 10,4	55,2 ± 14,5	60,3 ± 18,3	0,481
Sesso (F), n (%)	6 (46)	34 (71)	4 (50)	0,160
TSH (uU/mL), mediana (IQ)	1,6 (1,3-2,4)	1,7 (1,2-2,5)	1,6 (0,8-2,3)	0,863
mancanti	1	1	0	

3B. Caratteristiche dei noduli sottoposti a intervento chirurgico (n= 69) stratificate per classe citologica

	Classe 3 (n=13)	Classe 4 (n=48)	Classe 5 (n=8)	p*
Diametro ecografico (mm), mediana (IQ)	19 (13,5-30)	19 (13-28)	17,5 (10,5-24,5)	0,760
Ecogenicità, n (%)				0,690
ipoecogeno	9 (69)	30 (62)	4 (50)	
isoecogeno	4 (31)	18 (38)	4 (50)	
iperecogeno	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Struttura, n (%)				0,300
solido	10 (77)	43 (90)	6 (75)	
misto	3 (23)	5 (10)	2 (25)	
spongiforme	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
cistico	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Disomogeneità, n (%)				0,590
	4 (31)	20 (42)	2 (25)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Forma "taller than wide", n (%)				NC
	0 (0)	4 (8)	1 (12)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Margini irregolari, n (%)				0,250
	1 (8)	7 (15)	3 (37)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Microcalcificazioni, n (%)				0,460
	3 (23)	5 (10)	1 (12)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Vascularizzazione, n (%)				NC
intranodulare	5 (38)	30 (63)	4 (50)	
perinodulare	3 (24)	14 (29)	3 (37)	
intranodulare e perinodulare	5 (38)	4 (8)	0 (0)	
assente	0 (0)	0 (0)	1 (13)	
mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Elastosonografia, n (%)	score 1	5 (38)	20 (42)	2 (28)	0,970
	score 2	5 (38)	18 (37)	3 (44)	
	score 3	3 (24)	10 (21)	2 (28)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	1 (12)	
Mutazione BRAFV600E, n (%)		0 (0)	1 (2)	2 (25)	NC
	mancante	0 (0)	1 (2)	0 (0)	
Istologia, n (%)	benignità	9 (69)	32 (68)	2 (25)	0,106
	malignità	4 (31)	16 (32)	6 (75)	
	mancante	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Diametro istologico (mm), mediana (IQ)		18 (13,5-31,5)	19 (12-25)	13,5 (10-27)	0,371
	mancante	2 (15)	0 (0)	0 (0)	
Istotipo, n (%)	PTC	0 (0)	0 (0)	1 (13)	NC
	FVPTC	4 (31)	12 (25)	5 (62)	
	PTC altre varianti	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	FTC	0 (0)	4 (8)	0 (0)	
	mancante	2 (15)	0 (0)	0 (0)	
Tiroidite linfocitaria all'istologia, n (%)		5 (42)	19 (40)	2 (25)	0,795
	mancante	1 (7)	1 (2)	0 (0)	
Iperplasia adenomatosa all'istologia, n (%)		10 (83)	40 (85)	6 (75)	0,769
	mancante	1 (7)	1 (2)	0 (0)	

M = media; DS = deviazione standard; IQ = range interquartile

* ANOVA, Kruskal-Wallis, chi-quadrato o test esatto di Fisher-Freeman-Halton

Nella tabella 4A sono riportate le caratteristiche dei soggetti sottoposti a intervento chirurgico stratificate per diagnosi di benignità/malignità. Non vi era differenza significativa di età ($p=0,991$), sesso ($p=0,828$) e valori mediani di TSH ($p=0,405$) tra i soggetti relativamente alla diagnosi di benignità o malignità.

Nella tabella 4B sono riportate le caratteristiche dei noduli sottoposti a intervento chirurgico stratificate per diagnosi di benignità/malignità. Non è stata documentata alcuna differenza significativa tra benignità e malignità riguardo alla distribuzione delle classi citologiche globalmente considerate ($p\text{-trend}=0,106$), pur con differenza significativa al confronto tra classe citologica 4 e classe citologica 5 ($p=0,040$), essendo la classe citologica 5 caratterizzata da maggior

frequenza di malignità e minor frequenza di benignità. La mediana del diametro ecografico era pari a 19 mm (IQ: 13-28) e 17,5 mm (IQ: 12-27) rispettivamente nei noduli benigni e maligni, senza differenze significative fra i due gruppi ($p=0,511$). Nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi istologici è stata riscontrata per le seguenti caratteristiche ecografiche dei noduli: ecogenicità ($p=0,917$), struttura ($p=0,589$), disomogeneità ($p=0,259$), irregolarità dei margini ($p=0,441$), microcalcificazioni ($p=0,244$), vascolarizzazione nodulare ($p=0,640$), forma “taller than wide” ($p=0,412$). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i due gruppi istologici riguardo le caratteristiche elastosonografiche dei noduli esaminati ($p=0,430$). La mutazione BRAV600E è stata riscontrata in 3 casi tutti appartenenti al gruppo dei noduli maligni. La mediana del diametro istologico era pari a mm 20 (IQ: 12-25) e mm 16,5 (IQ: 12-30) rispettivamente nei noduli benigni e maligni, senza differenze significative fra i due gruppi istologici ($p=0,537$). Nessuna differenza statisticamente significativa veniva documentata tra i due gruppi istologici riguardo il riscontro istologico di tiroidite linfocitaria ($p=0,327$) e di iperplasia adenomatosa ($p=0,248$).

Tabella 4.

4A. Caratteristiche demografiche dei soggetti sottoposti a intervento chirurgico (n= 67) stratificate per diagnosi di benignità/malignità.

	Benignità (n=43)	Malignità (n=26)	p*
Età (anni), M ± DS	55,8 ± 13,9	55,7 ± 15,0	0,991
Sesso (F), n (%)	27 (63)	17 (65)	0,828
TSH (uU/mL), mediana (IQ)	1,7 (1,1-2,4)	1,8 (1,2-2,5)	0,863
	mancante 2 (5)	0 (0)	

4B. Caratteristiche dei noduli sottoposti a intervento chirurgico (n= 69) stratificate per diagnosi di benignità/malignità.

	Benignità (n=43)	Malignità (n=26)	p*	
Classe citologica	3	9 (21)	4 (15)	p-trend=0,106
	4	32 (74)	16 (62)	3 vs 5 p=0,060
	5	2 (5)	6 (23)	4 vs 5 p=0,040
	mancante	0 (0)	0 (0)	3 vs 4 p=0,840
Diametro ecografico (mm), mediana (IQ)	19 (13-28)	17,5 (12-27)	0,511	
Ecogenicità, n (%)	ipoecogeno 16 (37)	16 (62)	10 (38)	0,917
	isoecogeno 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	iperecogeno 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Struttura, n (%)	solido 7 (16)	36 (84)	23 (89)	0,589
	misto 0 (0)	7 (16)	3 (11)	
	spongiforme 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	cistico 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Disomogeneità, n (%)	14 (33)	12 (46)	0,259	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Forma "taller than wide", n (%)	4 (9)	1 (4)	0,412	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Margini irregolari, n (%)	8 (19)	3 (12)	0,441	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Microcalcificazioni, n (%)	4 (9)	5 (19)	0,244	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Vascularizzazione, n (%)	intranodulare 13 (30)	23 (54)	16 (61)	0,640
	perinodulare 7 (16)	13 (30)	7 (27)	
	intranodulare e perinodulare 0 (0)	7 (16)	2 (8)	
	assente 0 (0)	0 (0)	1 (4)	
	mancante 0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Elastosonografia, n (%)	score 1 17 (39)	18 (42)	9 (36)	0,430
	score 2 8 (19)	17 (39)	9 (36)	
	score 3 0 (0)	8 (19)	7 (28)	
	mancante 0 (0)	0 (0)	1 (4)	

Mutazione BRAFV600E, n (%)	manca	0 (0) 1 (2)	3 (11) 0 (0)	NC
Diametro istologico (mm), mediana (IQ)	manca	20 (12-25) 3 (7)	16,5 (12-30) 0 (0)	0,537
Tiroidite linfocitaria all'istologia, n (%)	manca	14 (34) 2 (5)	12 (46) 0 (0)	0,327
Iperplasia adenomatosa all'istologia, n (%)	manca	36 (88) 2 (5)	20 (77) 0 (0)	0,248

M = media; DS = deviazione standard; IQ = range interquartile

* ANOVA, Kruskal-Wallis, chi-quadrato o test esatto di Fisher-Freeman-Halton

Nella Figura 6 è mostrato il confronto tra diametro ecografico e diametro istologico relativamente al numero totale di casi sottoposti a intervento chirurgico. I risultati hanno dimostrato che non vi è una sottostima o sovrastima sistematica di un tipo di diametro rispetto all'altro, pur identificando una variabilità superiore alle 2 deviazioni standard in 7 casi, e senza differenze tra noduli benigni e noduli benigni (Figura 7). Entrambi i tipi di misurazione erano comunque altamente correlati, come dimostrato nella Figura 8.

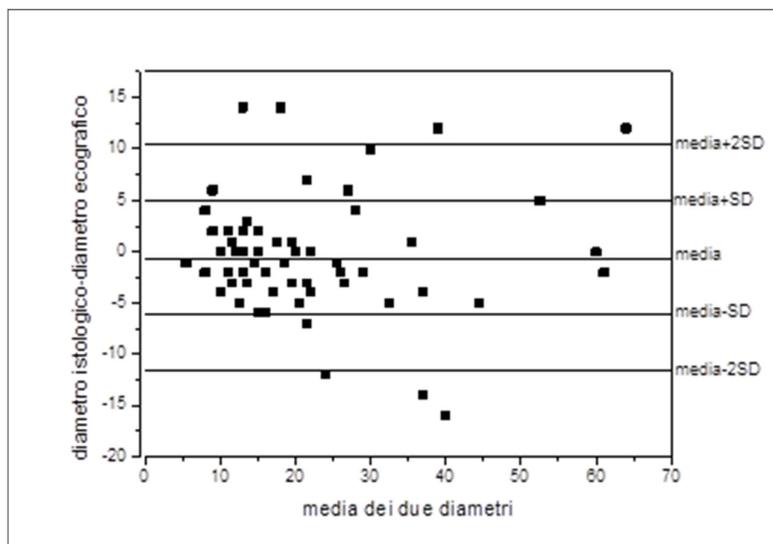


Figura 6. Confronto tra diametro ecografico e diametro istologico relativamente al numero totale di casi sottoposti a intervento chirurgico ($n = 69$).

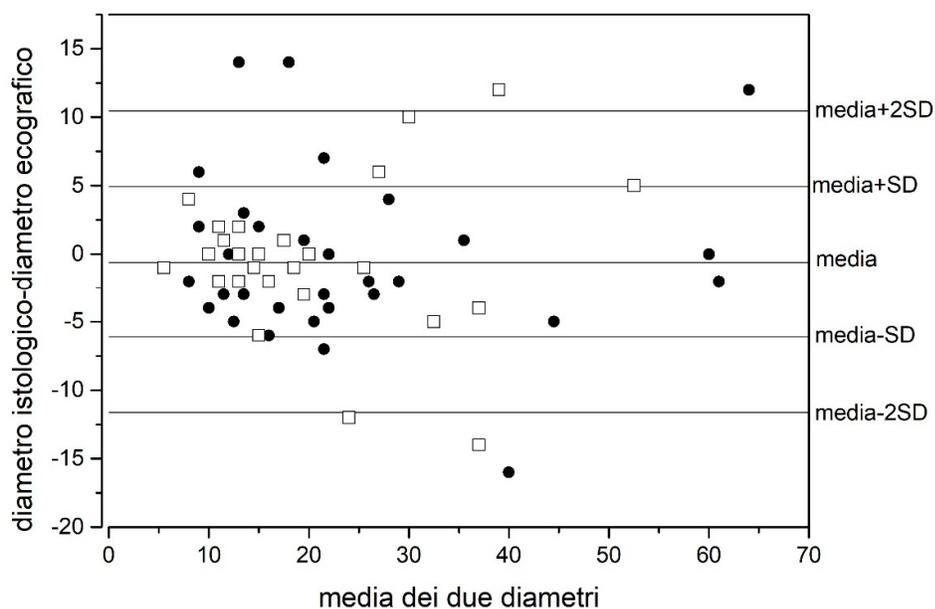


Figura 7. Confronto tra diametro ecografico e diametro istologico relativamente al numero totale di casi sottoposti a intervento chirurgico ($n = 69$), distinto tra noduli benigni (\square) e maligni (\bullet).

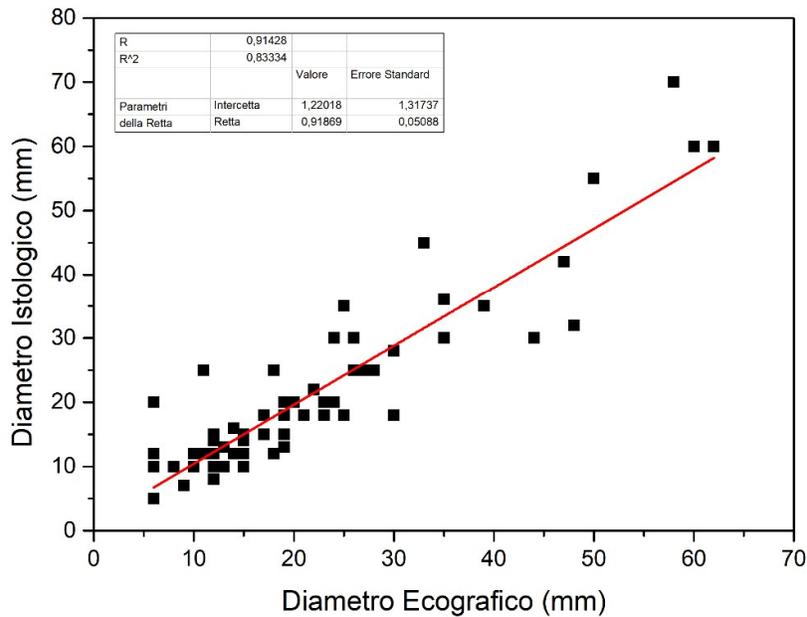


Figura 8. Correlazione tra diametro ecografico e diametro istologico nella totalità dei casi sottoposti a intervento chirurgico (n=69).

Suddividendo i noduli secondo le classi di rischio per malignità, sono state riscontrate una sensibilità del 50%, una specificità del 58,1%, un PPV del 41,9% e un NPV del 65,8% applicando la classificazione AME/AACE 2016, e una sensibilità del 73,1%, una specificità del 32,6%, un PPV del 39,6% e un NPV del 66,7% applicando la classificazione ATA 2015 (Tabella 5A).

Nessuna delle singole caratteristiche ecografiche era predittiva di malignità. Avendo tuttavia documentato che microcalcificazioni e disomogeneità rappresentavano caratteristiche meno lontane dalla significatività statistica nel confronto tra noduli benigni e noduli maligni e considerate l'elevata sensibilità e specificità riportate per

l'elastografia, abbiamo valutato le diverse combinazioni di queste due caratteristiche con l'elastografia nella stima del rischio di malignità. I risultati hanno dimostrato che l'assenza di disomogeneità associato ad un pattern elastografico a basso rischio (score 1 versus score 2+3) rappresentavano una condizione caratterizzata da un NPV dell'80% con una sensibilità del 84,6% (Tabella 5B).

Tabella 5. Predittività del rischio ecografico di malignità stimato utilizzando le classificazioni ATA 2015 e AME/AACE 2016 (A) e la combinazione di diverse caratteristiche ecografiche (B)

A		Noduli benigni	Noduli maligni	Sensibilità %	Specificità %	PPV %	NPV %
		n	n	(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)
Classificazione ATA							
	High suspicion	10	8	73,1	32,6	39,6	66,7
	Intermediate suspicion	19	11	(51,9-87,6)	(19,5-48,7)	(26,1-54,7)	(43,1-84,5)
	Low suspicion	14	7				
Classificazione AME/AACE							
	Alto rischio	25	13	50	58,1	41,9	65,8
	Rischio intermedio	18	13	(30,4-69,6)	(42,2-72,6)	(25,0-60,7)	(48,6-79,9)
B							
CONDIZIONE 1	Assente	29	13	50	67,4	48,1	69,0
	Presente	14	13	(30,4-69,6)	(51,3-80,4)	(29,2-67,6)	(52,8-81,9)
CONDIZIONE 2	Assente	33	18	30,8	76,7	44,4	64,7
	Presente	10	8	(15,1-51,9)	(61,0-87,7)	(22,4-68,6)	(50,0-77,2)
CONDIZIONE 3	Assente	9	10	61,5	20,9	32	47,4
	Presente	34	16	(40,7-79,19)	(10,6-36,5)	(19,9-46,8)	(25,2-70,5)
CONDIZIONE 4	Assente	17	8	69,2	39,5	40,9	68
	Presente	26	18	(48,1-84,9)	(25,4-55,5)	(26,7-56,7)	(46,4-84,3)
CONDIZIONE 5	Assente	16	4	84,6	37,2	44,9	80
	Presente	27	22	(64,3-95)	(23,4-53,2)	(30,9-59,7)	(55,7-93,4)
CONDIZIONE 6	Assente	16	8	69,2	37,2	40	66,7
	Presente	27	18	(48,1-84,99)	(23,4-53,2)	(26,1-55,6)	(44,7-83,6)

PPV = valore predittivo positivo; NPV = valore predittivo negativo; 95% CI= intervalli di confidenza al 95%; CONDIZIONI: 1, assenza microcalcificazioni + assenza disomogeneità; 2, assenza microcalcificazioni + margini regolari; 3, assenza disomogeneità + margini regolari; 4, elastografia score 1 + assenza microcalcificazioni; 5, elastografia score 1 + assenza disomogeneità; 6, elastografia score 1 + margini regolari.

DISCUSSIONE

I dati di questo studio preliminare mostrano come, nella coorte di noduli presi in considerazione, non vi siano differenze significative tra i tre gruppi citologici (classe 3, 4 e 5 della classificazione Bethesda) riguardo alle caratteristiche demografiche ed ecografiche. Non è stato possibile applicare la valutazione della differenza in BRAFV600E-positività per la scarsa numerosità campionaria e per l'assenza di mutazione nella classe citologica 3. La maggior parte dei noduli apparteneva alle classi citologiche 3 e 4; esse, e in particolare la classe 3, rappresentano per il clinico un importante impegno diagnostico-terapeutico, finalizzato alla individuazione dei noduli ad elevato rischio di malignità e pertanto meritevoli di soluzione chirurgica. L'individuazione di elementi distintivi che facilitino la definizione del rischio rappresenta quindi l'attuale sfida diagnostica per i noduli indeterminati ed i marker biomolecolari sembrano rivestire un ruolo molto importante in questo scenario. Il disegno del nostro studio, di cui questi dati costituiscono una valutazione ad interim, si inserisce nella problematica legata alla difficoltà diagnostica relativa alle suddette classi citologiche con l'intento di esplorare ulteriori potenzialità delle tecniche ecografiche e biomolecolari. Allo stato attuale dello studio, si è resa disponibile solamente l'analisi mutazionale di BRAF, risultata positiva in tre casi, tutti istologicamente maligni (n. 1 carcinoma papillare variante classica e n. 2 carcinoma papillare variante

follicolare). La mutazione di BRAF, e in particolare V600E, è stata ampiamente studiata e rappresenta l'alterazione più frequente nelle neoplasie tiroidee, potendo essere riscontrata nel 40-45% dei carcinomi papillari²¹⁰ e nelle neoplasie scarsamente differenziate che derivano dal carcinoma papillare^{211,212,213}. L'analisi per mutazione di BRAFV600E possiede un'altissima specificità e PPV per malignità: la presenza di questa mutazione è virtualmente diagnostica di carcinoma²¹⁴. Considerando che molte neoplasie tiroidee mostrano un differente pattern mutazionale, l'analisi del solo BRAF non garantisce un NPV sufficiente per evitare il ricorso alla chirurgia nei noduli che manchino di questa mutazione genica²¹⁵. In effetti, tale marker non appare di apprezzabile utilità per le neoplasie a pattern di crescita follicolare²¹⁶, che frequentemente sono riscontrabili in noduli classificati citologicamente come indeterminati. Il completamento del presente studio con l'applicazione dell'intero pannello biomolecolare come previsto dal disegno sperimentale (N-, H-, K-RAS, PAX8/PPAR γ , RET/PTC1 e RET/PTC3), potrà conferire, congiuntamente all'analisi delle altre caratteristiche ecografiche, ulteriori informazioni atte a meglio definire i criteri di rischio dei noduli citologicamente indeterminati con l'obiettivo di individualizzare il management di tali pazienti.

I nostri dati non mostrano differenze significative tra le tre classi citologiche riguardo alle caratteristiche ecografiche considerate. E' possibile che tale risultato possa dipendere almeno in parte dalla bassa

numerosità campionaria. Tuttavia, non si può escludere l'ipotesi che la popolazione di noduli a citologia indeterminata abbia caratteristiche ecografiche diverse da quelle riscontrate in noduli appartenenti a diverse categorie citologiche, quali la 2 e la 6, rispettivamente definite come reperto citologico benigno e reperto citologico maligno. In tale prospettiva è interessante sottolineare i dati riportati da alcuni autori²¹⁷ che dimostrano come i carcinomi follicolari frequentemente manchino degli aspetti ecografici suggestivi per malignità descritti per i carcinomi papillari, quali ad esempio ipoecogenicità²¹⁸ e microcalcificazioni²¹⁹.

I nostri risultati mostrano un'alta correlazione tra diametro ecografico e diametro istologico, con una differenza tra i due diametri che per la maggior parte delle misurazioni era contenuta entro una deviazione standard. Nella letteratura si fa spesso riferimento al diametro del nodulo, sia nella definizione del management chirurgico sia nelle procedure post-intervento. E' tuttavia altamente probabile che esistano differenze nelle stime delle dimensioni ecografiche dei diversi noduli, in relazione a possibili variabili quali ad esempio la vascolarizzazione del nodulo. Il diametro istologico rappresenta verosimilmente la misura più accurata delle dimensioni della neoplasia. Poco è noto circa la differenza reale tra i due tipi di misurazione. I dati del presente studio contribuiscono a colmare questa necessità di informazione e conferiscono un ulteriore valore alla stima ecografica del diametro nodulare correlandola in modo significativo alla misura istologica.

Nessuna delle caratteristiche ecografiche considerate nel presente studio ha permesso di ottenere una significativa stima del rischio di malignità. Neppure classificando ecograficamente i noduli secondo le classi di rischio ATA 2015 e AME/AACE 2016 è stata trovata una predittività statisticamente significativa. Non è quindi stato possibile, sulla base delle caratteristiche ecografiche, migliorare la stima del rischio di malignità rispetto a quanto ottenuto dalla sola citologia.

Come precedentemente osservato²²⁰, la combinazione di più pattern ecografici può migliorare la stima del rischio di malignità. Pertanto, nel presente studio sono state individuate condizioni ottenute dalla combinazione delle caratteristiche ecografiche che, considerate singolarmente, più si avvicinavano alla significatività statistica nel predire il rischio di malignità. Tra queste combinazioni, l'associazione tra assenza di disomogeneità e pattern elastografico a basso rischio (Score 1) è risultata essere quella caratterizzata da un alto NPV (80%) e elevata sensibilità (84,6%).

Questi dati sono supportati da evidenze di letteratura che dimostrano come la disomogeneità ecografica di un nodulo tiroideo sia caratteristica dei carcinomi follicolari della tiroide²²¹. In effetti, questo aspetto ecografico, nel nostro studio, era quello che più degli altri si avvicinava ad una significatività statistica nella differenza tra noduli benigni e maligni. E' interessante notare come la combinazione di disomogeneità strutturale ed elastografia, tecnica ecografica che ha mostrato alta sensibilità e specificità nel differenziare noduli maligni

da noduli benigni²²², abbia prodotto, nella nostra casistica, la miglior performance nella stima del rischio.

Questi risultati potrebbero rappresentare un utile strumento per individuare i noduli che hanno maggior probabilità di essere benigni, prospettandone una possibile applicazione come “rule-out test”. E’ tuttavia necessario che questi dati vengano confermati da studi a più ampia numerosità campionaria.

In conclusione, i dati di questo studio, pur rappresentando una valutazione preliminare, suggeriscono che nei noduli a citologia indeterminata gli aspetti ecografici non sembrano utili nel predire il rischio di malignità. All’opposto, la combinazione dell’assenza di disomogeneità strutturale e pattern elastografico a basso rischio appare altamente correlata ad istologia benigna. Di scarso significato, in questa tipologia di noduli, sembra essere la valutazione mutazionale di BRAF.

BIBLIOGRAFIA

¹ Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968;69:537-40.

² Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977;7:481-93.

³ Reiners C, Wegscheider K, Schicha H, Theissen P, Vaupel R, Wrbitzky R, Schumm-Draeger PM. Prevalence of thyroid disorders in the working population of Germany: ultrasonography screening in 96,278 unselected employees. *Thyroid*. 2004;14:926-32.

⁴ Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:699-706.

⁵ Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med* 1997;126:226-31.

⁶ Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest* 2009;39:699-706.

⁷ Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab.* 1955;15:1270-80.

⁸ Dean DS, Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:901-11.

⁹ Dean DS, Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:901-11.

¹⁰ Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994;154:1838-40.

¹¹ Youserm DM, Huang T, Loevner LA, Langlotz CP. Clinical and economic impact of incidental thyroid lesions found with CT and MR. *Am J Neuroradiol* 1997;18:1423-8.

¹² Steele SR, Martin MJ, Mullenix PS, Azarow KS, Andersen CA. The significance of incidental thyroid abnormalities identified during carotid duplex ultrasonography. *Arch Surg* 2005;140:981-5.

¹³ Cohen MS, Arslan N, Dehdashti F, Doherty GM, Lairmore TC, Brunt LM, Moley JF. Risk of malignancy in thyroid incidentalomas identified by fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Surgery* 2001;130:941-6.

-
- ¹⁴ Marina M, Ceda GP, Aldigeri R, Ceresini G. Causes of referral to the first endocrine visit of patients with thyroid carcinoma in a mildly iodine-deficient area. *Endocrine*. 2017 Aug;57(2):247-55.
- ¹⁵ Jin J, McHenry CR. Thyroid incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26:83-96.
- ¹⁶ Hegedus L . Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351:1764-71.
- ¹⁷ Mandel SJ. A 64-year-old woman with a thyroid nodule. *JAMA* 2004;292:2632-42.
- ¹⁸ Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-11.
- ¹⁹ Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
- ²⁰ Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140:317-22.
- ²¹ Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140:317-22.
- ²² Leenhardt L, Bernier MO, Boin-Pineau MH, Conte DB, Marechaud R, Niccoli-Sire P, Nocaudie M, Orgiazzi J, Schlumberger M, Wemeau JL, Cherie-Challine L, De Vathaire F. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol* 2004;150:133-9.

-
- ²³ Aschebrook-Kilfoy B, Schechter RB, Shih YC, Kaplan EL, Chiu BC, Angelos P, Grogan RH. The clinical and economic burden of a sustained increase in thyroid cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22:1252-9.
- ²⁴ Gharib H, Papini E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36:707-35.
- ²⁵ Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med.* 2004;351:1764-71.
- ²⁶ Hagag P, Strauss S, Weiss M. Role of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in evaluation of nonpalpable thyroid nodules. *Thyroid* 1998;8:989-95.
- ²⁷ Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2009; 19(11):1167-214.
- ²⁸ Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, Fraumeni JF, Jr., Boice JD, Jr. Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997;336:897-904.

²⁹ Pacini F, Vorontsova T, Demidchik EP, Molinaro E, Agate L, Romei C, Shavrova E, Cherstvoy ED, Ivashkevitch Y, Kuchinskaya E, Schlumberger M, Ronga G, Filesi M, Pinchera A. Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3563-69.

³⁰ Soelberg KK, Bonnema SJ, Brix TH, Hegedus L. Risk of malignancy in thyroid incidentalomas detected by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography: a systematic review. *Thyroid* 2012;22:918-25.

³¹ Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132:658-65.

³² Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta cytologica*. 2012;56:333-39.

³³ Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, Vielh P, DeMay RM, Sidawy MK, Frable WJ. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol*. 2008;36:425-37.

³⁴ Royal College of Pathologists. Dataset for thyroid cancer histopathology reports.

http://www.rcpath.org/NR/rdonlyres/19E175B5-9638-483A-088A18DB50BEC4A/0/G098_DRAFTThyroidDatasetNov13.pdf

³⁵ Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid* 2011;21:125-34.

³⁶ Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994;97:418-28.

³⁷ Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer* 1998;83:2638-48.

³⁸ Nikiforov YE, Seethala R1, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, Barletta JA, Wenig BM, Al Ghuzlan A, Kakudo K, Giordano TJ, Alves VA, Khanafshar E, Asa SL, El-Naggar AK, Gooding WE, Hodak SP, Lloyd RV, Maytal G, Mete O, Nikiforova MN, Nosé V, Papotti M, Poller DN, Sadow PM, Tischler AS, Tuttle RM, Wall KB, LiVolsi VA, Randolph GW, Ghossein RA. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA oncology*. 2016;2:1023-29.

³⁹ Hodak S, Tuttle RMM, Maytal G, Nikiforov YE, Randolph G. Changing the Cancer Diagnosis - the Case of Follicular Variant of

Papillary Thyroid Cancer Primum, Non Nocere and NIFTP. *Thyroid*. 2016.

⁴⁰ Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. Tumours of the thyroid gland. In: Atlas of tumour pathology, third series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1992.

⁴¹ DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 2004. IARC Press, Lyon.

⁴² Volante M, Landolfi S, Chiusa L, Palestini N, Motta M, Codegone A, Torchio B, Papotti MG. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid with trabecular, insular, and solid patterns: a clinicopathologic study of 183 patients. *Cancer* 2004;100:950-57.

⁴³ Perros P, Colley S, Boelaert K, Evans C, Evans RM, Gerrard GE, Gilbert JA, Harrison B, Johnson SJ, Giles TE, Moss L, Lewington V, Newbold KL, Taylor J, Thakker RV, Watkinson J, Williams GR. British Thyroid Association Guidelines for the Management of Thyroid Cancer. *Clinical Endocrinology* 2014;81(Suppl.1):1-122.

⁴⁴ OCIU (2012) UK data estimated from England anaplastic thyroid cancer data provided by Oxford Cancer Intelligence Unit.

⁴⁵ Passler C, Scheuba C, Prager G, Kaserer K, Flores JA, Vierhapper H, Niederle B. Anaplastic (undifferentiated) thyroid carcinoma (ATC). A

retrospective analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 1999;384:284-93.

⁴⁶ Dijkstra B, Prichard RS, Lee A, Kelly LM, Smyth PP, Crotty T, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins N. Changing patterns of thyroid carcinoma. *Irish Journal of Medical Science* 2007;176:87-90.

⁴⁷ Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G, Rosai J. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *American Journal of Clinical Pathology* 1985;83:135-58.

⁴⁸ Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* 1990;66:321-30.

⁴⁹ Nishiyama RH, Dunn EL, Thompson NW. Anaplastic spindle-cell and giant-cell tumors of the thyroid gland. *Cancer* 1972;30:113-27.

⁵⁰ Van der Laan B F, Freeman J L, Tsang RW. The association of well-differentiated thyroid carcinoma with insular or anaplastic thyroid carcinoma; evidence for dedifferentiation in tumor progression. *Endocrine Pathology* 1993;4:215-21.

⁵¹ Aldinger KA, Samaan NA, Ibanez M. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a review of 84 cases of spindle and giant cell carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1978;41:2267-75.

⁵² LiVolsi VA. (1990) *Surgical Pathology of the Thyroid*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

-
- ⁵³ Spires JR, Schwartz MR, Miller RH. Anaplastic thyroid carcinoma. Association with differentiated thyroid cancer. Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery 1998;114:40-4.
- ⁵⁴ Smallridge RC, Marlow LA, Copland J A. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. Endocrine-Related Cancer 2009;16:17-44.
- ⁵⁵ Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain) 2010;22:486-97.
- ⁵⁶ Zhang ZM, Xu ZG, Tang PZ. A retrospective analysis of anaplastic thyroid carcinoma. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2006;28:322-24.
- ⁵⁷ Thompson LD, Wieneke JA, Paal E. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. Cancer 2001;91:505-24.
- ⁵⁸ O’Neill JP, Shaha AR. Anaplastic thyroid carcinoma. Oral Oncology 2013;49:702-6.
- ⁵⁹ Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. American Journal of Clinical Pathology 1985;83:135-58.
- ⁶⁰ Rosai J, Carcangiu M L, DeLellis R A. Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. In: J. Rosai, M.L. Carcangiu, R.A. DeLellis eds. Tumors of

the Thyroid Gland, 3rd edn. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1992; 135-59.

⁶¹ Albores-Saavedra J, Henson D E, Glazer E. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype - papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocrine Pathology* 2007;18:1-7.

⁶² Seethala R R, Nikiforov Y E. Anaplastic (undifferentiated) carcinoma. In: Y.E. Nikiforov, P.W. Biddinger, L.D.R. Thompson eds. *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A Comprehensive Guide for Practicing Thyroid Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2009;228-48.

⁶³ Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley GF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, and Wells SA. Medullary Thyroid Cancer. *Management Guidelines of the American Thyroid Association Thyroid* 2009;Vol19,Num6:565-612.

⁶⁴ Hundhal SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menk HR. A National Cancer Data Base report on 53856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998; 83:2638-648.

⁶⁵ Pelizzo MR, Boschini IM, Bernante P, Toniato A, Piotto A, Pagetta C, Nibale O, Rampin L, Muzzio PC, Rubello D. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:493-7.

⁶⁶ Baloch ZW, LiVolsi VA. Prognostic factors in welldifferentiated follicular-derived carcinoma and medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2001;11:637-45.

⁶⁷ Paszko Z, Sromek M, Czetwertynska M, Skasko E, Czapczak D, Wisniewska A, Prokurat A, Chrupek M, Jagielska A, Kozlowicz-Gudzinska I. The occurrence and the type of germline mutations in the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and their unaffected kindreds from Central Poland. *Cancer Invest* 2007;25:742-9.

⁶⁸ Bergant D, Hocevar M, Besic N, Glavac D, Korosec B, Caserman S. Hereditary medullary thyroid cancer in Slovenia-genotype-phenotype correlations. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118:411-416.

⁶⁹ de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27:535-60.

⁷⁰ Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, Martino E, Romeo G, Pacini F. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1619-22.

⁷¹ 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;93:682-7.

⁷² Moley JF, DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg* 1999;229:880-7; discussion 887-8.

⁷³ Weber T, Schilling T, Frank-Raue K, Colombo-Benkmann M, Hinz U, Ziegler R, Klar E. Impact of modified radical neck dissection on biochemical cure in medullary thyroid carcinomas. *Surgery* 2001;130:1044-9.

⁷⁴ Mirallie E, Vuillez JP, Bardet S, Frampas E, Dupas B, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Murat A, Charbonnel B, Barbet J, Goldenberg DM, Chatal JF, Kraeber-Bodere F. *Ata Medullary Thyroid Cancer Guideline*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:779-88.

⁷⁵ Santarpia L, El-Naggar AK, Sherman SI, Hymes SR, Gagel RF, Shaw S, Sarlis NJ. Four patients with cutaneous metastases from medullary thyroid cancer. *Thyroid* 2008;18:901-5.

⁷⁶ Santos Kumar Mondal. Cytodiagnosis of primary thyroid lymphoma with histologic correlation: a case report. *Diagnostic Cytopathology* 2011;vol100mN00:1-3.

⁷⁷ Hwang YC, Kim WB. Clinical characteristics of primary thyroid lymphoma in Koreans. *Endocr J* 2009;56:399-405.

⁷⁸ Lee H, Chen F, Lo C. Metastatic of gastric carcinoma to thyroid and lung: a case report and review of literature. *J Zhejiang Un Sci* 2010;11:542-6.

⁷⁹ Pitt SC, Moley JF. Medullary, anaplastic and metastatic cancers of the thyroid. *Semin Oncol* 2010;37:567-79.

⁸⁰ Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, Paschke R, Valcavi R, Vitti P; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association Of Clinical Endocrinologists, American College Of Endocrinology, And Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines For Clinical Practice For The Diagnosis And Management Of Thyroid Nodules--2016 Update. *Endocr Pract.* 2016 May;22(5):622-39.

⁸¹ Hay JD, Reading CC, Carbonean JW. High resolution real-time ultrasonography and unsuspected micronodular thyroid disease. *Lancet* 1984; 916-20.

⁸² Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2014;170:R203-11.

⁸³ Kwak JY, Jung I, Baek JH. Image reporting and characterization system for ultrasound features of thyroid nodules: multicentric Korean retrospective study. *Korean J Radiol.* 2013;14:110-7.

-
- ⁸⁴ Papini E, Guglielmi R, Bianchini A. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1941-6.
- ⁸⁵ Moon WJ, Jung SL, Lee JH. Benign and malignant thyroid nodules: US differentiation multicenter retrospective study. *Radiology.* 2008;247:762-70.
- ⁸⁶ Kim EK, Park CS, Chung WY. New sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *AJR Am J Roentgenol.* 2002;178:687-91.
- ⁸⁷ Puñales MK, da Rocha AP, Meotti C, Gross JL, Maia AL. Clinical and oncological features of children and young adults with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Thyroid.* 2008;18:1261-68.
- ⁸⁸ Verburg FA, Mader U, Luster M, Reiners C. Primary tumour diameter as a risk factor for advanced disease features of differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71:291-97.
- ⁸⁹ McHenry CR, Huh ES, Machekano RN. Is nodule size an independent predictor of thyroid malignancy? *Surgery.* 2008;144:1062-9.
- ⁹⁰ Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2014;170:R203-11.

⁹¹ Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, Orcutt J, Moore FD Jr, Larsen PR, Marqusee E, Alexander EK. Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3411-17.

⁹² Mandel SJ. Diagnostic use of ultrasonography in patients with nodular thyroid disease. *Endocr Pract.* 2004;10:246-52.

⁹³ Horvath E, Majlis S, Rossi R. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1748-51.

⁹⁴ Frates MC, Benson CB, Charboneau JW. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in ultrasound consensus conference statement. *Radiology.* 2005;237:794-800.

⁹⁵ Kim EK, Park CS, Chung WY. New sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *AJR Am J Roentgenol.* 2002;178:687-91.

⁹⁶ Wienke JR, Chong WK, Fielding JR, Zou KH, Mittelstaedt CA. Sonographic features of benign thyroid nodules: interobserver reliability and overlap with malignancy. *J Ultrasound Med.* 2003;22:1027-31.

⁹⁷ Choi SH, Kim EK, Kwak JY, Kim MJ, Son EJ. Interobserver and intraobserver variations in ultrasound assessment of thyroid nodules. *Thyroid*. 2010;20:167-72.

⁹⁸ Lee MJ, Kim EK, Kwak JY, Kim MJ. Partially cystic thyroid nodules on ultrasound: probability of malignancy and sonographic differentiation. *Thyroid*. 2009;19:341-46.

⁹⁹ Mandel SJ. Diagnostic use of ultrasonography in patients with nodular thyroid disease. *Endocr Pract*. 2004;10:246-52.

¹⁰⁰ Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, Dominguez M. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1748-51.

¹⁰¹ Reading CC, Charboneau JW, Hay ID, Sebo TJ. Sonography of thyroid nodules: a “classic pattern” diagnostic approach. *Ultrasound Q*. 2005;21:157-65.

¹⁰² Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1941-46.

¹⁰³ Baskin HJ. Ultrasound of thyroid nodules. In: Baskin HJ, ed. *Thyroid Ultrasound and Ultrasound-Guided FNA Biopsy*. Boston, MA: Springer U.S.; 2000:71-86.

-
- ¹⁰⁴ Ahuja A, Ying M. Sonography of neck lymph nodes. Part II: abnormal lymph nodes. *Clin Radiol*. 2003;58:359-66.
- ¹⁰⁵ Chan BK, Desser TS, McDougall IR, Weigel RJ, Jeffrey RB Jr. Common and uncommon sonographic features of papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2003;22:1083-90.
- ¹⁰⁶ Moon WJ, Baek JH, Jung SL. Ultrasonography and the ultrasound-based management of thyroid nodules: consensus statement and recommendations. *Korean J Radiol*. 2011;12:1-14.
- ¹⁰⁷ Khoo ML, Asa SL, Witterick IJ, Freeman JL. Thyroid calcification and its association with thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2002;24:651-5.
- ¹⁰⁸ Taki S, Terahata S, Yamashita R. Thyroid calcifications: sonographic patterns and incidence of cancer. *Clin Imaging*. 2004;28:368-71.
- ¹⁰⁹ Chammas MC, de Araujo Filho VJ, Moysés RA. Predictive value for malignancy in the finding of microcalcifications on ultrasonography of thyroid nodules. *Head Neck*. 2008;30:1206-10.
- ¹¹⁰ Wang N, Xu Y, Ge C, Guo R, Guo K. Association of sonographically detected calcification with thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2006;28:1077-83.
- ¹¹¹ 83. Hong YJ, Son EJ, Kim EK, Kwak JY, Hong SW, Chang HS. Positive predictive values of sonographic features of solid thyroid nodule. *Clin Imaging*. 2010;34:127-33.

¹¹² Wu CW, Dionigi G, Lee KW, Hsiao PJ, Paul Shin MC, Tsai KB, Chiang FY. Calcifications in thyroid nodules identified on preoperative computed tomography: patterns and clinical significance. *Surgery*. 2012;151:464-70.

¹¹³ Kim BM, Kim MJ, Kim EK, Kwak JY, Hong SW, Son EJ, Kim KH. Sonographic differentiation of thyroid nodules with eggshell calcifications. *J Ultrasound Med*. 2008;27:1425-30.

¹¹⁴ Yoon DY, Lee JW, Chang SK, Choi CS, Yun EJ, Seo YL, Kim KH, Hwang HS. Peripheral calcification in thyroid nodules: ultrasonographic features and prediction of malignancy. *J Ultrasound Med*. 2007;26:1349-55.

¹¹⁵ Moon HJ, Kwak JY, Kim MJ, Son EJ, Kim EK. Can vascularity at power Doppler US help predict thyroid malignancy? *Radiology*. 2010;255:260-9.

¹¹⁶ Tamsel S, Demirpolat G, Erdogan M. Power Doppler US patterns of vascularity and spectral Doppler US parameters in predicting malignancy in thyroid nodules. *Clin Radiol*. 2007;62:245-51.

¹¹⁷ Yoon JH, Kim EK, Hong SW, Kwak JY, Kim MJ. Sonographic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2008;27:1431-37.

-
- ¹¹⁸ Kim DS, Kim JH, Na DG. Sonographic features of follicular variant papillary thyroid carcinomas in comparison with conventional papillary thyroid carcinomas. *J Ultrasound Med.* 2009;28:1685-92.
- ¹¹⁹ Choi YJ, Shin JH, Kim JH, Jung SL, Son EJ, Oh YL. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: sonographic and clinical findings. *J Ultrasound Med.* 2011;30: 853-58.
- ¹²⁰ Zhang Y, Xia D, Lin P, Gao L, Li G, Zhang W. Sonographic findings of the diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. *J Ultrasound Med.* 2010;29:1223-26.
- ¹²¹ Lee JY, Shin JH, Han BK. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: imaging and cytologic findings. *Thyroid.* 2007;17:567-73.
- ¹²² Kwak JY, Kim EK, Hong SW. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: ultrasound features with histopathological correlation. *Clin Radiol.* 2007;62:382-86.
- ¹²³ Jeh SK, Jung SL, Kim BS, Lee YS. Evaluating the degree of conformity of papillary carcinoma and follicular carcinoma to the reported ultrasonographic findings of malignant thyroid tumor. *Korean J Radiol.* 2007;8:192-7.
- ¹²⁴ Kobayashi K, Fukata S, Miyauchi A. Diagnosis of follicular carcinoma of the thyroid: role of sonography in preoperative diagnosis of follicular nodules. *J Med Ultrasonics.* 2005;32:153-58.

¹²⁵ Sillery JC, Reading CC, Charboneau JW, Henrichsen TL, Hay ID, Mandrekar JN. Thyroid follicular carcinoma: sonographic features of 50 cases. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;194:44-54.

¹²⁶ Gulcelik NE, Gulcelik MA, Kuru B. Risk of malignancy in patients with follicular neoplasm: predictive value of clinical and ultrasonographic features. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134:1312-15.

¹²⁷ Fukunari N, Nagahama M, Sugino K, Mimura T, Ito K. Clinical evaluation of color Doppler imaging for the differential diagnosis of thyroid follicular lesions. *World J Surg.* 2004;28:1261-65.

¹²⁸ Shin JH, Han BK, Ko EY, Oh YL, Kim JH. Differentiation of widely invasive and minimally invasive follicular thyroid carcinoma with sonography. *Eur J Radiol.* 2010;74:453-57.

¹²⁹ Maizlin ZV, Wiseman SM, Vora P. Hurthle cell neoplasms of the thyroid: sonographic appearance and histologic characteristics. *J Ultrasound Med.* 2008;27:751-57.

¹³⁰ Lee SK, Rho BH, Woo SK. Hürthle cell neoplasm: correlation of gray-scale and power Doppler sonographic findings with gross pathology. *J Clin Ultrasound.* 2010;38: 169-76.

¹³¹ Choi N, Moon WJ, Lee JH, Baek JH, Kim DW, Park SW. Ultrasonographic findings of medullary thyroid cancer: differences

according to tumor size and correlation with fine needle aspiration results. *Acta Radiol.* 2011;52:312-16.

¹³² Trimboli P, Giovanella L, Crescenzi A, Romanelli F, Valabrega S, Spriano G, Cremonini N, Guglielmi R, Papini E. Medullary thyroid cancer diagnosis: an appraisal. *Head Neck.* 2014;36:1216-23.

¹³³ Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P. Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2917-22.

¹³⁴ Azizi G, Keller J, Lewis M, Puett D, Rivenbark K, Malchoff C. Performance of elastography for the evaluation of thyroid nodules: a prospective study. *Thyroid.* 2013;23:734-40.

¹³⁵ Trimboli P, Guglielmi R, Monti S, Misischi I, Graziano F, Nasrollah N, Amendola S, Morgante SN, Deiana MG, Valabrega S, Toscano V, Papini E. Ultrasound sensitivity for thyroid malignancy is increased by real-time elastography: a prospective multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:4524-30.

¹³⁶ Ghajarzadeh M, Sodagari F, Shakiba M. Diagnostic accuracy of sonoelastography in detecting malignant thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 2014;202:379-89.

¹³⁷ Russ G, Royer B, Bigorgne C, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M, Leenhardt L. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and

data system on 4550 nodules with and without elastography. *Eur J Endocrinol.* 2013; 168:649-55.

¹³⁸ Rago T, Scutari M, Santini F, Loiacono V, Piaggi P, Di Coscio G, Basolo F, Berti P, Pinchera A, Vitti P. Real-time elastosonography: useful tool for refining the presurgical diagnosis in thyroid nodules with indeterminate or nondiagnostic cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:5274-80.

¹³⁹ Mandel SJ. Diagnostic use of ultrasonography in patients with nodular thyroid disease. *Endocr Pract.* 2004;10:246-52.

¹⁴⁰ Ahn SS, Kim EK, Kang DR, Lim SK, Kwak JY, Kim MJ. Biopsy of thyroid nodules: comparison of three sets of guidelines. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;194:31-7.

¹⁴¹ Christensen SB, Bondeson L, Ericsson UB, Lindholm K. Prediction of malignancy in the solitary thyroid nodule by physical examination, thyroid scan, fine-needle biopsy and serum thyroglobulin: a prospective study of 100 surgically treated patients. *Acta Chir Scand.* 1984;150:433-39.

¹⁴² Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on

Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1-133.

¹⁴³ Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, Paschke R, Valcavi R, Vitti P; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association Of Clinical Endocrinologists, American College Of Endocrinology, And Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines For Clinical Practice For The Diagnosis And Management Of Thyroid Nodules--2016 Update. *Endocr Pract*. 2016 May;22(5):622-39.

¹⁴⁴ Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick DS, Valcavi R, Hegedüs L, Vitti P; AACE/AME/ETA Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *J Endocrinol Invest*. 2010;33:1-50.

¹⁴⁵ Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2012;56(4):333-9.

¹⁴⁶ Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, Wang H, Kebebew E, Steward DL, Zeiger MA, Westra WH, Wang Y, Khanafshar E, Fellegara G, Rosai J, Livolsi V, Lanman RB. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid*. 2011;21(3):243-51.

¹⁴⁷ Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, Fadda G, Frasoldati A, Orlandi F, Palombini L, Papini E, Zini M, Pontecorvi A, Vitti P. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest.* 2014 Jun;37(6):593-9.

¹⁴⁸ Cross PA, Chandra A, Giles T, et al. Guidance on the reporting of thyroid cytology specimens. Royal College of Pathologists, 2009.

¹⁴⁹ Cibas ES, Ali SZ 2009 The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 132:658–65.

¹⁵⁰ Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW 2012 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* 56:333-39.

¹⁵¹ Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine- Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol.* 2008;36:425-37.

¹⁵² Sosa JA, Hanna JW, Lanman RB, Robinson KA, Ladenson PW. Increases in thyroid nodule fine-needle aspirations, surgeries, and diagnoses of thyroid cancer in the United States. In American Association of Endocrine Surgeons 34th Annual Meeting. Chicago, 2013.

¹⁵³ Hsiao SJ, Nikiforov YE. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):301-13.

¹⁵⁴ Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5399-404.

¹⁵⁵ Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159:676-90.

¹⁵⁶ Nikiforov YE. Role of molecular markers in thyroid nodule management: then and now. *Endocr Pract*. 2017 May 23. doi: 10.4158/EP171805.RA. [Epub ahead of print]

¹⁵⁷ Sciacchitano S, Paliotta DS, Nardi F, Sacchi A, Andreoli M, Pontecorvi A. PCR amplification and analysis of ras oncogenes from thyroid cytologic smears. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3:114-21.

¹⁵⁸ Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:2187-90.

¹⁵⁹ Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF

signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:1454-57.

¹⁶⁰ Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95:625-27.

¹⁶¹ Fnais N, Soobiah C, Al-Qahtani K, Hamid JS, Perrier L, Straus SE, Tricco AC. Diagnostic value of fine needle aspiration BRAF(V600E) mutation analysis in papillary thyroid cancer: a systematic review and metaanalysis. *Human pathology.* 2015;46:1443-54.

¹⁶² Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2092-8.

¹⁶³ Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brillì L, Montanaro A, Pacini F. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1365-9.

¹⁶⁴ Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate

thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:3390-7.

¹⁶⁵ Yip L, Wharry LI, Armstrong MJ, Silbermann A, McCoy KL, Stang MT, Ohori NP, LeBeau SO, Coyne C, Nikiforova MN, Bauman JE, Johnson JT, Tublin ME, Hodak SP, Nikiforov YE, Carty SE. A clinical algorithm for fine-needle aspiration molecular testing effectively guides the appropriate extent of initial thyroidectomy. *Annals of surgery.* 2014;260:163-8.

¹⁶⁶ Gomberawalla A, Elaraj DM. How to use molecular testing results to guide surgery: a surgeon's perspective. *Curr Opin Oncol.* 2014 Jan;26(1):14-21.

¹⁶⁷ Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, Friedman L, Kloos RT, LiVolsi VA, Mandel SJ, Raab SS, Rosai J, Steward DL, Walsh PS, Wilde JI, Zeiger MA, Lanman RB, Haugen BR. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *The New England journal of medicine.* 2012;367:705-15.

¹⁶⁸ Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98:1852-60.

¹⁶⁹ Nikiforov YE¹, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, Gooding WE, Hodak SP, LeBeau SO, Ohori NP, Seethala RR,

Tublin ME, Yip L, Nikiforova MN. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer*. 2014 Dec 1;120(23):3627-34.

¹⁷⁰ Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, Gooding WE, LeBeau SO, Ohori NP, Seethala RR, Tublin ME, Yip L, Nikiforova MN. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid*. 2015 Nov;25(11):1217-23.

¹⁷¹ National comprehensive cancer network clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines®).

¹⁷² Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andruss B, Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:2743-750.

¹⁷³ Lithwick-Yanai G, Dromi N, Shtabsky A, Morgenstern S, Strenov Y, Feinmesser M, Kravtsov V, Leon ME, Hajdúch M, Ali SZ, VandenBussche CJ, Zhang X, Leider-Trejo L, Zubkov A, Vorobyov S, Kushnir M1, Goren Y1, Tabak S, Kadosh E, Benjamin H, Schnitzer-Perlman T, Marmor H, Motin M, Lebanony D, Kredon-Russo S, Mitchell H, Noller M, Smith A, Dattner O, Ashkenazi K, Sanden M, Berlin KA,

Bar D, Meiri E. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *J Clin Pathol.* 2017 Jun;70(6):500-07.

¹⁷⁴ Burgess JR, Tucker P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine needle aspirate cytology. *Thyroid* 2006;16:47-53.

¹⁷⁵ Colonna M, Guizard AV, Schwartz C, Velten M, Raverdy N, Molinie F, Delafosse P, Franc B, Grosclaude P. A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983-2000). *Eur J Cancer* 2007;43:891-900.

¹⁷⁶ Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L; Thyroid Cancer Committee. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004;14:1056-60.

¹⁷⁷ Liu S, Semenciw R, Ugnat AM, Mao Y. Increasing thyroid cancer incidence in Canada, 1970-1996: time trends and age-period-cohort effects. *Br J Cancer* 2001;85:1335-9.

¹⁷⁸ Reynolds RM, Weir J, Stockton DL, Brewster DH, Sandeep TC, Strachan MW. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:156-62.

¹⁷⁹ Smailyte G, Miseikyte-Kaubriene E, Kurtinaitis J. Increasing thyroid cancer incidence in Lithuania in 1978-2003. *BMC Cancer* 2006;6:284.

¹⁸⁰ Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16:481-8.

¹⁸¹ AIRT Working Group. Italian cancer figures—report 2006: incidence, mortality and estimates 2006. *Epidemiol Prev.* 2006;30(1 suppl 2):80-1.

¹⁸² Ceresini G, Corcione L, Michiara M, Sgargi P, Teresi G, Gilli A, Usberti E, Silini E, Ceda GP. Thyroid cancer incidence by histological type and related variants in a mildly iodine-deficient area of Northern Italy, 1998 to 2009. *Cancer* 2012;118(22):5473-80.

¹⁸³ Mazzaferri EL, de los Santos ET, Rofagha-Keyhani S. Solitary thyroid nodule: diagnosis and management. *Med Clin North Am* 1988;72:1177-211.

¹⁸⁴ Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2006;16:109-42.

¹⁸⁵ Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, Orcutt J, Moore Jr FD, Larsen PR, Marqusee E, Alexander EK. Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary

and multiple thyroid nodules on sonography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3411-7.

¹⁸⁶ Kim DL, Song KH, Kim SK. High prevalence of carcinoma in ultrasonography-guided fine needle aspiration cytology of thyroid nodules. *Endocr J* 2008;55:135-42.

¹⁸⁷ Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1941-6.

¹⁸⁸ Gharib H. Changing trends in thyroid practice: understanding nodular thyroid disease. *Endocr Pract* 2004;10:31-9.

¹⁸⁹ Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, Groshen S, Singer P, Lopresti J, Martin SE. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* 2000;90:335-41.

¹⁹⁰ Scwabas GM, Staerkel GA, Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, Lee JE, Evans DB. Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg* 2003;186:702-10.

¹⁹¹ Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, Moore Jr FD, Kim BW, Nose V, Marqusee E, Larsen PR,

Alexander EK. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer* 2007;111:508-16.

¹⁹² Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132:658-65.

¹⁹³ Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, Vielh P, DeMay RM, Sidawy MK, Frable WJ. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* 2008;36:425-37.

¹⁹⁴ Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of “follicular neoplasm”: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.

¹⁹⁵ Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328:553-9.

¹⁹⁶ Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, OhYL, Choi YL, Shin JH, Kim HK, Jang HW, Chung JH. BRAFV600E mutation analysis in fineneedle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3693-700.

¹⁹⁷ Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN.

Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2092-8.

¹⁹⁸ Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brilli L, Montanaro A, Pacini F. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1365-9.

¹⁹⁹ Ohori NP, Nikiforova MN, Schoedel KE, LeBeau SO, Hodak SP, Seethala RR, Carty SE, Ogilvie JB, Yip L, Nikiforov YE. Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of “follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance.” *Cancer Cytopathol* 2010;118:17-23.

²⁰⁰ Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3390-7.

²⁰¹ Sipos, J. Advances in ultrasound for the diagnosis and management of thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1363-72.

²⁰² Hegedus, L, Bonnema, SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocrine Reviews* 2003;24:102-32.

²⁰³ Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P. Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2917-22.

²⁰⁴ Mehrotra P, McQueen A, Kolla S, Johnson SJ, Richardson DL. Does Elastography reduce the need for thyroid FNAs? *Clin Endocrinol* 2013;78:942-9.

²⁰⁵ Zajdela A, Zillhardt P, Voillemot N 1987 Cytological diagnosis by fine needle sampling without aspiration. *Cancer* 59:1201-05.

²⁰⁶ Zajdela A, Joly J, Gongora R 1987 Fine needle cytology sampling. Practical value in diagnosing thyroid disease. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 41:686-94.

²⁰⁷ G. Ceresini, L. Corcione, S. Morganti, B. Milli, L. Bertone, R. Prampolini, S. Petrazzoli, M. Saccani, G.P. Ceda, and G. Valenti. Ultrasound-Guided Fine-Needle Capillary Biopsy of Thyroid Nodules, Coupled with On-Site Cytologic Review, Improves Results. *Thyroid*, 2004;14(5):385-9.

²⁰⁸ Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on

Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1-133.

²⁰⁹ J. Martin Bland, Douglas G. Altman. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986;327:307-10.

²¹⁰ Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2005;12:245-62.

²¹¹ Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4393-97.

²¹² Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5399-404.

²¹³ Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69:4885-93.

²¹⁴ Fnais N, Soobiah C, Al-Qahtani K, Hamid JS, Perrier L, Straus SE, Tricco AC. Diagnostic value of fine needle aspiration BRAF(V600E) mutation analysis in papillary thyroid cancer: a systematic review and metaanalysis. *Human pathology*. 2015;46:1443-54.

²¹⁵ Nikiforov YE. Role of molecular markers in thyroid nodule management: then and now. *Endocr Pract*. 2017 May 23. doi: 10.4158/EP171805.RA. [Epub ahead of print]

²¹⁶ Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews Cancer*. 2006;6:292-306.

²¹⁷ Jeh SK, Jung SL, Kim BS, Lee YS. Evaluating the degree of conformity of papillary carcinoma and follicular carcinoma to the reported ultrasonographic findings of malignant thyroid tumor. *Korean J Radiol*. 2007;8:192-97.

²¹⁸ Kobayashi K, Fukata S, Miyauchi A. Diagnosis of follicular carcinoma of the thyroid: role of sonography in preoperative diagnosis of follicular nodules. *J Med Ultrasonics*. 2005;32:153-58.

²¹⁹ Gulcelik NE, Gulcelik MA, Kuru B. Risk of malignancy in patients with follicular neoplasm: predictive value of clinical and ultrasonographic features. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134:1312-15.

²²⁰ Rago T, Di Coscio G, Basolo F, Scutari M, Elisei R, Berti P, Miccoli P, Romani R, Faviana P, Pinchera A, Vitti P 2007 Combined clinical,

thyroid ultrasound and cytological features help to predict thyroid malignancy in follicular and Hurthle cell thyroid lesions: results from a series of 505 consecutive patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:13-20.

²²¹ Lee SK, Rho BH, Woo S-K. Hurthle Cell Neoplasm: Correlation of Gray-Scale and Power Doppler Sonographic Findings with Gross Pathology. *Journal of clinical ultrasound*, 2010;38:169-76.

²²² Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P. Elastasonography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2917-22.