

Carcinomi ben differenziati della tiroide: concetti emergenti e problematiche irrisolte



Ann. Ital. Chir., 2006; 77: 199-208

Luca Di Tommaso, Carmelo Arizzi, Massimo Roncalli

Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Università di Milano, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Milano).

Well differentiated thyroid carcinoma: New perspectives and old dilemmas

The diagnosis of well differentiated carcinoma (i.e. papillary carcinoma and follicular carcinoma) represents one of the most challenging issue in thyroid pathology. Aim of the present review is to discuss new perspective and old problems in this topic.

Three main subjects are developed, corresponding to: 1) the role of fine needle aspiration versus frozen section examination in pre- or peri-operative diagnosis; 2) the management of small papillary tumour; 3) pathological classification of those tumours indeterminate for papillary or follicular nature.

There is general agreement that fine needle aspiration represent the best pre-operative diagnostic tool for thyroid nodules; foremost limits are represented by "not diagnostic" and "follicular lesion, NOS". The former should be repeated or, if suspicious for papillary lesion, improved with intra-operative apposition cytology; the latter should be deferred to histology with frozen section evaluation reserved to those institution with daily practice on this issue.

The management of papillary micro-carcinoma (i.e. papillary carcinoma smaller than 1 cm.) in the setting of an otherwise benign thyroid disease is a matter of debate, since several clinicians suggest to consider these as incidental findings thus avoiding additional treatment. Recently this attitude has been supported by the proposal to regard these lesion as "tumour" and not carcinoma: available data on follow up seems to sustain and favour this approach.

There exist a group of well differentiated tumours of the thyroid lacking the criteria to be diagnosed either as papillary (i.e. nuclear grooves, nuclear pseudo-inclusion and nuclear clearing) or follicular (i.e. capsular or vascular invasion) carcinoma; for these lesion, whose behaviour (nodal or blood metastasis) can not be predicted, it has been suggested the term of well differentiated tumour of uncertain malignant potential.

Finally it has to be mentioned the possible role of molecular biology in the diagnosis of well differentiated thyroid carcinoma; indeed markers such as RET/PTC or PAX8/PPARgamma, which to date have been employed mainly in basic research, might represent useful diagnostic (and therapeutic) tools in the future.

KEY WORDS: Follicular carcinoma, Papillary carcinoma, Thyroid.

Introduzione

Circa il 60-70% della popolazione presenta almeno un nodulo tiroideo, seppur non palpabile ¹, mentre nel 4%-7% il nodulo tiroideo è palpabile ^{2,3}. L'inquadramento diagnostico di questo secondo gruppo di pazienti costituisce uno dei problemi clinici più rilevanti nell'ambito della patologia tiroidea. La diagnosi differenziale include

cisti colloidali, noduli dominanti nel contesto di un gozzo misconosciuto, noduli iperplastici, adenomi follicolari, carcinomi ben differenziati (follicolare e papillare) e più rare patologie malformative ed infiammatorie, mentre difficilmente carcinomi midollari, carcinomi scarsamente differenziati, carcinomi anaplastici e le altre rare neoplasie tiroidee primitive non epiteliali tendono a manifestarsi come noduli singoli. Nella maggior parte dei casi la lesione è benigna e non necessita di alcun trattamento di tipo chirurgico; tuttavia, in un percentuale compresa tra 3.4% ed il 29% queste lesioni sono maligne ⁴⁻⁸.

In questo lavoro ci si sofferma su uno degli ambiti di questo iter diagnostico, quello pertinente i carcinomi ben differenziati della tiroide.

Per la corrispondenza: Luca Di Tommaso, MD, Unità Operativa Anatomia Patologica, Istituto Clinico Humanitas, Via Manzoni 56, 20089 Rozzano (Milano). Tel: +39-02-8224-4715; Fax: +39-02-8224-4791 (e-mail: luca.di_tommaso@humanitas.it).

Carcinomi della tiroide: inquadramento istologico

Tradizionalmente i carcinomi della tiroide vengono classificati in forme ben differenziate, forme anaplastiche (o indifferenziate) e in carcinomi midollari. Questa classificazione distingue le neoplasie epiteliali maligne della tiroide in ragione: 1) della cellule di origine – separando lesioni delle cellule follicolari e lesioni delle cellule C parafollicolari – e 2) del grado di differenziazione.

In questo schema hanno trovato spazio, seppure solo di recente, le forme scarsamente differenziate nelle loro varietà insulare, trabecolare e solida mentre altre neoplasie epiteliali maligne (carcinoma squamoso, muco-epidermoide, muco-epidermoide con eosinofilia, mucinoso, con aspetti di differenziazione in senso timico) vengono considerati come istotipi speciali (Tab. I). Un discorso a parte meritano i carcinomi a cellule ossifile: questi non vengono ancora riconosciuti come una entità a sé stante, ma sono indicati come varietà istologica di entrambe le forme ben differenziate; si riconoscono cioè carcinomi papillari ossifili e carcinomi follicolari ossifili⁹.

Di seguito vengono sviluppate alcune considerazioni relative ai carcinomi ben differenziati della tiroide, distinti in carcinomi papillari (CP) e carcinomi follicolari (CF). Di ciascuna entità viene dato un rapido cenno alle conoscenze già consolidate, per le quali si rimanda a trattati specifici, mentre vengono affrontate più nello specifico le problematiche irrisolte ed i concetti emergenti.

Carcinoma papillare (CP)

È definito come una “*Neoplasia epiteliale maligna con evidenza di differenziazione follicolare e caratterizzata da peculiari caratteristiche nucleari*”⁹. Queste ultime sono rappresentate da nuclei chiari ed irregolarità del profilo nucleare come incisure e pseudo-inclusi. Il CP si caratterizza, in genere, per la presenza di papille e corpi psammomatosi, tuttavia, elemento comune a tutte le numerose varianti istologiche del CP (follicolare, macrofollicolare, ossifila, a cellule chiare, sclerosante diffusa, a cellule alte, a cellule colonnari, solida, cribriforme, con stroma tipo fascite nodulare, con metaplasia adiposa) è solo ed esclusivamente la presenza di queste caratteristiche alterazioni nucleari (che sono dovute alla presenza del riarrangiamento di uno specifico proto-oncogene definito RET/PTC, vedi il paragrafo “*Dalla istologia alla Biologia molecolare*”).

La maggior parte dei lavori indicano nel sesso e nell'età del paziente, nelle dimensioni e nella estensione della lesione i fattori in grado di condizionare la prognosi, con tassi di mortalità a 20 anni intorno al 1, 1-1, 2% per lesioni a basso rischio e intorno al 39% per le lesioni ad alto rischio¹⁰⁻¹².

Fra i numerosi concetti emersi nella più recente letteratura a riguardo del CP due, a nostro avviso, meritano di essere segnalati per le possibili ricadute pratiche che potrebbero avere nella pratica chirurgica: 1) la classificazione di

TABELLA I – *Classificazione istologica dei tumori della tiroide*

CARCINOMI DELLA TIROIDE

- *Carcinoma ben differenziato*
 - Carcinoma papillare
 - Carcinoma follicolare
- *Carcinoma scarsamente differenziato*
 - Varietà insulare
 - Varietà trabecolare
 - Varietà solida
- *Carcinoma anaplastico*
 - Varietà osteoclastica
 - Varietà carcinosarcomatosa
 - Varietà simil linfoepitelioma
 - Varietà ipocellate
- *Carcinoma midollare*
 - Varietà papillare
 - Varietà ghiandolare (o follicolare)
 - Varietà a cellule giganti
 - Varietà a piccole cellule
 - Varietà a cellule fusate
 - Varietà a cellule ossifile
 - Varietà a cellule squamose
 - Varietà simil angiosarcoma
 - Varietà simil paraganglioma
 - Varietà con produzione di melanina
 - Varietà amfibrina
- *Carcinoma misto: midollare ed a cellule follicolari*
- *Istotipi speciali*
 - carcinoma squamoso
 - muco-epidermoide
 - muco-epidermoide con eosinofilia
 - mucinoso
 - con aspetti di differenziazione in senso timico

ADENOMI DELLA TIROIDE E LESIONI ANALOGHE

ALTRI TUMORI DELLA TIROIDE

(Modificata da: DeLellis Ra, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs⁹).

lesioni neoplastiche con caratteristiche nucleari “dubbe” per CP e 2) la classificazione di lesioni papillari di piccole dimensioni (c.d. micro-carcinomi papillari).

È esperienza comune a chi si occupa di patologia tiroidea l'esistenza un gruppo di lesioni tiroidee, in genere ad architettura follicolare e con pseudo-capsula fibrosa, caratterizzate dalla presenza di caratteristiche nucleari suggestive, ma non conclusive (cioè non diagnostiche) per CP. In presenza di una siffatta lesione, essendo impossibile la diagnosi di CP come da definizione della WHO, pare opportuno ricondurre la diagnosi ai parametri del carcinoma follicolare (CF). Pertanto, se la lesione in esame mostra aspetti nucleari dubbi per CP ed al contempo una evidente permeazione della pseudo-capsula è stato suggerito che si debba utilizzare il termine di

TABELLA II – Proposta di classificazione per le neoplasie tiroidee con caratteristiche nucleari e di infiltrazione capsulare non conclusive per carcinoma papillare o follicolare.

INFILTRAZIONE CAPSULARE	Caratteristiche nucleari di malignità			
	Sicura	Sicure	Dubbie	Assenti
		Carcinoma papillare	CARCINOMA BEN DIFFERENZIATO, NAS	Carcinoma follicolare
	Dubbia	Carcinoma papillare	TUMORE BEN DIFFERENZIATO AD INCERTO POTENZIALE DI MALIGNITÀ	Tumore follicolare ad incerto potenziale di malignità
Assente	Carcinoma papillare	TUMORE BEN DIFFERENZIATO AD INCERTO POTENZIALE DI MALIGNITÀ	Adenoma follicolare	

(Adattata da Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ediz. 17).

“Carcinoma ben differenziato, NAS” (Tab. II) ¹³. All’opposto in presenza di una lesione con aspetti nucleari dubbi per CP e di aspetti dubbi o in assenza di permeazione della pseudo-capsula tumorale, è stato suggerito che si debba utilizzare il termine di “Tumore ben differenziato ad incerto potenziale di malignità” (Tab. II). Seppur non esistano ancora dati relativi alla applicazione pratica di queste categorie diagnostiche va segnalato: 1) che il “Carcinoma ben differenziato, NAS” si sovrappone, per criteri diagnostici, al *Carcinoma follicolare minimamente invasivo* (vedi sezione successiva) e pertanto ci si attende una prognosi favorevole e 2) che con il termine di “Tumore ben differenziato ad incerto potenziale di malignità” viene adottata una terminologia analoga a quella già in uso in altri ambiti della patologia che sottende la esistenza di lesioni borderline e che, come in quegli ambiti, sembra logico attendersi dati di prognosi estremamente favorevoli.

I micro-carcinomi papillari sono CP di dimensioni <1 cm, di riscontro occasionale. Insorgono in genere in prossimità alla capsula tiroidea e si caratterizzano per un aspetto stellariforme e sclerosante (in genere nelle lesioni >5 mm) o per un aspetto follicolare (lesioni <5 mm). Il riscontro di queste lesioni è estremamente frequente (sono presenti nel 24% delle tiroideomie chirurgiche e nel 33% degli esami autoptici) specie nei casi con un campionamento esteso o in toto ¹⁴. Solo in rari casi la malattia si presenta già all’esordio con metastasi linfonodali, mentre nella maggior parte dei casi la prognosi è estremamente favorevole tanto che numerosi gruppi hanno suggerito di evitare ulteriori terapie nei casi di riscontro occasionale. Proprio in riferimento a questo aspetto è stata proposta una riclassificazione nei termini di “Microtumore papillare” ¹⁵. Questa dizione avrebbe il vantaggio di eliminare il termine di carcinoma (ridu-

cendo drasticamente l’impatto psicologico della diagnosi) pur sottolineando che si tratta di una lesione neoplastica, di piccole dimensioni, della famiglia delle lesioni papillari. L’impiego di questa nuova terminologia andrebbe riservato, a detta degli stessi autori, a condizioni estremamente specifiche (tra le quali anche la presenza di un focolaio di microtumore papillare nel contesto di un adenoma) e comunque escludendo:

- pazienti di età inferiore ai 19 anni, dove si dovrebbe continuare ad utilizzare il termine di CP;
- pazienti con lesioni angioinvasive o con superamento della capsula tiroidea o con aspetti a cellule alte, dove si dovrebbe continuare ad utilizzare il termine di CP;
- pazienti con 2 (o più lesioni) in cui la somma dei diametri massimi dei singoli focolai sia > cm. 1.

Carcinoma follicolare (CF)

È definito come una “Neoplasia epiteliale maligna con evidenza di differenziazione follicolare e priva delle caratteristiche nucleari del carcinoma papillare” ⁹. I parametri che individuano la “malignità” della lesione sono rappresentati esclusivamente dall’infiltrazione della pseudo-capsula tumorale e dalla permeazione dei vasi peri-tumoral; mentre non sono da valutare né aspetti architetturali, come ad esempio la presenza di aree solide né franche atipie citologiche. In ragione della presenza e della estensione dei suddetti parametri la stessa WHO prevede che i CF vengono distinti in forme “minimamente invasive” (caratterizzate “dalla presenza di minimi aspetti di permeazione della pseudo-capsula e dei vasi”) e forme “ampiamente invasive” (caratterizzate “da più evidenti aspetti di infiltrazione”). In tali definizioni, tuttavia, vengono omessi i criteri oggettivi che distinguano le forme minimamente da quelle ampiamente invasive.

A questa mancanza si può cercare di porre rimedio riferendosi ad altre fonti ^{16,17}. In riferimento al superamento della pseudo-capsula è stato fatto notare che per sostenere una diagnosi di CF minimamente invasivo si devono individuare rari aggregati di cellule neoplastiche che discontinuino la stessa, spingendosi sino al parenchima tiroideo adiacente; al contrario nel caso di un CF ampiamente invasivo si devono individuare rari frammenti residui di pseudo-capsula fra i numerosi gettoni neoplastici. Per quel che concerne la permeazione vascolare i vasi interessati devono avere le dimensioni di vene ed essere localizzate nella capsula o esternamente ad essa mentre il trombo neoplastico deve essere adeso alla parete del vaso. Inoltre è stato indicato che lesioni con un numero di vasi permeati da cellule neoplastiche superiore a 4 si comportano come forme ampiamente invasive. Pertanto:

- A) Le forme minimamente invasive, si caratterizzano per la presenza di:
- Pseudo-capsula pressoché indenne
 - Rari gettoni neoplastici che discontinuano la pseudo-capsula

– Permeazione neoplastica di un numero di vasi <4
B) Le forme ampiamente invasive, si caratterizzano per la presenza di:

- Pseudo-capsula pressoché assente
- Permeazione neoplastica di un numero di vasi >4

I dati relativi alla prognosi mostrano che le forme “ampiamente invasive” hanno una mortalità a lungo termine del 50% e sono quindi da considerare, a tutti gli effetti, come neoplasie francamente maligne; i dati relativi alle forme “minimamente invasive” mostrano una mortalità a lungo termine del 3%-5% sovrapponibile, in altri termini, a quello della popolazione non affetta da neoplasie della tiroide.

Come discusso nel paragrafo precedente le permeazione vascolare e l'infiltrazione della pseudo-capsula tumorale definiscono la prognosi del CF. Tuttavia, mentre la permeazione vascolare è un parametro oggettivo (anche grazie all'uso di marcatori immunoistochimici per l'endotelio), il superamento della pseudo-capsula può essere “dubbio”. Infatti, a fronte di indiscutibili situazioni di superamento della capsula ne esistono altre di non univoca interpretazione. Non stupisce, pertanto, che di recente, sia stato suggerito di etichettare lesioni con aspetti di superamento capsulare “opinabile”, non più come carcinoma ma come “*Tumore follicolare ad incerto potenziale di malignità*” (Tab. II). Anche in questo caso la scelta del termine (tumore al posto di carcinoma) sembra precorrere l'introduzione del concetto di neoplasia borderline. L'approccio classificativo fin qui seguito, essenzialmente morfologico, ha trovato, negli ultimi anni, un valido supporto in studi di biologia molecolare.

Dalla Istologia alla Biologia Molecolare

Negli ultimi 10 anni sono stati fatti enormi passi avanti nella comprensione dei meccanismi di carcinogenesi dei tumori della tiroide a livello molecolare e questo ha avuto ripercussioni anche a livello della classificazione degli stessi. Tra i carcinomi ben differenziati è oramai chiaro che i riarrangiamenti di RET/PTC e di TRK caratterizzano, in maniera specifica, il carcinoma papillare mentre il riarrangiamento PAX8/PPAR γ e la presenza di mutazioni che coinvolgono RAS sono specifici del carcinoma follicolare. Mutazioni puntiformi o piccole delezioni del RET caratterizzano anche i carcinomi midollari: a livello germinale nelle forme familiari, a livello somatico in quelle sporadiche. La presenza di mutazioni di p53 è l'aspetto molecolare più comune nei carcinomi indifferenziati mentre solo alcuni carcinomi scarsamente differenziati ed alcuni indifferenziati mostrano delle modificazioni per BRAF simili a quelle individuate in alcuni carcinomi papillari, favorendo l'ipotesi di una origine comune. Restano invece da chiarire alcuni aspetti, primo fra tutti il profilo molecolare dei carcinomi ossifili. Di conseguenza non stupisca che lesioni ossifile caratterizzate da nuclei chiari, pseudoinclusi e papille vengano classificati

come carcinomi papillari ossifili mentre, in assenza dei suddetti caratteri, le stesse lesioni siano classificate come carcinomi follicolari ossifili.

Esaminiamo di seguito gli aspetti di biologia molecolare relativi ai carcinomi ben differenziati della tiroide.

Riarrangiamento RET/PTC

L'esistenza di un oncogene specifico nel carcinoma papillare della tiroide – definito PTC- era nota da tempo ¹⁸; solo di recente, tuttavia, questo oncogene è stato definito nel dettaglio ed individuato come il prodotto di un riarrangiamento del proto-oncogene RET (di qui l'acronimo RET/PTC).

Il proto-oncogene RET codifica per una proteina ad attività recettoriale caratterizzata da un dominio intracellulare ad attività tirosin chinasi ed è coinvolto in maniera critica nei processi di embriogenesi ^{19,20}. Il prodotto del riarrangiamento RET/PTC è una molecola dimerica che attiva, in maniera indipendente dal legando, l'attività chinasi ²¹. Sotto questo stimolo si assiste ad una modificazione in senso neoplastico della cellula follicolare: studi condotti su cellule tiroidee di ratto hanno dimostrato che RET/PTC rende queste ultime indipendenti dallo stimolo della tireotropina per quel che concerne la proliferazione ²² mentre studi condotti su colture di cellule tiroidee umane hanno dimostrato che RET/PTC è responsabile delle modificazioni citologiche nucleari tipiche del carcinoma papillare (chiarificazione, incisure e pseudoinclusi nucleari) ²³. Oggi si conoscono almeno 11 tipi differenti di riarrangiamento RET/PTC tutti caratterizzati da una fusione del dominio tirosin-chinasi di RET (10q11.2) con la sequenza 5' terminale di altri geni localizzati su altri cromosomi. La più frequente fra queste forme è RET/PTC1 (60-70%), seguita da RET/PTC3 (20-30%) mentre RET/PTC2 e le altre forme incidono per una percentuale inferiore al 5% (Tab. III).

La mole di dati prodotti in seguito alla identificazione di RET/PTC inizia a delineare anche possibili scenari di applicazione nella diagnostica e nella terapia del CP. Complessivamente l'incidenza del riarrangiamento RET/PTC varia tra il 20-30% delle forme sporadiche, il 45-60% dei carcinomi papillari dei bambini e dei giovani adulti ed il 50-80% delle forme eziologicamente correlate a radiazioni. Inoltre specifiche mutazioni sono state messe in relazioni a ben definite varietà istologiche del CP. Ad esempio RET/PTC1 caratterizza i CP classici e i cosiddetti micro-carcinomi, ovvero lesioni a prognosi, in genere, favorevole. Al contrario studi successivi all'incidente nucleare di Chernobyl hanno dimostrato una correlazione eziologica fra RET/PTC3 e, anche se in misura minore, RET/PTC2 ed alcune forme istologiche meno frequenti ²⁴⁻²⁶. Inoltre RET/PTC3 caratterizza in maniera specifica varietà istologiche ad alto grado del CP come la solida e quella a cellule alte ²⁷. Sulla scorta di tali dati appare plausibile affermare che RET/PTC2 e RET/PTC3 correlano con varietà di CP a prognosi sfavorevole.

TABELLA III – RET/PTC caratteristiche molecolari e clinico-patologiche

Tipo di RET/PTC	Gene coinvolto	Meccanismo	Prevalenza	Esposizione a radiazioni	Istotipo associato
RET/PTC1	H4	inv(10)	60-70%	Talvolta	Papp. Classico; Micropapp.
RET/PTC2	RLA	t(10;17)	<10%	Talvolta	Papp. Classico
RET/PTC 3 e 4	ELE1	inv(10)	20-30%	Si	Papp. Solido; Cellule alte
RET/PTC5	GOLGA5	t(10;14)	Rare	Si	Papp. Solido
RET/PTC6	HTIF1	t(7;10)	Rare	Si	Papp. Solido
RET/PTC7	RFG7	t(1;10)	Rare	Si	Papp. Solido
RET/ELKS	ELKS	t(10;12)	Rare	No	Papp. alto grado
RET/KTN1	KTN1	t(10;14)	Rare	Si	Papp. NAS
RET/RFG8	RFG8	t(10;18)	Rare	Si	Papp. Follicolare
RET/PCM-1	PCM-1	t(8;10)	Rare	Si	Papp. Solido

(modificato da Tallini G and Asa SL. *RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma* ²⁸, modificata).

Riarrangiamento PAX8/PPAR γ

Il gene di fusione PAX8/PPAR γ (PPFP) è il prodotto di una traslocazione genica che interessa i cromosomi 2 e 3. Questa fusione t(2;3)(q12-13;p24-25) colloca l'intera sequenza codificante del fattore di trascrizione nucleare PPAR γ a livello degli esoni 6-9 del gene PAX 8 che codifica, a sua volta, per un fattore di trascrizione che regola i processi di differenziazione, crescita e funzione della tiroide ²⁹. Il prodotto proteico di questo gene di fusione agisce sui tireociti facilitando il passaggio in ciclo, inibendo l'apoptosi e rendendo possibile la crescita matrice indipendente e la perdita della inibizione da contatto ³⁰ con un meccanismo molto simile a quello di analoghe proteine di fusione prodotte da linfomi e leucemie.

Nella ipotesi iniziale PPFP veniva indicato come esclusivo dei carcinomi follicolari essendo risultata negativa la sua espressione in noduli iperplastici, adenomi follicolari e carcinomi papillari ²⁹. In seguito sono state testate altre 642 neoplasie tiroidee: PPFP risulta espresso nel 48% dei carcinomi follicolari (192 casi; range 29-78%), nel 16% degli adenomi follicolari (166 casi; range 0-55%), pressoché assente nei carcinomi papillari (1 positivo su 130 casi) e del tutto assente nei carcinomi (57 casi) ed adenomi (42 casi) a cellule di Hurthle e nei carcinomi anaplastici della tiroide (16 casi) ³¹⁻³⁴ (Tab. IV).

La tipizzazione immunofenotipica di una casistica di tumori follicolari raccolta presso la nostra istituzione (20 adenomi, 3 tumori follicolari ad incerto potenziale di malignità, 6 carcinomi follicolari minimamente invasivi, 16 carcinomi follicolari ampiamente invasivi, 20 fra carcinomi ed adenomi a cellule ossifili e 10 carcinomi scarsamente differenziati) ha confermato che PPFP risulta espresso in lesioni benigne (8/20 adenomi, 40%), borderline (3/3 tumori follicolari ad incerto potenziale di malignità 100%) e maligne (5/6 carcinomi follicolari minimamente invasivi, 83%; 8/16 carcinomi follicolari ampiamente invasivi, 50%) ma non in tumori ossifili né in carcinomi scarsamente differenziati. Emerge inoltre: 1) che le lesioni benigne positive a PPFP hanno aspetti di crescita microfollicolare ed un atteggiamento di aggres-

sione della capsula (pur senza superamento) che si sovrappone, in molti aspetti, ai tumori follicolari ad incerto potenziale di malignità; 2) che le lesioni maligne positive a PPFP hanno in genere un pattern di crescita ben differenziato (follicolare o microfollicolare) al contrario di quelle negative che mostrano aspetti di scarsa differenziazione (solido o insulare). Sembra dunque di poter suggerire che l'espressione immunoistochimica di PPFP individui quelle lesioni follicolari che, ancorché in presenza di aspetti istologici benigni, siano già da considerare come potenzialmente maligne, seppur ben differenziate ³⁵. A nostro avviso la tipizzazione immunofenotipica per PPFP dei citoinclusi delle lesioni follicolari della tiroide, rappresenta la principale possibilità di applicazione diagnostica dei suddetti dati (vedi paragrafo successivo).

Diagnosi citologica pre-operatoria

Come abbiamo già osservato una percentuale compresa fra il 4% ed il 7% della popolazione è portatrice di lesioni nodulari palpabili della tiroide.

Prima della introduzione della metodica di agoaspirazione con ago sottile (fine needle aspiration: FNA) l'approccio chirurgico era l'unico in grado di stabile con sicurezza la natura di queste lesioni; il principale "inconveniente" rappresentato dal fatto che circa il 70-97% dei noduli tiroidei asportati chirurgicamente era benigno. La FNA ha radicalmente cambiato questa prospettiva: il numero delle lesioni benigne portate al tavolo operatorio si è talmente ridotto che la maggior parte dei testi di medicina interna ed endocrinologia, oggi anche negli USA, indicano nella FNA il primo esame diagnostico da utilizzare nella valutazione delle lesioni nodulari della tiroide ⁽³⁶⁾, non solo per la elevata accuratezza diagnostica ma anche perché priva di complicazioni, rapida ed in grado di ridurre il costo/paziente ³⁷.

Come ogni metodica, tuttavia, anche la FNA ha dei limiti, per comprendere i quali si accenna, di seguito, alle caratteristiche essenziali da valutare in un preparato citologico. Premesso che l'inquadramento clinico (valutazio-

TABELLA IV – Espressione di PPFP nei tumori della tiroide

Riferimento bibliografico	Noduli iperplastici	Adenomi follicolari	TFIMP	Carcinomi Follicolari	Adenomi ossifili	Carcinomi Ossifili	Carcinomi Papillari	Carcinomi Anaplastici
Kroll et al (29)	0/10	0/20	-	5/8 (63%)	-	-	0/10	-
Marques et al (cfr 34)	-	5/16 (31%)	-	7/9 (78%)	-	-	1/9 (11%)	-
Nikiforova et al (31)	0/16	2/25 (8%)	-	8/15 (53%)	0/12	0/12	0/35	0/3
Cheung et al (cfr 34)	-	6/11 (55%)	-	6/17 (35%)	-	-	-	-
Zhu et al (cfr 34)	-	-	-	-	-	-	0/76	-
Nikiforova et al (32)	-	1/23 (4%)	-	13/33 (39%)	0/13	0/19	-	-
Dwight et al (33)	-	1/20 (5%)	-	10/34 (29%)	-	-	-	0/13
Sahin et al (34)	-	4/31 (13%)	-	31/54 (57%)	-	1/23 (4%)	-	-
Arizzi et al (35)	-	8/20 * (40%)	3/3 (100%)	CFmi: 5/6 (83%) CFai: 8/16 (50%)	0/17	0/3	-	0/10
Total	0/26 (0%)	27/166 (16%)	3/3 (100%)	93/192 (48%)	0/42 (0%)	1/57 (1%)	1/130 (<1%)	0/26 (0%)

Legenda:TFIMP: tumore follicolare ad incerto potenziale di malignità (cfr voce bibliografica 19); *: alcune lesioni benigne positive a PPFP mostrano aspetti di aggressione della capsula (pur senza superamento) sovrapponibili a quelli dei tumori follicolari ad incerto potenziale di malignità; CFmi: carcinomi follicolari minimamente invasivi; CFai: carcinomi follicolari ampiamente invasivi.

ne ormonale, ecografia, ecocolor doppler e scintigrafia) deve sempre essere tenuto in considerazione, la valutazione citologica di un nodulo tiroideo poggia essenzialmente su due elementi: 1) valutazione del “fondo” e 2) valutazione della cellularità. Uno striscio riccamente cellulare con poco “fondo” (colloide e macrofagi) dovrà essere valutato con attenzione, nel sospetto di una lesione maligna. In tale contesto andranno analizzate in primo luogo le caratteristiche di aggregazione delle cellule, se cioè si dispongano in lembi, aggregati, microfollicoli, papille. Solo successivamente ci si dovrà focalizzare su caratteristiche più prettamente citologiche come la presenza di incisure e pseudoinclusi nucleari che favoriscono una diagnosi di carcinoma papillare o nuclei con rinforzo di membrana nucleare e con nucleolo evidente che favoriscono maggiormente una lesione follicolare o infine nuclei dismetrici, ipercromici o francamente atipici che favoriscono una lesione anaplastica. L'insieme di questi dati consente di fornire al clinico indicazioni circa l'istotipo della lesione in esame. Esistono tuttavia due categorie diagnostiche che non forniscono al clinico alcuna indicazione terapeutica. Queste sono rappresentate dai casi “lesione follicolare, NAS” e dai casi “inadeguati”. Alla prima categoria appartengono, a seconda delle casistiche, fra il 15% ed il 30% dei casi ^{38,40,41}. Essa è rappresentata da preparati con scarso fondo e numerose cellule disposte in microfollicoli, indicativi di una lesione

follicolare. Per la sua stessa natura la citologia non è in grado di valutare la presenza di superamento capsulare o permeazione vascolare pertanto non distingue fra lesioni follicolari benigne e maligne e, dunque, non fornisce alcuna indicazione pratica al chirurgo. A questa categoria diagnostica non esiste, a nostro avviso, alcun correttivo: il ricorso ad una valutazione intraoperatoria, seppur possibile, va riservato a quelle rare istituzioni con esperienza consolidata e rimane comunque caratterizzato da una bassa specificità, pertanto la diagnosi definitiva andrà formulata sempre sul preparato definitivo (Tab. V). Alla seconda categoria appartengono preparati citologici del tutto privi di elementi diagnostici, siano essi fondo e/o cellule. Questa categoria incide, a seconda delle casistiche, fra il 2% ed il 15% di tutti i casi. Al contrario della precedente a questa condizione si può cercare un correttivo:

- Nel sospetto di una lesione benigna, si può ripetere la FNA (eventualmente richiedendo al patologo/citologo la valutazione di adeguatezza dei preparati);
- Nel sospetto di un CP si può procedere ad una valutazione *citologica* intraoperatoria (c.d. citologia per apposizione). In questa evenienza il patologo procede ad apporre la lesione sul vetrino e a valutarne le caratteristiche citologiche: si supera in questa maniera il limite della adeguatezza mentre persiste il limite delle lesioni follicolari espresso al paragrafo precedente (Tab. V)

TABELLA V – Diagramma diagnostico in presenza di una FNA “inadeguata” o suggestivo per “Lesione follicolare, NAS”

Esame citologico	Sospetto clinico	Indicazione
Inadeguato	lesione benigna	ripetere FNA
	sospetto CP	ripetere FNA o citologia per apposizione
	sospetto CF	esame istologico definitivo
“Lesione follicolare, NAS”	sospetto CF	esame istologico definitivo

Note: FNA: fine needle aspiration; CP: carcinoma papillare; CF: carcinoma follicolare.

Se si escludono queste due condizioni i casi falsi positivi della FNA oscillano fra 0, 5% ed 1% e sono in genere causati da una non corretta interpretazione di modificazioni nucleari ed architetturali di carattere reattivo, come ad esempio quelli che si osservano nella M. di Basedow, a favore di una ipotesi di malignità; mentre i casi falsi negativi oscillano fra 5% e 10% e sono in genere dovuti ad errore nella centratura della lesione.

Diagnosi intraoperatoria

Se si debba procedere o meno all'esame istologico intraoperatorio nella valutazione di tumori della tiroide è stato ed è tuttora argomento di ampio dibattito. Scopo dell'esame intraoperatorio è fornire un orientamento diagnostico che possa guidare la procedura chirurgica. La metodica si applica anche alle lesioni della tiroide: l'esame estemporaneo deve essere in grado di discernere fra neoplasia benigna e maligna, così che il chirurgo possa procedere ad una adeguata terapia chirurgica. Tuttavia, a seguito dell'avvento della FNA, l'esame intraoperatorio non ha mai trovato ampi spazi in patologia tiroidea, a favore della stessa FNA³⁹. Questa metodica, infatti, consente al chirurgo di decidere, con ragionevole sicurezza, il tipo di intervento da eseguire prima di giungere in sala.

Come accennato nel paragrafo precedente in una percentuale compresa fra il 20% ed il 30% dei casi la FNA dà luogo ad una risposta indeterminata, ad una situazione, cioè, in cui la citologia non è in grado di differenziare fra lesioni benigne e maligne. In tale situazione si può effettivamente venire a creare un dilemma terapeutico che giustifica il ricorso ad una valutazione intraoperatoria della lesione. Tuttavia, mentre il ricorso ad apposizioni citologiche può essere utile nel suggerire un orientamento diagnostico nei casi con FNA inadeguata, consentendo, ad esempio, la diagnosi di un carcinoma papillare in cui la FNA era stata inadeguata^{42,43}, molto più difficile risulta suggerire un orientamento dia-

gnostico nei casi con FNA suggestivo per lesione follicolare. La diagnosi differenziale fra noduli iperplastici, adenomi e carcinomi follicolari fa riferimento in maniera esclusiva allo stato della capsula peri-lesionale, alla sua eventuale infiltrazione e/o presenza di permeazione vascolare⁹ ed è quindi da valutarsi esclusivamente su sezioni istologiche (la citologia per apposizione finisce per riprodurre i limiti della FNA). Una meta-analisi della letteratura indica che l'esame estemporaneo nella diagnosi differenziale fra adenomi e carcinomi follicolari è una metodica sensibile ma non specifica in quanto influenzata dal campionamento ridotto e da artefatti da congelamento^{44,45}. Rappresenta una eccezione l'esperienza della Mayo Clinic: presso questa istituzione si procede all'esame intraoperatorio di ogni pezzo operatorio, comprese le lesioni della tiroide, da oltre 50 anni; non stupisce pertanto che i valori di sensibilità e specificità si attestino rispettivamente a 84% e 100%⁴⁶.

Conclusioni

In questa ultima sezione proviamo a riassumere quanto sviluppato in precedenza, cercando di fornire indicazioni pratiche al lettore.

DIAGNOSI PRE- E PERI- OPERATORIA (CITOLOGIA AGOASPIRATIVA ED ESTEMPORANEA)

- FNA “inadeguati”: *a)* si può ripetere la FNA nel sospetto clinico di una lesione benigna; *b)* si può richiedere una valutazione citologica intraoperatoria (citologia per apposizione) nel sospetto di clinico di un CP; *c)* si deve desistere da ulteriori esami citologici ed esami istologici intraoperatori nel sospetto clinico di un CF.
- FNA suggestivo per “lesione follicolare, NAS”: ove coesista un sospetto clinico di lesione maligna, si deve desistere da ogni ulteriore indagine pre o peri operatoria ed attendere l'esame istologico definitivo.

Diagnosi post-operatoria (istologia e biologia molecolare)

- È stato suggerito di riclassificare i micro-carcinomi papillari come microtumori papillari; questa scelta, che potrebbe avere favorevoli ricadute psicologiche appare supportata dai dati di follow-up.
- È stato proposto che alcuni carcinomi estremamente ben differenziati possano essere indicati con il termine di tumore ad incerto potenziale di malignità; anche in questo caso l'impatto psicologico della diagnosi appare minore e, in prospettiva, si prospetta l'impiego di una terminologia analoga a quella già in uso in altri ambiti, c.d. lesione borderline o basso potenziale di malignità
- La stratificazione dei CP in ragione della espressione di RET/PTC potrebbe essere utile per predire il comportamento biologico della lesione ed indirizzare eventuali scelte terapeutiche.

In conclusione ci sembra di poter affermare che, anche se esistono tuttora delle zone d'ombra (che a nostro avviso possono essere ridotte al minimo dal rapporto tra clinico e patologo), sono stati fatti enormi passi in avanti in patologia tiroidea con notevoli ricadute nella diagnosi, nella terapia e nella prognosi.

Riassunto

La diagnosi dei carcinomi ben differenziati (follicolare e papillare) rappresenta uno degli argomenti oggetto di maggior dibattito nell'ambito della patologia tiroidea. Tre argomenti principali sono oggetto di discussione: 1) ruolo dell'agoaspirato e dell'esame al congelatore nella valutazione pre e peri operatoria; 2) gestione di piccole lesioni papillari; 3) classificazione patologica di quei tumori con aspetti istologici non conclusivi né per lesione follicolare né papillare. Questo lavoro si propone di affrontare quanto di nuovo è stato proposto e quanto rimane da affrontare in questi ambiti.

Esiste un generale accordo nel ritenere l'agoaspirato come il test diagnostico più accurato nell'inquadramento preoperatorio di noduli della tiroide, esistono tuttavia dei limiti, rappresentati da due categorie diagnostiche che non forniscono al chirurgo alcuna indicazione: si tratta dei casi "inadeguati" e delle "lesioni follicolari NAS". I primi possono essere ripetuti o, nel sospetto clinico di una lesione papillare, implementati da una valutazione citologica intraoperatoria (citologia per apposizione); i secondi, al contrario, dovrebbero essere rinviati all'esame istologico definitivo e l'esame intraoperatorio evitato o al massimo riservato esclusivamente a quelle istituzioni che abbiano una esperienza quotidiana con questa pratica.

La gestione di micro-carcinomi papillari (carcinoma papillari < 1 cm) individuati in maniera casuale nel contesto di una patologia tiroidea benigna rappresenta un altro argomento di discussione in quanto numerosi autori suggeriscono di non trattare ulteriormente il paziente. Questo atteggiamento ha trovato, di recente, conferma nel lavoro di un gruppo di patologi che ha proposto di considerare queste lesioni come "tumori" e non più come carcinomi.

Esiste un gruppo di carcinomi ben differenziati della tiroide in cui non risulta possibile definire con chiarezza l'istotipo (papillare o follicolare) e dunque l'atteggiamento biologico (metastasi linfatiche o ematiche) della lesione; per queste lesioni è stato proposto il termine di carcinoma ben differenziato ad incerto potenziale di malignità.

Infine va menzionato il possibile ruolo della biologia molecolare nella diagnosi dei carcinomi ben differenziati della tiroide. Infatti marcatori come RET/PTC e PAX8/PPARGamma, che sino ad ora sono stati impiegati prevalentemente in ambito di ricerca, potrebbero rappresentare, nell'immediato futuro, indagini diagnostiche (e terapeutiche) di estrema utilità.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare le Sig.re Silvana Verduci e Denise Bontempi ed il Sig. Davide Federico per la preziosa collaborazione nella raccolta dei casi.

Bibliografia

- 1) Mazzaferri EL: *Management of a solitary thyroid nodule*. N Engl J Med, 1993; 328:553-59.
- 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 Whickham survey*. Clin Endocrinol, 1977; 7:481-93.
- 3) Vander JB, Gaston EA, Dawber T: *The significance of non toxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy*. Ann Inter Med, 1968; 69:537-40.
- 4) Boone RT, Fan CY, Hanna EY: *Well-differentiated carcinoma of the thyroid*. Otolaryngol Clin N am, 2003; 36:73-90.
- 5) Lahey FH, Hare HF: *Malignancy in adenomas of the thyroid*. J Am Med Assoc, 1951; 145:689-95.
- 6) Liechty RD, Graham M, Freemeyer P: *Benign solitary thyroid nodules*. Surg Gynecol Obstet, 1965; 121:571-79.
- 7) Watkinson JC, Maisey MN: *Imaging head and neck cancer using radiofrequency: review*. J Roy Soc Med, 1988; 81:653-57.
- 8) Gharib H: *Fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules: Advantages, limitations and effects*. Mayo Clin Proc, 1994; 69:44-49.
- 9) Delellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C: *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. Lyon: IARC press, 2004.
- 10) Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM: *Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system*. Surgery, 1987; 102:1088-95.
- 11) Cady B, Rossi R: *An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma*. Surgery, 1988; 104:947-53.
- 12) Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS: *Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989*. Surgery, 1993; 114:1050-58.
- 13) Williams ED (Guest editorial): *Two proposal regarding the terminology of thyroid tumors*. Int J Surg Pathol, 2000; 8:181-83.
- 14) Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL: *Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms*. Mod Pathol, 1996; 9:816-20.
- 15) Rosai J, Livolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED: *Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal*. Int J Surg Pathol, 2003; 11:249-51.
- 16) Rosai J, Carcangiu ML, Delellis RA: *Tumors of the thyroid gland*. 3rd ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology.

- 17) Rosai J: *Rosai and Ackerman's surgical pathology*. 9th ed.
- 18) Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G: *PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo human thyroid papillary carcinomas*. Cell 1990; 60:557-63.
- 19) Schneider R: *The human proto-oncogene ret: a communicative cadherin?* Trends Biochem Sci, 1992; 17:460-9.
- 20) Pachnis V, Mankoo B, Costantini F: *Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis*. Development, 1993; 119:1005-17.
- 21) Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, Carcano C, Ferraresi G, Arighi E, Mondellini P, Della Porta G, Pierotti MA: *Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase*. Mol Cell Biol, 1993; 13:358-66.
- 22) Santoro M, Melillo RM, Grieco M, Berlingieri MT, Vecchio G, Fusco A: *The TRK and RET tyrosine kinase oncogenes cooperate with ras in the neoplastic transformation of a rat thyroid epithelial cell line*. Cell Growth Diff, 1993; 4:77-84.
- 23) Fischer AH, Bond JA, Taysavang P, Battles OE, Wynford-Thomas D: *Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure*. Am J Pathol, 1998; 153:1443-450.
- 24) Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA: *Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children*. Cancer Res, 1997; 57:1690-694.
- 25) Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP, Negele T, Spelsberg F, Lengfelder E, Werner M, Bauchinger M: *Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus*. Int J Cancer, 1999; 80:32-38.
- 26) Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S: *Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications*. Clin Cancer Res, 2000; 6:1093-103.
- 27) Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M, Salvatore G, Chiappetta G, Pacini F, Elisei R, Miccoli P, Pinchera A, Fusco A, Santoro M: *Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma*. Am J Pathol, 2002; 160:247-54.
- 28) Tallini G, Asa SL: *RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma*. Advances in Anatomic Pathology, 2001; 8:345-54.
- 29) Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA: *PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma*. Science, 2000; 289:1357-360.
- 30) Gregory Powell J, Wang X, Allard BL, Sahin M, Wang XL, Hay ID, Hiddinga HJ, Deshpande SS, Kroll TG, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B: *The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition*. Oncogene, 2004; 23:3634-41.
- 31) Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE: *PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analysis*. Am J Surg Pathol, 2002; 26:1016-23.
- 32) Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE: *RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88:2318-326.
- 33) Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J: *Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88:4440-445.
- 34) Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XI, Hay ID, Zhao Y, Goellner Jr, Sebo TJ, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B: *PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value*. J Clin Endocrinol Metab, 2005; 90:463-68.
- 35) Arizzi C, Di Tommaso L, Midolo V, Pizzocaro A, Franchi G, Destro A, Cozzaglio L, Travaglini P, Bosari S, Roncalli M: *Significato diagnostico di PPARγ e Galectina 3 nei tumori ben differenziati della tiroide*. Pathologica, 2005; 97:266-67.
- 36) Wortofsky L: *Disease of the thyroid*. In: Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K (eds): *Harrison's principles of internal medicine*. 14th ed. New York: McGraw-Hill.
- 37) Caplan RH, Kissen WA, Strutt PJ, Wester SM: *Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. A cost-effective diagnostic plan*. Postgrad Med, 1991; 90:183-7.
- 38) Gharib H, Goellner JR, Johnson DA: *Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11, 000 biopsies*. Clin Lab Med, 1993; 13:699-709.
- 39) Soderstrom N.: *Puncture of goiters for aspiration biopsy*. Acta Med Scand; 1952; 144:237-44.
- 40) Hermus AR, Huysmans DA: *Treatment of benign nodular thyroid disease*. N Engl J Med, 1998; 338:1438-447.
- 41) Gharib H, Goellner JR, Zinsmeister AR, Grant CS, Van Heerden JA: *Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. The problem of suspicious cytologic findings*. Ann Intern Med, 1984; 101:25-28.
- 42) Pluot M, Faroux MJ, Rain J, Patey M, Mallais T, Simatos A: *Imprint cytology in the diagnosis of tumors of the thyroid*. Arch Anat Cytol Pathol, 1989; 37:36-39.
- 43) Taneri F, Poyraz A, Salman B, Tekin E, Akyurek N, Bayram O, Onuk E: *Using imprint and frozen sections in determining the surgical strategies for thyroid pathologies*. Endocrine Regulations, 2001; 35:71-74.
- 44) Leteurtre E, Leroy X, Pattou F, Wacrenier A, Carnaille B, Proye C, Lecomte-Houcke M.: *Why do frozen sections have limited value in encapsulated or minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid?* Am J Clin Pathol, 2001; 115:370-74.

- 45) Miltenburg DM, Prost HM, Graviss EA, Arem R: *The role of frozen section, gender, age, and tumor size in the differentiation of follicular adenoma from carcinoma: a meta-analysis*. Surgery, 2000; 128:1075-146.
- 46) Paphavasit A, Thompson GB, Hay ID, Grant CS, Van Heerden JA, Ilstrup DM, Schleck C, Goellner JR: *Follicular and Hurthle cell thyroid neoplasms. Is frozen-section evaluation worthwhile?* Arch Surg, 1997; 132:674-80.