

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Facoltà di Medicina e Chirurgia



DOTTORATO DI RICERCA IN EMATO  
ONCOLOGIA E MEDICINA INTERNA CLINICO-  
TRASLAZIONALE XXXIII CICLO

***PDL-1 nella prognosi e terapia del carcinoma  
tiroideo differenziato ad andamento aggressivo***

***Candidata: Dr.ssa Eleonora Monti***

Relatore:

*Ch.mo Prof. Diego Ferone*

Corelatore:

*Prof. Massimo Giusti*

Anno accademico 2019-2020

## **INDICE**

<i>INTRODUZIONE</i> .....	3
<i>STATO DELL'ARTE SUL CARCINOMA TIROIDEO</i> .....	3
a) Definizione e anatomia patologica .....	3
b) Epidemiologia ed eziopatogenesi .....	5
c. Clinica e diagnosi .....	6
d) Terapia .....	8
e) La biologia molecolare .....	10
<i>SCOPO DELLO STUDIO</i> .....	13
<i>MATERIALI E METODI</i> .....	14
<i>RISULTATI</i> .....	16
<i>DISCUSSIONE</i> .....	18
<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	21

## **INTRODUZIONE**

### *STATO DELL'ARTE SUL CARCINOMA TIROIDEO*

#### **a) Definizione e anatomia patologica**

Il carcinoma tiroideo può essere classificato in base alle cellule di origine in *carcinoma midollare* che origina dalle cellule C o parafollicolari, *papillare* (nella sua forma classica e nelle varianti follicolare, sclerosante, a cellule alte), *follicolare* (nella sua forma classica e nelle varianti a cellule chiare, a cellule ossifile o di Hurthle, insulare) originati entrambi dalle cellule follicolari ed *anaplastico*, derivato da uno degli istotipi differenziati (*Pacini et al. 2006*).

Il carcinoma papillare (PTC) è la neoplasia tiroidea maligna più frequente (>85%). Si tratta di lesioni solitarie o multifocali, più o meno infiltranti l'adiacente parenchima, con margini mai definiti. Può contenere papille ramificate con peduncolo fibrovascolare, per lo più ricoperto da cellule cuboidali ben differenziate ma, in una minoranza, possiamo avere anche un epitelio discretamente anaplastico, con variabilità morfologica cellulare e nucleare. Anche in assenza di un'architettura papillare la diagnosi può essere posta per la presenza di nuclei a vetro smerigliato, così definiti per la presenza di cromatina dispersa; altra caratteristica è la presenza di solchi nucleari. Si possono trovare corpi psammomatosi e calcificazioni concentriche non presenti nelle forme follicolari e midollari, inoltre sono spesso presenti focolai di invasione linfatica che probabilmente aumentano il rischio di recidiva e mortalità soprattutto nell'anziano, più rare le metastasi ematiche. Le diverse varianti hanno significati prognostici differenti, più favorevole per il carcinoma papillare capsulato, meno per il sclerosante diffuso o a cellule alte.

Il carcinoma follicolare (FTC) rappresenta il 5-15% dei tumori tiroidei primitivi, è il più frequente nelle aree a carenza di iodio alimentare e tende a svilupparsi più nelle donne (3:1) ed in età più avanzata rispetto ai carcinomi papillari. Si presenta come un nodulo ben circoscritto o ampiamente infiltrante, microscopicamente è costituito da follicoli contenenti colloide mentre nelle forme con differenziazione meno evidente possiamo trovare nidi privi di colloide o cellule con abbondante citoplasma (cellule di Hurthle). La prognosi potrebbe essere peggiore rispetto al papillare. Il carcinoma follicolare ha una scarsa tendenza all'invasione linfatica mentre è più frequente quella ematogena con diffusione a ossa, polmoni, fegato ed altro.

Il carcinoma follicolare non invasivo (*“noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features”*, NIFTP) è una patologia oncologica tiroidea incapsulata o comunque chiaramente delimitata con pattern di crescita e caratteristiche nucleari simili al PTC senza, però, papille ben formate o corpi psammomatosi e senza le tipiche caratteristiche dei PTC e dei PDTC (carcinomi tiroidei poco differenziati) La diagnosi di NIFTP può essere effettuata dopo la resezione chirurgica della neoplasia e deve avere i seguenti criteri: neoplasia incapsulata o evidente delimitazione dal parenchima tiroideo circostante, pattern di crescita follicolare senza papille ben formate, non corpi psammomatosi e pattern di crescita solido/trabecolare/insulare inferiore al 30%, caratteristiche nucleari PTC-like con score nucleare 2-3, non invasione vascolare, non invasione della capsula, non necrosi tumorale o alta attività mitotica (*Nikiforov et al. 2016*). La biologia molecolare normalmente è negativa (BRAFV600e, mutazione del promotore di TERT, fusione RET/PTC). Il potenziale di malignità sembra essere basso. (*Nikiforov et al. 2018*).

Il carcinoma anaplastico (ATC) è un tumore indifferenziato dell'epitelio follicolare e costituisce meno del 5% dei tumori della tiroide. E' un carcinoma aggressivo, con un tasso di mortalità vicino al 100% ed i pazienti con questo tipo di tumore sono mediamente più anziani. Si tratta di neoplasie che assumono morfologia variabile (cellule giganti pleomorfe, fusiformi con aspetto sarcomatoso, forme miste) e possono esserci foci di differenziazione papillare, o follicolare, a suggerirne l'origine da un carcinoma più differenziato. Le cellule neoplastiche esprimono marcatori epiteliali come la citocheratina, ma sono solitamente negative per marcatori tipici tiroidei come la tireoglobulina. Di solito si manifestano come una massa cervicale a rapida crescita con sintomi quali disfonia, disfagia, dispnea e tosse da compressione delle strutture anatomiche adiacenti. Sebbene le metastasi a distanza siano frequenti, la morte sopravviene per lo più per la crescita aggressiva e la compromissione delle strutture vitali nel collo (*Santarpia et al. 2008*).

Il PDTC è una entità separata a prognosi intermedia tra una DTC (carcinoma tiroideo differenziato) ed un ATC. I PDTC possono essere individuati dai criteri di Torino: *pattern* di crescita solido/trabecolare/insulare, assenza delle convenzionali caratteristiche nucleari dei carcinomi papillari ed almeno una delle seguenti caratteristiche nuclei convoluti, una attività mitotica aumentata (maggiore di 3/10 mitosi per campo, necrosi (*Volante et al., 2007*). I PDTC possono svilupparsi *de novo* o come de-differenziazione di un DTC (*Ibrahimasic et al., 2019*). I Pazienti con questa

patologia tendono a presentare fattori prognostici avversi quali età più avanzata, malattia loco-regionale avanzata, sesso maschile, metastasi a distanza.

Il carcinoma midollare (MTC), infine, è un tumore neuroendocrino di derivazione dalle cellule C e costituisce circa il 5% delle neoplasie tiroidee. Nel 80% dei casi si tratta di tumori sporadici, i casi rimanenti si verificano nel contesto di una sindrome MEN 2A (associato a tumore delle paratiroidi e a feocromocitoma) o 2B (associato a feocromocitoma e neurinomi multipli) o come neoplasia familiare senza associazione con sindrome MEN. Per le forme sporadiche, più frequente è la presentazione come nodulo solitario, mentre la presenza di aggregati multipli di cellule C sparsi per il parenchima deve far sospettare la familiarità del tumore. Le lesioni maggiori presentano aree di necrosi ed emorragia, spesso nello stroma adiacente si trovano depositi acellulari di amiloide, derivati da polipeptidi alterati di calcitonina.

Il tumore trabecolare ialinizzante è una rara neoplasia tiroidea senza invasione locale caratterizzata da un pattern di crescita trabecolare con ialinizzazione. A causa delle caratteristiche nucleari simili al PTC, può essere causa di citologie false-positive. Questo tipo di neoplasia, però, non sviluppa le mutazioni BRAFV600E o RAS che possono essere presenti, rispettivamente, nel PTC e nella sua variante follicolare. Negli ultimi anni è stata considerata una *neoplasia borderline* con uno scarso potenziale di malignità (*Nikiforova et al., 2019*). Nel lavoro di *Nikiforova* vengono rivalutati 17 casi di tumore trabecolare ialinizzante con evidenza di fusione PAX8-GLIS3. PAX 8 è un fattore di trascrizione particolarmente espresso nelle cellule follicolari tiroidee e necessario per il corretto sviluppo e la fisiologica funzione della ghiandola tiroidea. GLI-similar 1 e 3 (GLIS1 e GLIS3) appartengono alla famiglia dei fattori di trascrizione *zinc finger* che possono agire sia da attivatori che da inibitori nella trascrizione genica; nella tiroide GLIS3 è un importante regolatore della biosintesi ormonale. *Nikiforova* ha identificato la fusione PAX8-GLIS3 in questo tipo di neoplasie ma non nei PTC. Tramite il pannello *ThyroSeq v3 GC* su 10165 esami citologici è stata evidenziata questo tipo di fusione in 8 soggetti (0.1% dei casi) di cui è disponibile l'istologico di 5 pazienti che conferma la diagnosi di tumore trabecolare ialinizzante in tutti e 5 i casi.

## **b) Epidemiologia ed eziopatogenesi**

Il carcinoma tiroideo differenziato (DTC), rappresenta circa l'1,5% dei tumori maligni, il 70-90% di tutti i tumori maligni tiroidei, ed è la più comune neoplasia maligna del

sistema endocrino (*Loh et al. 1997*). L'incidenza varia a seconda della popolazione esaminata, dall'apporto di iodio nella dieta e dalle indagini diagnostiche impiegate. Si mostra in significativo aumento, più spiccato nel sesso femminile che in quello maschile (2-3:1), sebbene in questi ultimi la prognosi sia solitamente peggiore. A fronte di quest'aumentata frequenza non si ha un paragonabile aumento della mortalità; ciò nonostante il carcinoma tiroideo rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia endocrina, dopo il carcinoma ovarico.

La distribuzione del carcinoma tiroideo mostra, per entrambi i sessi, un'incidenza maggiore tra i 30-50 anni per il papillare e fra i 50-60 per il follicolare.

Nello sviluppo del carcinoma tiroideo sono implicati vari fattori di rischio, tra questi l'esposizione a valori sovra fisiologici di TSH conseguenti a carenza iodica (nelle aree con alto apporto si osserva una maggiore incidenza di carcinoma papillare, mentre in quelle con scarso apporto prevale l'istotipo follicolare) o per assunzione di sostanze gozzigene inducenti ipertrofia e iperplasia; l'esposizione a radiazioni (*De Groot et al., 1973*), con un periodo di latenza che va dai 4 ai 15 anni tra bambini ed adulti (il rischio di sviluppare un carcinoma tiroideo dopo la radioterapia è considerato del 3-5%, non è tuttavia dimostrato che la somministrazione di dosi diagnostiche e terapeutiche di I131 comportino un'incidenza significativamente aumentata); mutazioni di oncogeni quali RET, TRK, BRAF (dove la V600E è la più frequente) più tipici delle forme papillari e PAX8/PPAR $\gamma$  per i follicolari, hanno un ruolo anche le mutazioni inattivanti di oncosoppressori quali p53; generalmente si ritiene che la singola mutazione non sia sufficiente ad innescare la carcinogenesi e che siano necessarie più alterazioni. Svolge un ruolo anche la genetica, il riscontro di un carcinoma tiroideo familiare aumenta di 5 volte il rischio di sviluppare la medesima patologia nei parenti di primo grado del paziente affetto (*Hemminki et al., 2000*).

### **c. Clinica e diagnosi**

La clinica del carcinoma tiroideo è estremamente scarsa. Si presenta come un nodulo singolo o nel contesto di un gozzo multi nodulare, asintomatico ed il riscontro è perlopiù casuale in corso di esami svolti per fini differenti, o per approfondimento diagnostico nel caso di un nodulo palpabile. Talvolta si può avere una sensazione di tensione cervicale derivante dall'effetto massa e solo nelle forme avanzate si può osservare per disfagia per compressione sull'esofago, disfonia per l'azione sul nervo laringeo ricorrente, tosse e dispnea per compressione sulla trachea e dolorabilità. La diagnosi clinica è difficile ed è orientata soprattutto dai fattori di rischio quali l'età avanzata, il sesso maschile, una precedente irradiazione del collo, la familiarità, una

linfadenopatia laterocervicale, il rapido aumento volumetrico del nodulo e la fissità rispetto ai piani sottostanti.

Posto il sospetto, si faranno indagini ematochimiche per valutare lo stato dell'asse tiroideo mediante dosaggio del TSH, dell'f-T4, si ricercheranno gli anticorpi anti tireoperossidasi (TPOAb) per definire la presenza di una patologia autoimmune tiroidea sottostante e si potrà dosare la calcitonina (CT), per escludere la presenza di neoplasia midollare/iperplasia delle cellule C (*Elisei e Romei, 2013*), pur essendo il suo dosaggio né raccomandato né sconsigliato dalle ultime linee guida dell'American Thyroid Association (*Haugen et al., 2016*) in quanto il dosaggio della CT, al riscontro di nodulo tiroideo, non è stato associato, in molti studi, ad una riduzione in termini di mortalità. Nell'ultima *consensus* italiana sul carcinoma tiroideo è comunque consigliato il dosaggio della CT nei pazienti che vengono avviati all'intervento chirurgico e nei pazienti con gozzo multinodulare (GMN) (*Pacini et al., 2018*).

Indispensabile è poi l'ecografia tiroidea che permetterà l'inquadramento del nodulo e l'assegnazione di uno *score* ecografico per definire il rischio di malignità del nodulo stesso. I noduli con caratteristiche di sospetto sono noduli solidi ipoecogeni con uno o più delle seguenti caratteristiche: margini irregolari, microcalcificazioni, *taller than wide* in visione antero-posteriore, evidenza di estensione extra-tiroidea, rima di calcificazione con invasione dei tessuti molli circostanti. L'approfondimento con esame citologico è consigliato in caso di lesioni con caratteristiche ecografiche sospette sopra 10 mm di diametro massimo o per diametri maggiori (15 mm) in caso di lesioni prive delle caratteristiche ecografiche sopra riportate. In caso, inoltre, di noduli spongiformi o parzialmente cistici si può considerare un follow up ecografico optando l'esecuzione della citologia solo in caso di lesioni maggiori ai 20 mm di diametro massimo (*Haugen et al., 2016*). Le società scientifiche europee, americane, e coreane hanno inoltre riportato le modalità (TIRADS) per definire il grado di rischio oncologico alla ultrasonografia del nodulo tiroideo (*Russ et al., 2017; Gharib et al., 2016*) introdotta da *Horvath et al., 2009 (Figura n.1)*

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

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

**Figura 1:** la classificazione TIRADS europea ed il rischio di malignità associato (*Russ et al., 2017*)

Il campione citologico è ritenuto adeguato quando presenti almeno 5 gruppi di 10-15 cellule ben conservate, il risultato è espresso classificando la lesione in una delle cinque categorie della British Thyroid Association (*Perros et al., BTA guidelines for the management of thyroid cancer 2014*):

- **Thy 1** non diagnostico (inadeguato o dove degli artefatti tecnici ne impediscono l'interpretazione)
- **Thy 2** lesione benigna
- **Thy 3a** possibile neoplasia, presenza di aspetti atipici ma non abbastanza da essere inserito in un'altra categoria
- **Thy 3f** possibile neoplasia follicolare, le varianti istologiche possibili includono nodulo iperplastico, adenoma follicolare, carcinoma follicolare che non possono essere distinti alla sola citologia
- **Thy 4** lesione sospetta per malignità
- **Thy 5** diagnostico per lesione maligna

Esiste quindi una "zona grigia" che corrisponde al nodulo a citologia indeterminata (Thy3 a/f); il 25% dei Thy3 operati risulterà essere una neoplasia maligna (*Mihai et al., 2009; Giusti et al., 2014*).

#### **d) Terapia**

La terapia di prima scelta in caso di diagnosi citologica di sospetto carcinoma tiroideo (Thy 4 – Thy 5) è la chirurgia. L'intervento consiste in una tiroidectomia totale (si ha la conservazione di un minimo tessuto tiroideo, meno di 1-2 g, necessario per preservare alcune paratiroidi al fine di controllare il metabolismo calcio-fosforo). Vengono esplorati e, se necessario, asportati anche i linfonodi laterocervicali, paratracheali e tracheoesofagei. L'intervento, che ha scopo prettamente terapeutico nei casi in cui referto dell'esame citologico sia di Thy 4 o Thy 5, assume invece anche valenza diagnostica nei casi Thy 3 a/f in cui la probabilità di malignità si attesta rispettivamente intorno a 5-15 % e 15-30% (*Pacini et al., 2018*); l'ultima consensus italiana consiglia per la lesione Thy 3a la ripetizione del prelievo citologico e, se confermato il dato, optare per una lobo-istmectomia, per la lesione Thy 3f invece è consigliato



direttamente l'intervento di lobo-istmectomia nella maggioranza dei casi (*Pacini et al., 2018*).

L'ipotesi di trattamento radicale deve essere valutato previa ricerca di mutazioni geniche, clinica ed aspetto ecografico del nodulo in maniera congiunta tra chirurgo, endocrinologo e paziente.

La tiroidectomia totale è gravata da un maggior rischio di complicanze, in particolare ipoparatiroidismo permanente nel 3-5% dei casi, disfonia da lesioni del nervo ricorrente in meno del 1%.

La chirurgia può essere seguita o meno dalla terapia radiante con iodio radioattivo ( $^{131}\text{I}$ ). Dopo l'intervento di tiroidectomia totale i pazienti vanno stratificati in base al rischio di ricorrenza/recidiva per definire i successivi trattamenti (*Haugen et al., 2016*). La stratificazione di malattia dovrebbe basarsi sul valore di tireoglobulina (Tg; basale o stimolata con rhTSH) e l'ecografia del collo con indicazioni alla scintigrafia diagnostica solo in casi selezionati. I pazienti vanno stratificati in base alla classificazione ATA (**Figura 2**). La terapia con iodio radioattivo (RAI) non è raccomandata nei pazienti con basso rischio ATA, se non i casi selezionati. Nei pazienti a rischio intermedio e rischio intermedio-basso la RAI va considerata soprattutto nei pazienti con altri fattori di rischio come l'età avanzata, grande massa neoplastica, interessamento linfonodale, istologia aggressiva o invasione vascolare. I pazienti, invece, con rischio intermedio-alto o alto vanno di routine sottoposti alla RAI. I pazienti con rischio intermedio e basso possono essere preparati alla RAI con la stimolazione con rhTSH che si è dimostrata ugualmente efficace rispetto all'ipotiroidismo iatrogeno. Per i pazienti con rischio alto le linee guida sottolineano che sono necessari dati più solidi sull'uso routinario della stimolazione con rhTSH (*Pacini et al., 2018*)

<i>ATA risk Staging (TNM)</i>	<i>Description</i>	<i>Body of evidence suggests RAI improves disease-specific survival?</i>	<i>Body of evidence suggests RAI improves disease-free survival?</i>	<i>Postsurgical RAI indicated?</i>
ATA low risk T1a N0,Nx M0,Mx	Tumor size ≤1 cm (uni- or multi-focal)	No	No	No
ATA low risk T1b,T2 N0, Nx M0,Mx	Tumor size >1–4 cm	No	Conflicting observational data	Not routine <sup>b</sup> —May be considered for patients with aggressive histology or vascular invasion (ATA intermediate risk).
ATA low to intermediate risk T3 N0,Nx M0,Mx	Tumor size >4 cm	Conflicting data	Conflicting observational data	Consider <sup>b</sup> —Need to consider presence of other adverse features. Advancing age may favor RAI use in some cases, but specific age and tumor size cutoffs subject to some uncertainty. <sup>a</sup>
ATA low to intermediate risk T3 N0,Nx M0,Mx	Microscopic ETE, any tumor size	No	Conflicting observational data	Consider <sup>b</sup> —Generally favored based on risk of recurrent disease. Smaller tumors with microscopic ETE may not require RAI.
ATA low to intermediate risk T1-3 N1a M0,Mx	Central compartment neck lymph node metastases	No, except possibly in subgroup of patients ≥45 years of age (NTCTCSG Stage III)	Conflicting observational data	Consider <sup>b</sup> —Generally favored, due to somewhat higher risk of persistent or recurrent disease, especially with increasing number of large (>2–3 cm) or clinically evident lymph nodes or presence of extranodal extension. Advancing age may also favor RAI use. <sup>a</sup> However, there is insufficient data to mandate RAI use in patients with few (<5) microscopic nodal metastases in central compartment in absence of other adverse features.
ATA low to intermediate risk T1-3 N1b M0,Mx	Lateral neck or mediastinal lymph node metastases	No, except possibly in subgroup of patients ≥45 years of age	Conflicting observational data	Consider <sup>b</sup> —Generally favored, due to higher risk of persistent or recurrent disease, especially with increasing number of macroscopic or clinically evident lymph nodes or presence of extranodal extension. Advancing age may also favor RAI use. <sup>a</sup>
ATA high risk T4 Any N Any M	Any size, gross ETE	Yes, observational data	Yes, observational data	Yes
ATA high risk M1 Any T Any N	Distant metastases	Yes, observational data	Yes, observational data	Yes

**Figura 2:** la stratificazione del rischio di recidiva/ricorrenza malattia delle linee guida ATA con l'indicazione o meno alla terapia radio metabolica (*Haugen et al., 2016*)

## e) La biologia molecolare

### Mutazioni BRAF

Nell'ultimo decennio nell'ambito dell'oncologia tiroidea hanno assunto rilevanza sempre maggiore le indagini di biologia molecolare con l'obiettivo di identificare già alla diagnosi citologica o istologica le neoplasie tiroidee ad andamento più aggressivo (che rappresentano circa un 10% del totale). La mutazione più comune dei PTC è la BRAF V600E ed è presente nel 40-45 % dei casi (*Xing et al., 2013*): è una potente attivatrice di MAPK ed è stata ritrovata in diversi tipi di carcinoma, incluso il tiroideo. La mutazione BRAF K601E, invece, è stata riscontrata solo in casi di istologia benigna

(Monti et al., 2015). La mutazione BRAF V600E è stata identificata in alcuni microcarcinomi papillari con metastasi linfonodali e che recidivano con maggiore probabilità (Lin et al., 2010) ed in questi selezionati casi la presenza della mutazione BRAF V600E è presente nel 65-77% dei pazienti che hanno sviluppato metastasi linfonodali (pur avendo un basso valore predittivo positivo per identificare precocemente PTC con sviluppo extra tiroideo). In una *review* sistematica-metanalisi di 14 pubblicazioni con un totale di 2470 PTC, la presenza della BRAF V600E era significativamente aumentata nei pazienti con un più alto rischio di ricorrenza rispetto ai pazienti BRAF *wild type* (Tufano et al, 2012). Alcuni studi hanno dimostrato che la mutazione BRAF V600E sia un fattore prognostico negativo indipendente: un ampio studio multicentrico su 2099 pazienti ha stato dimostrato che la BRAF V600E è significativamente associata con il rischio di ricorrenza sia nei classici PTC che nelle varianti follicolari di PTC. I dati più recenti, inoltre, suggeriscono che un comportamento aggressivo, compresa l'alta probabilità di ricorrenza, sia presente soprattutto se vengono sviluppate più mutazioni oncogenetiche che includono BRAF V600E, il promotore di TERT, PIK3CA, TP 53 o AKT1 (Xing et al, 2015).

### **Mutazione del promotore di TERT**

I telomeri sono complessi nucleo proteici che consistono in piccole sequenze di DNA non trascritto TTAGGG e proteina; essi proteggono la fine dei cromosomi dalla perdita di materiale genetico durante la divisione cellulare. Ogni volta che la cellula si duplica, il telomero si accorcia. Quando la lunghezza del telomero raggiunge un punto critico la cellula non ha più la possibilità di moltiplicarsi. La telomerasi è un enzima che può aggiungere la sequenza telomerica TTAGGG al cromosoma per mantenere la lunghezza del telomero stesso. Esistono diversi enzimi: la *human telomerase reverse transcriptase (TERT)* e *human telomerase associated protein (hTP1)*. *Telomerase RNA Component (TERC)* serve da modello durante la replicazione mentre la TERT è responsabile di catalizzare l'aggiunta del frammento TTAGGG di DNA. Generalmente c'è una bassa espressione dell'attività della telomerasi nei tessuti normali e nei tumori benigni mentre nei carcinomi la sua attività sembra essere potenziata in modo da mantenere duratura la capacità replicativa della cellula tumorale. Per questo motivo la mutazione del promotore della TERT è diventata un focus importante per comprendere i meccanismi cellulari tumorali ed è stato identificato nel tessuto tumorale della tiroide per la prima volta nel 2013. Il gene TERT, localizzato sul cromosoma 5, consiste di 16 esoni e 15 introni (35 kb). La mutazione del promotore di TERT è presente soprattutto in due *hotspots* 1295 228C>T and 1295 250C>T (C228T and C250T). Queste due

mutazioni sono correlate con l'inizio ATG di un codone e con la malignità del tessuto neoplastico e con l'aggressività. La mutazione del promotore del TERT è stata identificata come un fattore prognostico negativo indipendente (*Melo et al., 2014*); soprattutto la presenza simultanea della mutazione del promotore di TERT e la presenza della BRAF V600E nella stessa neoplasia identifica un alto rischio di ricorrenza strutturale della malattia (*Xing et al., 2015*).

### **PDL-1**

In condizioni fisiologiche, sono necessari regolatori inibitori del checkpoint immunitario per garantire un'adeguata intensità della risposta immunitaria, che è fondamentale per ridurre il danno ai tessuti normali vicino alle lesioni ed evitare risposte autoimmunitarie. Tuttavia, l'iper-espressione dei regolatori del checkpoint inibitori potrebbe sopprimere l'attivazione dei linfociti T e la produzione di citochine, con conseguente disregolazione del sistema immunitario e silenziamento della sorveglianza immunitaria. Le risposte immunitarie ridotte sono associate alla progressione di metastasi nelle neoplasie. PD-1 (*programmed death 1*), ed il suo ligando PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), coinvolti nella regolazione del checkpoint inibitorio, sono stati identificati come componenti del microambiente tumorale, che è strettamente associato allo sviluppo ed alla progressione di tumori (*Cao et al., 2011*). Il PD-1 si trova fisiologicamente sulla superficie dei macrofagi e delle cellule T, comprese le cellule T CD8 +, le cellule T CD4 + e le cellule T regolatorie. I suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, sono espressi sulla membrana di varie cellule, comprese le cellule tumorali, con PD-L2 molto meno prevalente di PD-L1 e limitato a specifici tessuti e organi. L'interazione tra PD-1 e i suoi ligandi determina una tolleranza immunitaria sopprimendo la risposta immunitaria citotossica delle cellule T. Inoltre, può sopprimere la proliferazione e l'attivazione mediata dal recettore delle cellule T provocando la soppressione della segnalazione del recettore delle cellule T (*Zou W et al, 2008*). Pertanto, una corretta attivazione di questa via del checkpoint potrebbe modulare la risposta immunitaria, contribuendo all'inibizione dell'autoimmunità e riducendo il danno tissutale vicino all'area dell'infezione cronica (*Bastman JJ et al., 2016*). PD-L1 è espresso in modo aberrante sulle cellule tumorali in risposta alla stimolazione persistente delle vie di segnalazione oncogenica (*Spranger et al., 2018*) e più molecole pro-infiammatorie nel microambiente tumorale, di cui l'interferone (IFN), rilasciato dalle cellule T attivate, è considerato il più potente (*Kondo et al., 2010; Taube et al., 2012*). Recenti studi hanno dimostrato che PD-L1 è espresso anche nei tumori della tiroide e ne hanno riportato il valore predittivo e terapeutico. PD-L1 potrebbe essere considerato un potenziale bersaglio per

l'immunoterapia nella gestione di DTC progressivi e refrattari alla iodio-terapia e per gli ATC (Zhang et al., 2019; Chintakuntlawar et al., 2019)

### **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la presenza delle principali mutazioni e dei target immunologici all'interno della nostra popolazione di pazienti con carcinoma tiroideo a noto andamento aggressivo. Negli ultimi anni svariate mutazioni genetiche sono state identificate nel carcinoma tiroideo e spesso coinvolgono la cascata delle MAPchinasi (riarrangiamenti RET/PTC, mutazione BRAF). La mutazione BRAFV600E da svariate studi risulta associata a diversi markers di aggressività (metastasi linfonodali, estensione extra-tiroidea, massa tumorale maggiore di dimensioni, età di insorgenza più avanzata) ed a prognosi peggiore anche se tale associazione sembrerebbe dipendere anche dalla presenza di fattori di rischio aggiuntivi (Xing et al., 2013; Xing et al., 2015; Tufano et al., 2012; Li et al., 2012). La mutazione BRAFV600E è stata anche associata ad una minore espressione del trasportatore sodio-iodio (NIS) determinando la una radio-refrattarietà. Dagli studi presenti in letteratura le mutazioni del promotore TERT (sia la C250T che la C228T) sono associate a neoplasie poco differenziate e, di conseguenza, a prognosi maggiormente infauste (Jin et al., 2018). L'associazione tra BRAFV600E e mutazione del promotore TERT sembra avere un fattore aggiuntivo ed è significativamente associata ad un andamento maggiormente aggressivo (Vuong et al., 2017). Infatti le ultime linee guida americane (Haugen et al., 2016) hanno inserito nella valutazione prognostica la ricerca di tali mutazioni. Un altro campo in grande sviluppo è l'immunoterapia in campo oncologico: uno degli approcci è quello di bloccare dei *check-points* (ICPs) cellulari innescando una cascata inibitoria che è di sregolata nel cancro. In particolare il PD-1 sembra avere dei risultati promettenti in svariate tipi di carcinomi. Alcuni studi hanno evidenziano la presenza del PD-L1 nel carcinoma tiroideo, sia nei PTC, che negli istotipi meno differenziati e, trovando una correlazione tra l'espressione del PD-L1 e l'aggressività tumorale, hanno ipotizzato che l'immunoterapia potrebbe essere una alternativa nei i quei istotipi che, al momento, hanno limitate *chances* terapeutiche (Cunha et al., 2013; Angell et al., 2014)

## **MATERIALI E METODI**

La disponibilità di farmaci oncologici anche per il carcinoma tiroideo (sorafenib, lenvatinib, cabozantenib, ecc.) non più trattabile con RAI ed in progressione ha consentito all'endocrinologo un nuovo approccio oncologico in questa patologia (Huang *et al.*, 2019). Dal 2005 in una corte 500 pazienti con carcinoma tiroideo in follow-up attivo presso il nostro Ambulatorio di Oncologia Tiroidea sono stati identificati 40 soggetti con tumore ad andamento aggressivo. Da questo sottogruppo, sono stati sottoposti ad indagini molecolari 14 soggetti con patologia oncologica a noto andamento aggressivo di cui era disponibile materiale istologico. L'indagine è stata eseguita retrospettivamente previo consenso informato, quando possibile. Gli istotipi e lo stadio alla diagnosi sono rappresentati nella **Tabella 1**. Le caratteristiche dei pazienti erano le seguenti: 8 di sesso femminile (57%), 6 (43%) di sesso maschile. In 2 casi erano biopsie da masse al collo non operabili (14%) mentre 12 erano soggetti con neoplasie resecabili chirurgicamente (86%). Gli istotipi rappresentati erano 7 carcinoma follicolari (50%), 2 carcinomi anaplastici (14%), 5 carcinomi papillari (36%). Lo stadio secondo la TNM VII ed. era: 8 pazienti (57%) IV stadio, 6 (43%) pazienti III stadio. Utilizzando l'ultima classificazione lo stadio risulta sensibilmente differente: 8 pazienti (57%) II stadio, 3 pazienti (21%) III stadio, 1 paziente (7%) stadio IV b, 2 (14%) non classificabili per mancanza della tiroidectomia. Il grado di differenziazione è risultato: 8 pazienti grading G2 (57%), 2 pazienti G3 (14%), 1 paziente G1 (7%), 3 pazienti grading non determinabile (22%). Nella popolazione in studio 11 pazienti (78%) sono stati trattati con iodio-radioattivo, 3 pazienti (21%), non sono stati tratti con iodio-radioattivo.

	Sesso	Stadio istologico alla diagnosi	Istotipo	TNM (VIII ed. AJCC/TNM)	TNM (VII ed. AJCC/TNM)
B. A. M.	F	pT3/G2/N1b/Mx	FTC	II	III
T. A.	M	pT4a/G2/Nx/M1	FTC	II	IV B
D.E.G.	M	pT4a/G2/N1b/Mx	PTC	III	IV A
R.N.	M	pT3/G2/N1b	FTC	II	IV A
B.L.	M	pT4a/G2/N1a	PTC	III	IV A
B.F.	F	pT3/G1/N0/Mx	PTC	II	III
B.T.	F	pT4a/G3/Nx/Mx	FTC	III	IV A

C.A.	F	pT3a/G2/Nx/M1	FTC	IVB	IV C
B.E.	F	pT3/G2/N1	PTC	II	III
L.M.P.	F	ND	ATC	ND	IV B
M.N.	F	pT3/G3/pN1a/Mx	PTC	II	III
R.R.	M	ND	ATC	ND	IV B
B.G.	M	pT3/G?/Nx	FTC	II	III
D.L.	F	pT3a/G2/N0a/Mx	FTC	II	III

**Tabella 1.** Legenda: FTC carcinoma tiroideo follicolare, PTC carcinoma tiroideo papillare, ATC carcinoma tiroideo anaplastico

Per la valutazione del gene BRAF 100-200 ng di DNA genomico sono stati amplificati mediante PCR utilizzando 1.5 U di Platinum Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, TFS, Milan, Italy), 1x buffer, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 200 nM di dNTP, 30 pmoli di primer avanzati e inversi in un volume finale di 50 µL. Il set di primer (BRAF 15 avanzato: 5' tgcttgctctgataggaaaatg e BRAF 15 inverso: 5' agcatctcagggccaaaaat) è stato utilizzato per amplificare l'intera regione codone dell'esone 15 del gene BRAF e produrre amplificazioni da 230 bp. Per il gene TERT i primer oligonucleotidici della regione promoter della trascrittasi inversa telomerasi sono stati sintetizzati secondo la sequenza di riferimento genomico del Eukaryotic Promotor Database del TERT e progettati per amplificare una porzione del promotore del nucleo del gene TERT (da -144 a +43). L'amplificazione di 187 bp include le due principali mutazioni ricorrenti alle coordinate chr 5: 1 295 228 e chr 5: 1 295 250. La PCR è stata eseguita utilizzando 100-200 ng di DNA genomico in una miscela di reazione da 50 ml con 400 µM di dNTP (Fermentas-Thermo Scientific Life Science, Milano, Italia), primer da 0,75 mM, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 1x Buffer e 2,5 U di AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) su un termociclature Veriti a 96 pozzetti (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). prodotti amplificati di PCR sono stati quindi trattati con ExoSap (GE Healthcare, Waukesha, USA) come raccomandato e entrambi i filamenti sequenziati mediante sequenziamento del ciclo di terminazione del colorante (BigDye Terminator v3.1, TFS). Il rilevamento della sequenza nucleotidica è stato eseguito su un analizzatore genetico ABI Prism 3130 (TFS), secondo i protocolli standard. I dati della sequenza sono stati analizzati mediante software Mac Vector versione 11 (MacVector Inc., North Carolina, USA) al fine di identificare le mutazioni e assegnare genotipi a singoli campioni di DNA.

Sezioni di 2-3 mm da materiale FFPE venivano utilizzate per IHC su vetrini carichi elettricamente (Histobond®).

La positività per PD-L1 era definita come immunoreattività a livello di membrana almeno nel 1% di cellule. L'espressione del PDL-1 è stata valutata usando il *Tumour Proportion Score* (TPS) che è la percentuale di cellule tumorali vitali che mostrano una colorazione della membrana parziale o completa. L'immunoistochimica è stata eseguita su un campione di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) contenente almeno 100 cellule tumorali, utilizzando un protocollo ottimizzato con l'anticorpo 22C3 (Dako) sul coloratore automatico di vetrini BenchMark ULTRA (Ventana, Roche) secondo Neuman T et al. (2016). Ogni vetrino è stato visionato al microscopio ottico da due Patologi indipendentemente.

## **RISULTATI**

L'età media alla diagnosi della popolazione in studio è risultata 69 anni. 6 pazienti (43% del totale) sono risultati positivi alla ricerca del PD-L1 di cui 4 pazienti (67%) con concomitante mutazione del promotore TERT. I pazienti con ricerca di PD-L1 positivi erano 2 con diagnosi istologica di PTC (33.3%), 2 con diagnosi FTC (33.3%), 2 con ATC (33.3%). Considerando tutta la popolazione in studio in 9 pazienti (64% del totale) era presente la mutazione del promotore di TERT ed in 5 pazienti (35%) era presente una mutazione di BRAFV600E (di cui 4 pazienti con diagnosi di carcinoma papillare, 1 paziente con diagnosi di carcinoma follicolare). In 4 pazienti era co-presente la mutazione BRAF V600E e TERT. I pazienti con mutazione del promotore TERT erano 5 pazienti con diagnosi di PTC (55%), 3 pazienti con diagnosi di FTC (33%), 2 pazienti con diagnosi di ATC (22%). In 1 solo paziente (7%), con diagnosi istologica di carcinoma papillare, erano presenti tutte e tre le mutazioni. 1 solo paziente (7%), con diagnosi istologica di carcinoma follicolare, è risultato negativo a tutte le indagini molecolari eseguite.

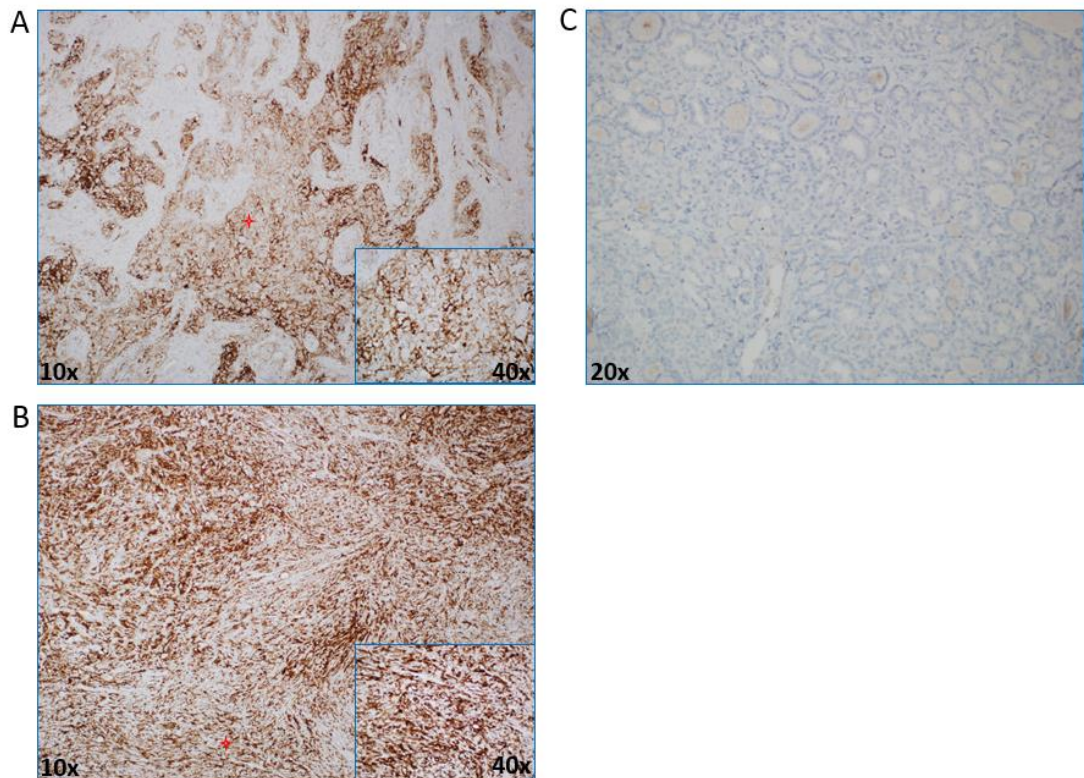
Tutti i pazienti hanno sviluppato metastasi: 2 pazienti hanno sviluppato metastasi a distanza, 5 pazienti metastasi al collo e 7 pazienti hanno sviluppato sia metastasi al collo, sia metastasi a distanza. La dose media di iodio radioattivo somministrata è stata 212 mCu. Rilevante come la nuova classificazione (VIII ed.) presenti delle caratteristiche sensibilmente differenti dalla VII ed.: nella prima il 57% dei pazienti risulta II stadio mentre nella seconda il 57% dei pazienti risulta IV stadio con possibili valutazioni prognostiche differenti alla diagnosi. Al momento del presente studio 8 soggetti sono deceduti per la patologia oncologica tiroidea (57%), 1 paziente per concomitante adenocarcinoma pancreatico.



I risultati delle indagini molecolari sono riassunti nella **Tabella 2**.

	BRAF	TERT	PD-L1
B. A. M.	WT	WT	NEG
T. A.	WT	WT	POS
D.E.G.	V600E	MUT	NEG
R.N.	WT	WT	NEG
B.L.	V600E	MUT	NEG
B.F.	WT	MUT	POS
B.T.	V600E	WT	POS
C.A.	WT	MUT	NEG
B.E.	V600E	MUT	NEG
L.M.P.	WT	MUT	POS
M.N.	V600E	MUT	POS
R.R.	WT	MUT	POS
B.G.	WT	WT	NEG
D.L.	WT	MUT (250)	NEG

8 pazienti (57%) sono stati avviati a terapia con inibitori delle tirosin kinasi (TKI). Tra i pazienti con la positività del PDL-1, 4 pazienti hanno sviluppato metastasi al collo (67%) e 2 pazienti metastasi a distanza (33%). Entrambi i pazienti con ATC sono risultati positivi alla ricerca del PD-L1 (100%). Nei pazienti con positività al PD-L1 lo stadio alla diagnosi era elevato: IV stadio in 4 soggetti (67%) dei casi e III stadio in due soggetti (33%) dei casi. L'età media del decesso dei pazienti PDL-1 positivi è 54 anni con circa 12 mesi medi di sopravvivenza dalla diagnosi, dei pazienti PDL-1 negativi è 74 anni con 55 mesi medi di sopravvivenza dalla diagnosi.



**Figura 3:** nelle sezioni A e B su casi con PDL-1 positivo, C con PDL-1 negativo

### **DISCUSSIONE**

Nella popolazione in studio, tutta con uno scarso grado di differenziazione, vi è una elevata percentuale di soggetti che presentano una o più mutazioni. Un solo paziente in studio non aveva alcuna delle mutazioni prese in considerazione. Il 10% dei carcinomi tiroidei presenta un andamento aggressivo, la comparsa di metastasi a distanza e la progressiva refrattarietà alle linee terapeutiche ad oggi a disposizione. L'immunoterapia in campo oncologico è una delle aree più promettenti. Uno degli approcci applicabili è il blocco dei check-point inibitori (ICPs), una serie di *pathways* inibitori cruciali per fisiologicamente mantenere una *self-tolerance* e deregolati nel tessuto tumorale. Gli ICPs sono attivati da interazioni ligando-recettori, quindi possono essere bloccati da anticorpi. In particolare è stato studiato il blocco della PD-1 (*programmed cell death protein 1*) che sembra essere promettente in numerosi carcinomi (Cantara et al., 2019). Alcuni studi hanno studiato la presenza del PD-L1 nei carcinomi tiroidei anaplastici o nei poco differenziati trovando una correlazione tra la aggressività della patologia neoplastica e la presenza del PD-L1 (Cunha et al., 2013; Angell et al., 2014; Bastman et al., 2016). Nella nostra popolazione il 43% è risultato

positivo alla ricerca del PD-L1 e tra i carcinomi anaplastici il 100% è risultato positivo ed è un dato in linea con la letteratura ove la frequenza della positività del PD-L1 varia dal 6.1 al 82.5% nei PTC e dal 22.2 al 81.2% negli ATC (*Zhang et al., 2019*). I carcinomi anaplastici seppur rari sono particolarmente aggressivi e rapidamente fatali con una mediana di sopravvivenza dai 3 ai 5 mesi (*Bastman et al., 2016*) ed una sopravvivenza a 5 anni tra lo 0-10% (*Liu et al., 2016*). Gli ATC possono comparire *de novo* oppure essere lo stadio finale di una de-differenziazione di carcinoma tiroideo ben differenziati (*Ragazzi et al., 2014*). Diversi studi hanno dimostrato che la combinazione di plurime terapie (chirurgica, chemioterapia e radioterapia) può implementare la sopravvivenza di pazienti selezionati, nonostante ciò la maggior parte dei pazienti decede a causa delle metastasi a distanza e della invasione locale non controllata (*Ito et al., 2014*) per cui appare decisivo trovare un marker che possa precocemente identificare questo tipo di patologia e che indirizzi il clinico verso delle possibili scelte terapeutiche. Nella nostra casistica il 67% dei pazienti con positività del PDL-1 ha sviluppato metastasi locali o a distanza confermando l'ipotesi che il PD-L1 possa essere associato ad una elevata aggressività della patologia oncologica di base, come anche confermato dalla meta-analisi di Aghajani et al (2018). Patel et al. (2015) ha identificato come in alcuni tumori solidi (ovaio, colon-retto, timoma, melanoma, tumore polmonare a piccole cellule) l'espressione del PD-L1 possa selezionare i pazienti che andranno a beneficiare dell'immunoterapia. Due tra gli anticorpi disponibili sono il Nivolumab, approvato dal FDA per i melanomi non resecabili o in stadio avanzato, ed il Pembrolizumab, approvato per i melanomi non responsivi al Ipilimumab e per i tumori polmonari metastatico non a piccole cellule positivi all'over-espressione del PDL-1 (*Patel et al., 2015*). Nel 2016 è stato approvato dalla FDA anche il Atezolizumab per i carcinomi vescicali (*Rosenberg et al., 2016*). Pazienti con iper-espressione di PDL-1 tendono ad avere una risposta più soddisfacente alla immunoterapia: I pazienti con melanoma positivi al PDL-1 hanno il 44-51 % di tasso di risposta ad anticorpi diretti contro il PD-1 mentre i pazienti con iper-espressione di PD-L1 con tumori polmonari a piccole cellule hanno un tasso di risposta del 67-100%. I pazienti, invece, senza over-espressione del PDL-1 risultano meno responsivi all'immunoterapia: 6-17% per il melanoma e 0-15% per il tumore polmonare a piccole cellule (*Patel et al., 2015*). È stato inoltre approvato, dalla FDA, il test diagnostico Ventana PD-L1 (SP 142) per riconoscere l'espressione del PDL-1 nell'infiltrato tumorale. Chintakuntlawar ed il suo gruppo di studio (2019) hanno avviato il Pembrolizumab su una ristretta popolazione di pazienti (n=3) con ATC in stadio avanzato (IV b) associandolo a trattamento chemioterapico e radioterapico: i dati risultano promettenti sulla riduzione della massa neoplastica ed il Pembrolizumab è risultato molto ben tollerato ma la mortalità a 6 mesi

non si è modificata ed i pazienti sono deceduti a meno di 6 mesi dalla diagnosi. Gli autori di questo studio concludono affermando che il Pembrolizumab potrebbe essere preso in considerazione in trial con paziente con ATC in fase più precoce, non metastatici. Nello studio di *Cantara et al. (2019)* su un numero maggiore di pazienti (n=20) con ATC, è stato evidenziato che la positività del PDL-1 è effettivamente presente in circa il 70-90% dei casi (70% dei casi utilizzando l'anticorpo Ventana e raggiungendo il 90% dei casi con l'anticorpo R&D Systems). Hanno inoltre indotto dei carcinomi anaplastici su modelli murini ed hanno trattato le cavie con anticorpi anti PD-L1 con evidenza di significativa riduzione della massa neoplastica. Al momento, inoltre, ci sono diversi trial (ClinicalTrial.gov) che stanno valutando l'efficacia dell'immunoterapia nel carcinoma tiroideo, tra cui il NCT03246958 (studio di fase due su nivolumab+ipilimumab in pazienti con carcinomi tiroidei refrattari alla iodio terapia ed in progressione nei 13 mesi precedenti al reclutamento) ed il NCT03215095 (studio di fase 1 con durvalumab+RAI dopo stimolazione con il rhTSH su pazienti con carcinoma tiroideo di origine follicolare con accertata ricorrenza o malattia metastatica).

La ricerca della mutazione del promotore TERT si conferma essere un dato determinante l'individuazione dell'aggressività della patologia oncologica tiroidea: nel 67% della nostra popolazione era presente una mutazione del TERT e nel 28% della popolazione era presente una doppia mutazione (BRAF V600E e TERT) come confermato anche dai dati della letteratura (*Vuong et al., 2017*). Indicativa anche la presenza della mutazione BRAFV600E: 35% sul totale dei pazienti ma presente nel 80% dei casi considerando solo i carcinomi con diagnosi istologica di PTC, ove la BRAFV600E è presente (*Monti et al., 2015*).

Concludendo la positività del PD-L1 sulla nostra popolazione di paziente con carcinomi tiroidei aggressivi pone una nuova possibilità terapeutica per pazienti al momento a prognosi infausta. La ricerca precoce delle mutazioni di BRAF e TERT può aiutare il clinico ad individuare alla diagnosi i pazienti ad alto rischio per individualizzare l'approccio diagnostico-terapeutico. Sarebbe utile poter ricercare le mutazioni alla diagnosi di carcinoma tiroideo poco differenziato, quindi al preliminare esame citologico, per l'inserimento del paziente in un programma diagnostico-terapeutico intensivo subito dopo la perdita della iodio-captazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Aghajani M, Graham S, McCafferty C, Shaheed CA, Roberts T, DeSouza P, Yang T, Niles N. Clinicopathologic and Prognostic Significance of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Patients with Non-Medullary Thyroid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2018 Mar;28(3):349-361. doi: 10.1089/thy.2017.0441.PMID: 29455638
- Angell T.E., Lechner M.G., Jang J.K., Correa A.J., LoPresti J.S., Epstein A.L. BRAF V600E in papillary thyroid carcinoma is associated with increased programmed death ligand 1 expression and suppressive immune cell infiltration. *Thyroid* 24, 1385–93 (2014)
- Bastman JJ, Serracino HS, Zhu Y, et al. Tumor-infiltrating T cells and the PD-1 checkpoint pathway in advanced differentiated and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:2863-2873
- Cantara S, Bertelli E, Occhini R, Regoli M, Brillì L, Pacini F, Castagna MG, Toti P. Blockade of the programmed death ligand 1 (PD-L1) as potential therapy for anaplastic thyroid cancer. *Endocrine*. 2019 Apr;64(1):122-129. doi: 10.1007/s12020-019-01865-5. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30762153
- Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, et al. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res*. 2011;71:1235-1243
- Chintakuntlawar AV, Yin J, Foote RL, Kasperbauer JL, Rivera M, Asmus E, Garces NI, Janus JR, Liu M, Ma DJ, Moore EJ, Morris JC 3rd, Neben-Wittich M, Price DL, Price KA, Ryder M, Van Abel KM, Hilger C, Samb E, Bible KC. A Phase 2 Study of Pembrolizumab Combined with Chemoradiotherapy as Initial Treatment for Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2019 Nov;29(11):1615-1622. doi: 10.1089/thy.2019.0086. PMID: 31595822
- Cunha L.L., Marcello M.A., Morari E.C., Nonogaki S., Conte F.F., Gerhard R., Soares F.A., Vassallo J., Ward L.S. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 103–10 (2013)
- De Groot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH: Natural history, treatment and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 71(2): 414-24
- Elisei R, Romei C: Calcitonin estimation in patients with nodular goiter and its significance for early detection of MTC: European comments to the guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid Res*. 2013; 6 Suppl 1:S2

- 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;22:622–639
- Giusti M, Campomenosi C, Gay S, Massa B, Silvestri E, Monti E, Turtulici G: The use of semi-quantitative ultrasound elastosonography in combination with conventional ultrasonography and contrast-enhanced ultrasonography in the assessment of malignancy risk of thyroid nodules with indeterminate cytology. *Thyroid Res.* 2014; 7(1); 9
- 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;26(1):1–133.
- He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2015;5:13110.
- Hemminki K, Dong C. Familial relationships in thyroid cancer by histopathological type. *Int J Cancer.* 2000 Jan 15;85(2):201-5.
- Herminki K., Dong CH.: Familiar relationship in thyroid cancer by histopathological type. *Int J Cancer.* 2000; 85(2): 201-5
- Horvath E, Majlis S, Rossi R, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1748–1751.
- Huang J, Harris EJ, Lorch JH. Treatment of Aggressive Thyroid Cancer. *Surg Pathol Clin.* 2019 Dec;12(4):943-950. doi: 10.1016/j.path.2019.08.004.
- Ibrahimasic T, Ghossein R, Shah JP, Ganly I. Poorly Differentiated Carcinoma of the Thyroid Gland: Current Status and Future Prospects. *Thyroid.* 2019 Mar;29(3):311-321. doi: 10.1089/thy.2018.0509
- Ito K, Hanamura T, Murayama K, Okada T, Watanabe T, Harada M, Ito T, Koyama H, Kanai T, Maeno K, Mochizuki Y, Amano J. Multimodality therapeutic outcomes in anaplastic thyroid carcinoma: improved survival in subgroups of patients with localized primary tumors. *Head & neck* 2012 34:230-237

- Jin A, Xu J, Wang Y. The role of TERT promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jul;97(29):e11548.
- Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, Kim KW, Hahn SK, Youn YK, Kim KH, Cho BY, Park DJ. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012;118(7):1764–1773.
- Kondo A, Yamashita T, Tamura H, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2010;116:1124-1131.
- Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(12):4559–4570
- Lin KL, Wang OC, Zhang XH, Dai XX, Hu XQ, Qu JM. The BRAF mutation is predictive of aggressive clinicopathological characteristics in papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010 Dec;17(12):3294-300. doi: 10.1245/s10434-010-1129-6. Epub 2010 Oct 15. PMID: 20953721
- Liu TR, Xiao ZW, Xu HN, Long Z, Wei FQ, Zhuang SM, Sun XM, Xie LE, Mu JS, Yang AK, Zhang GP, Fan Y 2016 Treatment and Prognosis of Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Clinical Study of 50 Cases. *PLoS One* 11:e0164840
- Loh KC, Greenspan FS, Gee L: Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(11): 3553-62
- Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, Celestino R, Almeida A, Salgado C, Eloy C, Castro P, Prazeres H, Lima J, Amaro T, Lobo C, Martins MJ, Moura M, Cavaco B, Leite V, Cameselle-Teijeiro JM, Carrilho F, Carvalheiro M, Máximo V, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):E754-65. doi: 10.1210/jc.2013-3734. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24476079
- Mihai R, Parker AJ, Roskell D, Sadler GP: One in four patients with follicular thyroid cytology (THY3) has a thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2009; 19(1): 33-7
- Monti E, Bovero M, Mortara L, Pera G, Zupo S, Gugiatti E, Dono M, Massa B, Ansaldo GL, Massimo G. BRAF Mutations in an Italian Regional Population: Implications for the Therapy of Thyroid Cancer. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:138734. doi: 10.1155/2015/138734. Epub 2015 Nov 26.

- Neuman T, London M, Kania-Almog J, Litvin A, Zohar Y, Fridel L, Sandbank J, Barshak I, Vainer GW. A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform. *J Thorac Oncol*. 2016 Nov;11(11):1863-1868. doi: 10.1016/j.jtho.2016.08.146. Epub 2016 Sep 21. PMID: 27664534.
- Nikiforov YE, Baloch ZW, Hodak SP, Giordano TJ, Lloyd RV, Seethala RR & Wenig BM 2018 Change in diagnostic criteria for noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillarylike nuclear features. *JAMA Oncology* 4 1125–1126
- Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, Barletta JA, Wenig BM, Al Ghuzlan A, Kakudo K, 2016 Nomenclature revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a paradigm shift to reduce overtreatment of indolent tumors. *JAMA Oncology* 2 1023–1029
- Nikiforova MN, Nikitski AV, Panebianco F, Kaya C, Yip L, Williams M, Chiosea SI, Seethala RR, Roy S, Condello V, Santana-Santos L, Wald AI, Carty SE, Ferris RL, El-Naggar AK, Nikiforov YE. GLIS Rearrangement is a Genomic Hallmark of Hyalinizing Trabecular Tumor of the Thyroid Gland. *Thyroid*. 2019 Feb;29(2):161-173. doi: 10.1089/thy.2018.0791.
- Pacini F, Basolo F, Bellantone R, Boni G, Cannizzaro MA, De Palma M, Durante C, Elisei R, Fadda G, Frasoldati A, Fugazzola L, Guglielmi R, Lombardi CP, Miccoli P, Papini E, Pellegriti G, Pezzullo L, Pontecorvi A, Salvatori M, Seregini E, Vitti P. Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six Italian societies. *J Endocrinol Invest*. 2018 Jul;41(7):849-876. doi: 10.1007/s40618-018-0884-2. Epub 2018 May 4. PMID: 29729004
- Pacini F. De Groot LJ, Thyroid neoplasia. In: *Endocrinology*, 5<sup>o</sup> Ed, De Groot LJ, Jamesons JL Eds. Elsevier & Saunders, 2006: 2147
- Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Apr;14(4):847-56. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983. Epub 2015 Feb 18.
- Perros P, Boelaert K, Colley S, Evans C, Evans RM, Gerrard Ba G, Gilbert J, Harrison B, Johnson SJ, Giles TE, Moss L, Lewington V, Newbold K, Taylor J, Thakker RV, Watkinson J, Williams GR; British Thyroid Association. Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Jul;81 Suppl 1:1-122
- Ragazzi M, Ciarrocchi A, Sancisi V, Gandolfi G, Bisagni A, Piana S 2014 Update on Anaplastic Thyroid Carcinoma: Morphological, Molecular, and



Genetic Features of the Most Aggressive Thyroid Cancer. *International Journal of Endocrinology* 2014:790834.

- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, Srinivas S, Retz MM, Grivas P, Joseph RW, Galsky MD, Fleming MT, Petrylak DP, Perez-Gracia JL, Burris HA, Castellano D, Canil C, Bellmunt J, Bajorin D, Nickles D, Bourgon R, Frampton GM, Cui N, Mariathasan S, Abidoye O, Fine GD, Dreicer R. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1909-20
- Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*. 2017 Sep;6(5):225-237. doi: 10.1159/000478927
- 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 Aug;18(8):901-5. doi: 10.1089/thy.2007.0179.
- Spranger S, Gajewski TF. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:139-147.
- Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4:127ra37
- Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(5):274–286.
- Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, Lloyd RV, LiVolsi VA, Papotti M, SobrinhoSimoës M, Bussolati G, Rosai J 2007 Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 31:1256–1264
- Vuong HG, Altibi AMA, Duong UNP, Hassell L. Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017 Nov;87(5):411-417. doi: 10.1111/cen.13413. Epub 2017 Aug 2.

- Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, Elisei R, Bendlov´a B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Clifton-Bligh R, Tallini G, Holt EH, S´ykorov´a V. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):42–50.
- Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Tufano RP, Pai SI, Zeiger MA, Westra WH, Clark DP, Clifton-Bligh R, Sidransky D, Ladenson PW, Sykorova V. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013;309(14): 1493–1501.
- Zhang GQ, Wei WJ, Song HJ, Sun ZK, Shen CT, Zhang XY, Chen XY, Qiu ZL, Luo QY. Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression In Thyroid Cancer. *Endocr Pract*. 2019 Mar;25(3):279-286. doi: 10.4158/EP-2018-0342
- Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:467-477.