

Università degli Studi di Genova  
Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche  
Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia



*“Valore prognostico dell'Ipovitaminosi D nelle Neoplasie  
Neuroendocrine”*

**RELATORE:**

C.mo Prof. Diego Ferone

**CO-RELATRICE:**

C.ma Prof.ssa Manuela Albertelli

**CANDIDATO:**

Riccardo Salzillo

Anno accademico 2020-2021



# INDICE

---

INTRODUZIONE.....	4
1.1. Neoplasie Neuroendocrine (NEN) .....	4
1.1. Gastro-Entero-Pancreatici (GEP).....	4
1.2. Neoplasie Neuroendocrine Toraciche .....	24
1.2. NEN Occulti.....	29
1.2. Vitamina D.....	39
2.1. FISILOGIA E PRODUZIONE.....	40
2.2. EFFETTI DELLA VITAMINA D .....	43
2.3. SUPPLEMENTAZIONE VIT. D.....	45
1.3. Background .....	47
3.1. IPOVITAMINOSI D: conseguenze tumorali.....	47
3.2. IPOVITAMINOSI D: risvolti sui NEN.....	49
MATERIALI & METODI .....	54
1.4. SCOPO dello STUDIO .....	54
1.5. Raccolta Dati.....	54
1.6. Criteri di Inclusione ed Esclusione.....	54
1.7. Protocollo di Valutazione dei Livelli Vit.D .....	55
1.8. Analisi Statistica.....	55
RISULTATI.....	57
CONCLUSIONI.....	64
Bibliografia .....	67
INDICE DELLE FIGURE .....	79
INDICE DEI GRAFICI.....	79
INDICE DELLE TABELLE.....	79
RINGRAZIAMENTI .....	80

# INTRODUZIONE

---

## **1. NEOPLASIE NEUROENDOCRINE (NEN)**

Le neoplasie neuroendocrine (NEN) originano dal sistema neuroendocrino diffuso e, pertanto, possono insorgere in qualsiasi distretto corporeo: apparato digerente, torace, avere localizzazioni multiple oppure essere occulti (1).

Le NEN sono abitualmente considerate neoplasie rare se confrontate in termini di incidenza con le corrispondenti neoplasie non-neuroendocrine. La loro frequenza, tuttavia, è notevolmente aumentata negli ultimi decenni, come riportato da studi epidemiologici eseguiti sui registri SEER negli Stati Uniti, che riportano un aumento da 1 a 5 nuovi casi/100.000 abitanti/anno.

### **1.1. Gastro-Entero-Pancreatiche(GEP)**

#### Introduzione

Le Neoplasie Neuroendocrine Gastro-Entero-Pancreatiche (GEP-NEN) rappresentano il tipo di NEN più comune, rappresentando da sole i due terzi della malattia.

In considerazione della più favorevole prognosi delle GEP-NEN rispetto alle neoplasie non-neuroendocrine, la prevalenza delle GEP-NEN è di 35 casi/100.000 abitanti, cioè subito dopo quella dell'adenocarcinoma del colon-retto e prima di tutti gli altri adenocarcinomi del tratto gastroenterico (1). In Italia non sono disponibili dati epidemiologici accurati, non essendoci registri tumorali riguardanti le NEN. I principali fattori prognostici negativi delle NEN sono la sede del tumore primitivo (le NEN pancreatiche hanno in genere una prognosi peggiore rispetto a quelle intestinali), lo stadio secondo il TNM, la classificazione istopatologica OMS, che esprime sia l'aspetto morfologico del tumore sia la sua attività proliferativa in termini di numero di mitosi o indice di proliferazione (Ki67) (2-6). Esso non solo correla significativamente con la sopravvivenza globale, ma anche con la progressione della malattia nei pazienti con NEN pancreatiche (PanNEN) in fase avanzata (7,8), e con la recidiva tumorale nei pazienti sottoposti a chirurgia curativa per PanNEN (9).

Ulteriori fattori prognostici sono rappresentati dalla espressione dei recettori della somatostatina (che predice un comportamento clinico più favorevole rispetto alla non espressione), dalla velocità di evoluzione spontanea del tumore e dall'età del paziente.

Sul piano clinico le GEP-NEN vengono comunemente distinte in funzionanti e non funzionanti, in relazione alla presenza o meno di una sindrome clinica correlata alla produzione ed immissione in circolo di una o più sostanze ormonali.

#### Diagnosi, classificazione, inquadramento morfologico e funzionale

Nella maggior parte dei casi la diagnosi anatomico-patologica di GEP-NEN può essere posta anche da patologi non dedicati; per i casi dubbi è raccomandata la revisione da parte di un panel di esperti patologi all'interno di gruppi multidisciplinari di diagnosi e cura (1,2). Il percorso diagnostico istologico è indicato nella classificazione OMS del 2019 (35) sintetizzata in tabella 1.

Le GEP NEN sono tutte potenzialmente maligne (3). La classificazione OMS 2019, riprendendo il rationale delle precedenti classificazioni del 2017 e del 2019, indica che siano classificate in base a sede, grado di differenziazione, grado di malignità e stadio di malattia (oltre alla eventuale caratterizzazione della produzione ormonale), definendo i criteri applicativi per il successivo iter diagnostico (3-6,35) (Tab. 1).

Tabella 1: Classificazione OMS 2019

Diagnosi	Grado	Indice Mitotico	Ki67%	Differenziazione
1.Tumore neuroendocrino (NET)	1	<2/10HPF	≤ 2%	Ben differenziato
2.Tumore neuroendocrino (NET)	2	2-20/10HPF	3-20%	Ben differenziato
3.Tumore neuroendocrino (NET)	3	>20	>20%	Ben differenziato
3.Carcinoma neuroendocrino (NEC)		>20/10 HPF	>20%	
4.Neoplasie miste non neuroendocrine** – neuroendocrine (MiNEN)	-	-	-	Poco differenziato Ben differenziato <sup>o</sup>
5.Lesioni iperplastiche e pre-neoplastiche	-	-	-	-

<sup>o</sup>in rarissimi casi la componente neuroendocrina può corrispondere a forme di NET G1 o G2 (7); In considerazione della maggiore frequenza dell'associazione con la componente NEC e soprattutto in virtù del maggior peso nel guidare la prognosi da parte di questa componente è consigliabile l'uso della definizione MANEC in associazione alla nuova sigla MiNEN

\*\*la componente non neuroendocrina non deve essere necessariamente di tipo ghiandolare (7) (adenoma e/o adenocarcinoma), nel pancreas è frequente l'associazione con il carcinoma acinare (8) e nelle zone di passaggio esofago-gastrico ed ano-rettale è frequente l'associazione con il carcinoma squamoso (7).

Le GEP NEN si distinguono in “tumori” e “carcinomi” (Tab. 1)

I NET hanno pattern morfologico, “*organoide*” (a nidi, trabecole oppure solido) con rarissime atipie; i NET vengono distinti in tre categorie prognostiche: NET G1, NET G2 e NET G3 esclusivamente grazie alla conta mitotica e/o alla valutazione del valore percentuale dell'espressione immunohistochimica del Ki67.

I NEC presentano *crescita diffusa, solida*, con estesa *necrosi* e numerose *atipie citologiche* e sono distinti in due sottogruppi morfologici, a piccole ed a grandi cellule (14-17).

Le definizioni derivanti dalla classificazione OMS 2019 devono essere necessariamente integrate e completate dalla definizione dello stadio TNM (estensione dell'invasione neoplastica) (2, 9, 10, 18-22, 44).

L'identificazione del fenotipo neuroendocrino prevede l'impiego di marcatori immunohistochimici capaci di definire la natura neuroendocrina della neoplasia: Cromogranina A (CgA) e Sinaptofisina (SIN). I restanti marcatori generali neuroendocrini CD56 (N- CAM), PGP 9.5, NSE (enolasi neurone specifica) sono poco affidabili e riproducibili, nelle condizioni in cui la natura neuroendocrina della neoplasia è sostenuta solo da uno di questi in assenza di convincente positività almeno per sinaptofisina è opportuno discutere il caso nell'ambito di un board multidisciplinare

Tabella 2: Marcatori per la caratterizzazione delle GEP NEN

Ruolo del marcatore	Tipo di marcatore
Diagnostico di NEN	SIN, CgA
Distribuzione nei NET	SIN e CgA espresse nel 100% delle cellule neoplastiche
Distribuzione di NEC	SIN nel 100% delle cellule neoplastiche; CgA presente ma in % inferiori al 100% delle cellule neoplastiche
Indicativo di sede primitiva*	CDX2, Islet-1, TTF1
Prognostico (per il <i>grading</i> )	Ki67
“Predittivo” (per terapia con analoghi somatostatina)	Recettore somatostatina sottotipo 2A (sstr-2A)
Genetico	geni di MEN1, VHL, TSC, NF1

\*: solo nei NET. CDX2, Islet1 e TTF1, possono essere espressi nei NEC, con percentuale variabile, in tutte le varie sedi dell'apparato digerente.

I NEC preservano la positività per SIN ma possono mostrare espressione ridotta di CgA. L'iter diagnostico morfologico ed immunoistochimico per la NEN scarsamente differenziate presentano caratteri morfologici ed immunoistochimici che apparentano alla grande famiglia dei tumori solidi a piccole cellule blu, è opportuno in casi dubbi ricorrere anche a tecniche FISH e PCR per la definizione del corretto fenotipo tumorale (26).

Ancorché la secrezione ormonale non sia sinonimo di sindrome ormono-correlata e non rappresenti pertanto prova di funzionalità della NEN, la definizione del profilo di produzione ormonale (insulina, glucagone, somatostatina, polipeptide intestinale vasoattivo, gastrina, serotonina, calcitonina) è un utile complemento alla diagnosi (soprattutto per NEN pancreatiche e duodenali).

Per definire l'origine di un NET a primitività occulta possono essere utili fattori trascrizionali quali TTF-1 (origine polmonare) (27), CDX-2 (origine gastroenteropancreatica, con espressione più intensa ed estesa per le sedi intestinali) (28), Islet-1 (origine pancreatica) (29). Le informazioni ottenute dall'uso di questi marcatori vanno comunque interpretate in un contesto clinico appropriato in considerazione del fatto che l'affidabilità dell'espressione di questi fattori di trascrizione è inversamente proporzionale al grado di differenziazione della NEN, infatti sono descritte espressioni aberranti di TTF-1 (27), Islet1(30) e CDX-2 (31) in forme scarsamente differenziate di sedi extrapolmonari o extraintestinali.

La ricerca immunoistochimica dei SSTR è considerata opzionale, è ristretta al sottotipo 2 (SSTR-2) ed eventualmente al 3 e 5, che sono i recettori bersaglio di octreotide e lanreotide, è consigliato l'uso di anticorpi monoclonali ed interpretata come positiva in presenza di un *pattern* di reattività di membrana per la cui valutazione è consigliabile l'uso di *score*, secondo proposte pubblicate e validate (32).

La recente classificazione OMS 2019 identifica le GEP NENs, in funzione degli aspetti morfologici istopatologici e dell'attività proliferativa del tumore, espressa come grading (G).

Il grading rende conto dell'indice proliferativo del tumore, inteso come numero di mitosi su 10 campi ad alto ingrandimento (HPF, *High Power Field*, con ingrandimento minimo 40X) o, meglio, come valore di Ki67, parametro immunoistochimico che si ottiene

misurando la percentuale di cellule positive all'anticorpo MIB-1 su 500-2.000 cellule, valutato nell'area di maggiore marcatura nucleare.

Lo schema prevede la valutazione della conta mitotica e dell'indice di proliferazione con Ki67 (utilizzando l'anticorpo monoclonale MIB1) per definire tre gradi di differenziazione della NEN: NET G1, NET G2, NET G3 (quest'ultima categoria discussa sotto in dettaglio) e NEC.

Il cut-off proposto per distinguere NET G1 rispetto a NET G2 è di 2 mitosi /10 HPF e 3% di indice Ki67. Una conta mitotica superiore a 20/10HPF e un indice Ki67 superiore a 20% definisce i NEC (9, 10).

Si raccomanda di contare le mitosi in 40 HPF in aree di maggiore densità mitotica, e di valutare il Ki67 contando 500-2000 nuclei in aree di maggiore proliferazione (9, 10).

I suddetti principi proposti inizialmente nella classificazione OMS 2010 sono stati parzialmente modificati (vedi dettagli sotto) nella classificazione del 2017 (11). Il risultato delle modifiche apportata alla classificazione OMS 2010 nella versione 2017 è condensato e recepito nella la classificazione OMS 2019 (35).

Di seguito le principali modifiche:

- valore di *cut-off* di Ki67 tra NET G1 e G2 dal 2% al 3%;
- categoria NET G3, caratterizzata da neoplasie ben differenziate ma ad indice proliferativo Ki67 superiore al 20%. La categoria dei NET G3 include neoplasie neuroendocrine caratterizzate da elevata attività proliferativa, ma morfologia ben differenziata, tipica dei NET. La necessità di individuare questo nuovo sottogruppo è nata dall'osservazione di un andamento clinico più favorevole e una differente risposta alle terapie mediche di questo sottogruppo di pazienti rispetto ai pazienti con neoplasia scarsamente differenziata.

Neoplasie miste MiNEN (*mixed neuroendocrine-non neuroendocrine neoplasm*). Vengono considerate tali le neoplasie nelle quali le due componenti, neuroendocrina e non-neuroendocrina, siano rappresentate entrambe in almeno il 30% delle cellule tumorali (7). Il termine MiNEN nasce dalla necessità di considerare la rara eventualità in cui la componente neuroendocrina sia di tipo ben differenziato. È tuttavia consigliabile, nei casi di gran lunga più frequente di neoplasia mista con NEC, associare al nuovo

termine il precedente MANEC; è infatti di peso troppo rilevante il valore predittivo sull'outcome clinico della componente NEC; sarebbe opportuno esplicitare anche il valore di Ki-67 % della componente NEC risultato il più potente predittore indipendente di sopravvivenza nei pazienti affetti da MANEC (36)

La stadiazione delle NEN sottoposte a intervento chirurgico radicale segue lo schema del sistema TNM pubblicato dalla UICC/AJCC (7° edizione) per le singole sedi (stomaco, ileo, appendice, colon-retto, pancreas) (19, 20, 22). L'ENETS ha pubblicato un sistema di stadiazione per le NEN delle diverse sedi che è in parte simile a quello dell'UICC, mentre si discosta da questo per le localizzazioni gastriche, appendicolari e pancreatiche (10).

Recenti evidenze indicano che la stadiazione secondo ENETS delle NEN pancreatiche risulta superiore allo schema UICC nella possibilità di stratificare i pazienti in gruppi prognosticamente significativi (9). In sede appendicolare, entrambi gli schemi di stadiazione correlano con la sopravvivenza, e lo schema UICC appare lievemente superiore in termini di significatività statistica (34).

In assenza di studi clinici che dimostrino quale sia il sistema di stadiazione maggiormente informativo in termini prognostici è consigliabile applicare entrambi gli schemi.

Negli scorsi anni è stata posta molta enfasi sulla diagnosi biochimica delle NEN, per la convinzione che questi tumori fossero caratterizzati da una peculiare attività secernente e da una specifica sindrome clinica correlata.

In realtà, la letteratura scientifica più recente ha ridimensionato notevolmente il concetto di diagnosi biochimica di queste malattie, anche in relazione al consistente numero di falsi positivi di alcuni *dei markers* tumorali più diffusi (37).

In particolare, dunque, la diagnostica di laboratorio mantiene un suo ruolo clinicamente rilevante nelle seguenti condizioni:

- Nella “sindrome da carcinoide”, il marker tumorale specifico è il dosaggio nelle urine delle 24 ore dell'acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA). L'accuratezza di questo marker è elevata quando il valore è almeno doppio rispetto al cut-off massimo (valore almeno doppio rispetto a quello massimo normale) (38). E' indispensabile, per evitare falsi positivi significativi, che il paziente rispetti precise indicazioni dietetiche prima di raccogliere il campione (evitare ananas, banane, kiwi, prugne, frutta secca, frutta esotica, bevande alcoliche, formaggi

stagionati, fumo). Con tali accortezze, il test ha una sensibilità di circa il 70% e una specificità fino al 100%. Non è consigliabile un suo utilizzo di *screening* nell'approccio al paziente con diarrea in assenza di una diagnosi di NEN.

- Nella diagnosi di ZES associata al gastrinoma, livelli elevati di gastrinemia basale si riscontrano nel 98-99% dei pazienti (38). La gastrinemia basale maggiore di 10 volte rispetto al valore massimo normale si osserva nel 40% circa dei pazienti e tale riscontro è altamente indicativo della presenza di una ZES. Una maggiore accuratezza diagnostica si ottiene eseguendo il test alla secretina, ovvero effettuando dosaggi seriati di gastrinemia dopo stimolo sottocutaneo con secretina (0.4 ug/Kg). Un incremento dopo stimolo di almeno 120 pg/ml è indicativo di ZES (sensibilità 94%, specificità 100%). Possibili falsi positivi nel dosaggio di gastrinemia basale (ma non di gastrinemia dopo stimolo secretinico) sono l'uso di inibitori della pompa protonica e la presenza di una gastrite cronica atrofica.
- Nella diagnosi di insulinoma, la combinazione di elevati livelli di insulinemia associati a ipoglicemia (< 45 mg/dl), ed elevati valori di C-peptide (> 200 pmol/L) è suggestiva di sindrome da insulinoma. Il test del digiuno con misurazione dei tre parametri suddetti in un periodo di 72 ore consente di raggiungere un'accuratezza diagnostica del 100%.
- Nella diagnosi di glucagonoma viene raccomandata la valutazione della glicemia ed il dosaggio del glucagone, che deve essere inappropriatamente elevato (> 500-1000 pg/ml). Livelli inferiori di glucagone si possono associare a cirrosi, pancreatite, diabete mellito, digiuno prolungato, sepsi, ustioni, insufficienza renale, iperglucagonemia familiare ed acromegalia.

A fronte dei suddetti markers specifici, la Cg-A è considerata il principale marker generico, ovvero utilizzabile indipendentemente dalla presenza di una attività secernente specifica del tumore e dalla eventuale sindrome correlata, essendo valida anche per le NEN non funzionanti.

Si tratta di una glicoproteina presente nei granuli citoplasmatici di tutte le cellule neuroendocrine diffuse nell'organismo, la cui accuratezza diagnostica varia molto in funzione del tipo di tumore, dell'estensione della malattia, e del tipo di metodica utilizzata

per il dosaggio. La sensibilità oscilla tra il 70% e il 90% (38), la specificità varia notevolmente e risente di numerosi possibili falsi positivi, tra i quali la gastrite cronica atrofica del corpo-fondo gastrico, l'infezione da *Helicobacter pylori*, l'utilizzo di inibitori della pompa protonica, le malattie infiammatorie croniche, l'ipertensione arteriosa non controllata. A causa dei numerosi e frequenti possibili falsi positivi, e delle diversità metodologiche nella misurazione plasmatica della CgA, questo *marker* non dovrebbe essere utilizzato come *screening* nell'approccio a pazienti che presentano generici sintomi gastrointestinali che solo eccezionalmente sono riferibili alla presenza di una NEN. L'uso della CgA è, infatti, limitato ai pazienti con una diagnosi documentata di NEN per monitorare l'andamento della malattia durante il follow-up e la risposta alla terapia medica (39).

La cellula neuroendocrina offre diversi target per lo studio funzionale medico nucleare. Infatti, ad oggi sono disponibili sia radiofarmaci che si legano a recettori cellulari (in particolare i recettori per la somatostatina, SSTR) sia radiofarmaci metabolici.

La prima metodica medico nucleare recettoriale impiegata con successo per lo studio delle NEN è stata la scintigrafia con <sup>111</sup>In-pentetreotide o OctreoScan® (SRS, somatostatin receptor scintigraphy), che sfruttando un radiofarmaco recettoriale ha permesso la dimostrazione in vivo della presenza di recettori per la somatostatina sulle cellule dei NET. L'introduzione della SRS ha completamente rivoluzionato l'approccio diagnostico dei NET grazie alla superiore accuratezza rispetto alle metodiche di imaging morfologico. Tuttavia la SRS è stata ampiamente superata nell'ultimo decennio da più moderne tecnologie, in particolare dalla PET/CT e, in misura minore, dalla SPECT/CT, grazie alla superiore performance diagnostica. In particolare, la PET/CT, grazie alla superiore risoluzione spaziale ed alla possibilità di poter acquisire immagini con radiofarmaci sia recettoriali che metabolici, permette una caratterizzazione biologica completa della malattia. In particolare, nelle NEN ben differenziate, la presenza dei recettori della somatostatina è messa in evidenza mediante l'impiego di radiofarmaci analoghi della somatostatina marcati con <sup>68</sup>Gallio (<sup>68</sup>Ga), risultando una metodica imprescindibile prima di iniziare la terapia radiometabolica (PPRT).

Infatti le cellule delle NEN, in particolare le forme ben differenziate, esprimono i SSTR, soprattutto il sottotipo 2 (SSTR-2).

Le indicazioni allo studio funzionale medico-nucleare delle GEP NEN sono la stadiazione (caratterizzazione del primitivo e delle lesioni metastatiche linfonodali e a distanza), la localizzazione del tumore primitivo ignoto in pazienti con metastasi neuroendocrine accertate, la dimostrazione in vivo dell'espressione dei SSTR sulle cellule neuroendocrine (per la pianificazione terapeutica con analoghi caldi o freddi della somatostatina), la ristadiazione post-terapia.

Utilizzando invece radiofarmaci metabolici la PET/TC permette anche la valutazione del metabolismo glucidico (indice di aggressività tumorale) mediante l'impiego del 18F-FDG o di quello delle amine biogene nel caso della 18F-DOPA.

L'<sup>111</sup>In-pentetreotide è stato il primo radiofarmaco approvato per l'imaging delle NEN mediante SRS. Le linee guida della società europea di medicina nucleare (EANM) definiscono gli aspetti procedurali per l'acquisizione delle immagini (40-44).

La distribuzione fisiologica del radiofarmaco impiegato dalle metodiche scintigrafiche comprende la milza, il fegato e i reni, insieme ad una variabile visualizzazione di ipofisi, tiroide, vescica e intestino. Le immagini devono essere interpretate alla luce delle informazioni cliniche, anche se, in generale, le aree che mostrano una captazione superiore alla normale distribuzione nel fegato sano sono classificate come positive.

Possibili fonti di false positività includono aree di infiammazione e flogosi mentre le false negatività sono ascrivibili principalmente a lesioni sub-centimetriche (soprattutto in assenza di acquisizioni SPECT/TC), i reperti patologici in sedi di fisiologica biodistribuzione (il radiofarmaco usato nella scintigrafia presenta elevata fissazione a carico del fegato e dell'intestino, frequenti sedi di localizzazione delle NEN) o nel caso di reperti patologici che esprimono i SSTR in maniera bassa o variabile (forme scarsamente differenziate, neuroblastoma, feocromocitoma, insulinoma).

La sensibilità della SRS nelle GEP NEN varia dal 75 al 100% (44-49). Data la loro eterogeneità, le NEN in generale possono essere classificate in tumori ad alta sensibilità (sensibilità della scintigrafia recettoriale >75%), come ad esempio le forme ipofisarie, GEP, i paragangliomi, i carcinomi polmonari a piccole cellule, e tumori a sensibilità intermedie (sensibilità della scintigrafia recettoriale compresa tra 40 e 75%), come l'insulinoma, il carcinoma midollare della tiroide, e il feocromocitoma (50).

La PET/TC con radiofarmaci beta-emittenti (marcati con <sup>68</sup>Gallio) analoghi della somatostatina (<sup>68</sup>Ga-DOTA-peptidi) rappresenta la metodica di scelta per lo studio

funzionale medico-nucleare delle NEN. I tre analoghi più comunemente usati sono DOTA-Tyr3-octreotide (DOTA-TOC), DOTA-Tyr3-octreotate (DOTA-TATE) e DOTA-Nal3-octreotide (DOTA-NOC). Tutti i sopracitati radiofarmaci presentano buona affinità per i SSTR-2 (soprattutto il DOTA-TATE) mentre solo il DOTANOC presenta un'affinità anche per i SSTR-3 e 5. Dal punto di vista clinico, tuttavia, non vi sono evidenze che dimostrino che, a queste differenze di affinità recettoriale, corrispondano significative differenze cliniche. Pertanto, nella pratica clinica, questi radiofarmaci vengono usati indifferentemente (tuttavia si rammenta che i valori del SUVmax non sono direttamente confrontabili).

La PET/TC con <sup>68</sup>Ga-DOTA-peptidi offre diversi vantaggi rispetto alla scintigrafia convenzionale (51-52):

- più elevata risoluzione spaziale (soprattutto rispetto alla scintigrafia convenzionale, che non permette la caratterizzazione di lesioni di dimensioni inferiori al cm, mentre è doveroso ricordare come tale vantaggio sia di entità più ridotta se si considerano i nuovi tomografi SPECT/CT);
- più favorevole biodistribuzione dei radiofarmaci PET rispetto a quelli impiegati per la scintigrafia (minor fissazione a livello epatico ed intestinale, frequenti sedi di insorgenza di NEN).
- analisi semi-quantitativa dell'entità della fissazione del radiofarmaco a carico delle lesioni; questa viene effettuata usualmente mediante stima del SUVmax (maximum standardised uptake value) che permette, a parità di radiofarmaco impiegato, di effettuare confronti diretti delle variazioni della fissazione nel tempo;
- minor tempo di esecuzione (di circa 2 ore per la PET/CT rispetto alle acquisizioni a 4-24 ore per la scintigrafia convenzionale).

Le indicazioni all'impiego della PET/TC con <sup>68</sup>Ga-DOTA-peptidi includono la stadiazione, la ricerca del tumore primitivo occulto in pazienti con metastasi accertate, la ristadiazione e la selezione dei pazienti candidabili alla terapia con analoghi della somatostatina (freddi o PRRT). Le linee guida per l'esecuzione della PET/TC con <sup>68</sup>Ga-DOTA-peptidi sono state pubblicate dall'EANM (52).

La biodistribuzione comprende l'ipofisi, la milza (ed eventuali milze accessorie), i surreni, reni e vie escrettrici, fegato, intestino. Falsi positivi alla PET con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidi nello studio di pazienti con NEN sono rappresentati da varianti fisiologiche (es. ipertrofia prostatica, ciclo uterino), processi di natura infettivo-infiammatoria (es. sarcoidosi, tubercolosi, esiti chirurgici, etc..) e neoplasie che presentano espressione dei SSTR (es. linfoma, melanoma, carcinoma epatocellulare, carcinoma della mammella, etc..). Falsi negativi sono rappresentati soprattutto da lesioni di dimensioni inferiori al potere di risoluzione della PET/TC (circa 5mm) e forme oncologiche neuroendocrine con bassa o variabile espressione dei SSTR (carcinoma midollare della tiroide, neuroblastoma, feocromocitoma, neuroblastoma) o che si localizzano nelle sedi di biodistribuzione.

Per la dimostrazione in vivo della presenza dei SSTR, presupposto necessario per intraprendere terapie target (con analoghi freddi o caldi), la PET/TC con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidi rappresenta ad oggi la metodica di scelta sebbene, laddove non disponibile, anche la scintigrafia possa essere impiegata, tenendone tuttavia presente i ben noti limiti.

I radiofarmaci PET di uso clinico che marcano il metabolismo delle cellule neuroendocrine sono rappresentati dalla  $^{18}\text{F}$ -DOPA (la cui captazione riflette il metabolismo delle amine biogene) e dal  $^{18}\text{F}$ -FDG (la cui captazione corrisponde al metabolismo glucidico cellulare). Molti altri radiofarmaci sono stati impiegati per lo studio delle NEN, ma, date le difficoltà di sintesi e la buona accuratezza diagnostica dei composti già impiegati correntemente, questi radiofarmaci alternativi non vengono routinariamente impiegati.

Si rammenta tuttavia che la fisiologica distribuzione della  $^{18}\text{F}$ -DOPA a livello pancreatico limita la possibilità di studiare tumori in questa sede. Inoltre, data la riportata inferiorità della  $^{18}\text{F}$ -DOPA rispetto alla PET/CT con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidi nello studio delle NEN che esprimono i SSTR e le difficoltà tecniche della sua sintesi, il suo impiego clinico è principalmente rivolto allo studio di forme NEN caratterizzate da bassa/variabile espressione dei SSTR (neuroblastoma, feocromocitoma, carcinoma midollare della tiroide) o che si localizzano in sede di fisiologica biodistribuzione dei  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidi.

La sensibilità della PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG PET per le NEN G1-G2 è generalmente bassa (58%, studio prospettico su 96 pazienti), in quanto le cellule tumorali neuroendocrine ben

differenziate sono caratterizzate da un basso metabolismo glucidico. Al contrario, le NEN G3 presentano un'elevata avidità per l'FDG.

L'impiego della PET/TC con 18F-FDG assume nei pazienti con NEN, così come negli altri setting oncologici, valore prognostico, potendo identificare la presenza di cloni sdifferenziati che determinano l'outcome del paziente. Tuttavia non esiste al momento accordo internazionale su quando e quanto spesso effettuare la PET con FDG nei pazienti con forme NEN ben differenziate (53) mentre se ne raccomanda l'impiego nelle forme sdifferenziate e nei carcinomi neuroendocrini.

### Terapie con analoghi della somatostatina

Gli analoghi della somatostatina (SSA) rappresentano la terapia elettiva nei tumori endocrini gastroenteropancreatici sia funzionanti che non funzionanti (54,55). In Italia gli SSA approvati e in uso clinico sono l'octreotide e il lanreotide; hanno elevata affinità per 2 dei 5 recettori noti della somatostatina (sstr-2 e sstr-5) e sono disponibili nella forma a rapido rilascio (octreotide sottocute) ed in quella a lento rilascio (octreotide intramuscolare *long acting repeatable*, LAR – lanreotide soluzione iniettabile in siringa pre-riempita). Sono chiamati “analoghi freddi”, per distinguerli dalla terapia con analoghi radiomarcati (definiti “caldi”).

La formulazione di Octreotide LAR ha dosaggi da 10, 20 e 30 mg, e viene somministrata per via intramuscolare una volta ogni 4 settimane (56). La formulazione di Lanreotide *preparazione iniettabile* ha dosaggi da 60, 90 e 120 mg e viene somministrata per via sottocutanea profonda una volta ogni 4 settimane (57). Le dosi ormai convenzionalmente utilizzate sono Octreotide LAR 30 mg e Lanreotide 120 mg fiale.

Circa il 40% delle sindromi da carcinoide in trattamento con la massima dose di SSA a lento rilascio non è completamente controllata. In questi casi possono essere presi in considerazione un aumento della dose, una riduzione degli intervalli di somministrazione o l'aggiunta di octreotide sottocute (*rescue*) (58).

Gli effetti collaterali degli SSA sono rari e includono diarrea, bradicardia, iperglicemia, ipotiroidismo, colelitiasi.

In generale gli SSA producono miglioramento della sintomatologia clinica in oltre il 60% dei casi, stabilizzazione della crescita tumorale nel 30-50% e una regressione parziale del tumore in rarissimi casi. In clinica esiste un'ampia evidenza retrospettiva, soprattutto su GEP-NEN (59) o forme polmonari (60), di stabilizzazione di tumori in progressione al basale. Altri dati vengono da studi retrospettivi monocentrici di NEN del piccolo intestino (61) o ampie casistiche epidemiologiche su NEN di varia origine (62), da cui sembra emergere anche un impatto sulla sopravvivenza.

### Terapia radiorecettoreale nelle GEP NEN

La terapia radiorecettoreale (peptide receptor radionuclide therapy, PRRT) è un approccio terapeutico innovativo per il trattamento delle GEP NEN non resecabili radicalmente o metastatiche, che si basa sul targeting specifico delle cellule tumorali che sovra-esprimono i SSTR, mediante peptidi SSA radiomarcati con isotopi emettitori di particelle beta. Il composto è in grado di irradiare i tumori e le loro metastasi attraverso l'internalizzazione mediata dai sstr. I farmaci utilizzati sono  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr3-octreotide o  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC e, più recentemente,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr3-octreotate o  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE.

È ormai ampiamente accettato e dimostrato dagli studi dosimetrici che la PRRT sia con  $^{90}\text{Y}$ -octreotide o  $^{177}\text{Lu}$ -octreotate eroga dosi di radiazioni adeguate al raggiungimento di rilevanti risposte tumorali. I pazienti candidati a ricevere la terapia con gli analoghi radiomarcati della somatostatina sono quelli che presentano lesioni che abbiano una sufficiente densità di sstr, e quindi con una captazione adeguata (superiore a quella del fegato sano) all'imaging recettoreale con OctreoScan o, meglio, con PET/CT con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidi. Questo criterio di selezione è critico, poiché permette di erogare dosi elevate al tumore, risparmiando i tessuti normali.

La PRRT è tipicamente frazionata in più cicli. L'attività massima cumulativa somministrabile dipende dall'irradiazione dei reni, che sono gli organi dose-limitante.

La PRRT è generalmente ben tollerata. Gli effetti collaterali acuti, quali nausea o astenia, sono generalmente lievi e di breve durata. Da un punto di vista ematologico, le tossicità gravi (grado 3 o 4 WHO) si verificano in meno del 13% dei casi dopo  $^{90}\text{Y}$ -octreotide e in meno del 10% dopo  $^{177}\text{Lu}$ -octreotate.

## Farmaci a bersaglio molecolare

I due principali farmaci a bersaglio molecolare utilizzati nelle NEN del pancreas sono Everolimus (EVE), inibitore di mTOR, e Sunitinib (SUN), inibitore delle tirosin-kinasi.

### *Everolimus*

L'approvazione di EVE nel trattamento delle PanNEN ben o moderatamente differenziate, in stadio avanzato, non operabili, in progressione di malattia è seguito al trial randomizzato, di fase III RADIANT-3, che ha confrontato EVE con placebo (P). La principale tossicità di grado 3-4 è stata rappresentata da stomatite (7%), anemia (6%), iperglicemia (5%) e trombocitopenia (4%). Le più frequenti tossicità di grado 1-2 sono state: stomatite aftosa (64%), diarrea (34%), fatigue (31%) e infezioni (23%), principalmente del tratto respiratorio.

### *Sunitinib*

L'esperienza del SUN nelle NEN deriva principalmente da uno studio randomizzato, di fase III, a due bracci, registrativo (SUN-1111), ha confrontato Sunitinib (SUN) 37.5 mg/die continuativamente vs. P, in pazienti con PanNEN avanzate, ben differenziate, in progressione radiologica. A differenza dello studio di fase 3 relativo a Everolimus, in questo trial non era permesso il cross-over verso il braccio di trattamento per i pazienti che andavano in progressione nel braccio placebo. Questi pazienti uscivano dallo studio e ricevevano Sunitinib in uno studio *open-label* separato, come estensione del protocollo.

Lo studio è stato interrotto in anticipo, nel 2009, poiché un'analisi non pre-pianificata dell'indipendent data and safety monitoring board ha trovato una differenza statisticamente significativa in termini di PFS, *endpoint* primario dello studio. A tale punto 86 pazienti avevano ricevuto SUN e 87 P. Ai pazienti del braccio P con PD veniva permesso di ricevere SUN in uno studio *open-label* separato, come estensione del protocollo.

## Trattamento chirurgico

Il trattamento chirurgico delle PanNEN non funzionanti deve sempre essere pianificato e adattato a ogni singolo paziente considerando diverse variabili fra cui le caratteristiche del paziente stesso e lo stadio di malattia. Alcuni studi hanno recentemente individuato il

diametro tumorale come criterio principale per valutare l'indicazione o meno a un intervento chirurgico a intento radicale (63,64). Negli ultimi anni le forme incidentali sono aumentate grazie all'ampio utilizzo di tecniche d'imaging di alta qualità (65,66). Per le PanNEN non funzionanti  $\leq 2$  cm e in assenza di sintomi e/o sospette lesioni metastatiche, si può adottare un trattamento conservativo arruolando il paziente in un programma di *follow-up* clinico e radiologico (67,68) Le pNEN non funzionanti con diametro  $\leq 2$  cm presentano un rischio di "malignità" attorno al 6% mentre la mortalità per malattia a 5 anni è nulla (69). Non esiste un programma di *follow-up* basato sull'evidenza; di solito viene suggerito un controllo clinico e radiologico annuale e dopo sei mesi dalla prima diagnosi. Per quanto riguarda neoplasie non funzionanti  $> 2$  cm e/o neoplasie funzionanti/sintomatiche di qualsiasi dimensione, l'approccio chirurgico rimane il trattamento di scelta (70). La scelta dell'intervento chirurgico deve essere sempre valutata sulla base dell'età del paziente, delle sue comorbidità e del rischio di complicanze a lungo termine. I possibili interventi chirurgici per PanNEN si suddividono in resezioni tipiche e atipiche. Le resezioni tipiche sono classificate sulla base della localizzazione della neoplasia. La duodenocefalopancreasectomia è riservata per le neoplasie che coinvolgono la testa del pancreas mentre la splenopancreasectomia è eseguita per neoplasie del corpo/coda del pancreas. Le resezioni atipiche comprendono principalmente l'enucleazione e la resezione pancreatica intermedia. Tali resezioni possono essere eseguite per neoplasie  $\leq 2$  cm. Allo stato attuale quindi le resezioni atipiche sono riservate quasi esclusivamente alle PanNEN funzionanti e in particolare agli insulinomi (69,70)

La definizione di PanNEN localmente avanzata include neoplasie che invadono per contiguità vasi (vena porta, arteria mesenterica superiore, arteria epatica) e/o organi circostanti (stomaco, milza, colon, rene, surrene) in assenza di metastasi a distanza. Visto il comportamento relativamente più indolente di queste neoplasie rispetto all'adenocarcinoma duttale, l'atteggiamento del chirurgo è solitamente quello di spingersi ad eseguire un intervento chirurgico di resezione estesa anche alle strutture coinvolte. Un approccio chirurgico più aggressivo può essere giustificato in pazienti selezionati. In letteratura esistono solo alcune esperienze retrospettive che includono coorti di pazienti con tumori misti (funzionanti e non funzionanti), nei quali la chirurgia rappresenta una parte di un trattamento multimodale (71,72). Tali studi hanno mostrato comunque un

vantaggio in favore di un trattamento chirurgico radicale (resezione R0 o R1) in termini di sopravvivenza con tassi di complicanze e mortalità accettabili

La possibilità di eseguire un intervento resettivo deve essere valutata attentamente preoperatoriamente escludendola se si evidenzia: infiltrazione circonferenziale della vena porta con presenza di cavernoma portale e/o infiltrazione circonferenziale dell'arteria mesenterica superiore.

Per quanto riguarda il trattamento chirurgico della neoplasia primitiva in presenza di metastasi non resecabili, gli studi presenti in letteratura suggeriscono che vi sia un possibile vantaggio in termini di sopravvivenza quando si esegue l'asportazione chirurgica della PanNEN primitiva in presenza di metastasi (73). Tale vantaggio in termini di sopravvivenza è associato a una percentuale di complicanze non significativa. Tuttavia si deve considerare che negli studi retrospettivi che hanno valutato il ruolo della chirurgia in quest'ambito, esiste un possibile bias legato al probabile ricorso alla chirurgia nelle forme meno avanzate o in pazienti con migliore performance status (74).

Per quanto concerne il trattamento chirurgico delle metastasi epatiche, la chirurgia radicale del tumore primitivo e delle metastasi epatiche è efficace nell'alleviare i sintomi e rappresenta l'unico potenziale trattamento curativo (75,76). Tuttavia, a causa dell'alta incidenza di metastasi multifocali e bilobari, una resezione epatica radicale è possibile solo in meno del 20% dei pazienti. L'indicazione all'intervento chirurgico può essere posta se sono soddisfatti i seguenti criteri: 1) assenza di malattia extra-addominale, 2) presenza di un indice proliferativo (Ki67) < 20% e 3) presenza di recettori per la somatostatina per permettere l'utilizzo di una terapia radiorecettoriale adiuvante (77). Per questo motivo preoperatoriamente deve essere eseguita una biopsia epatica per la valutazione dell'indice proliferativo oltre a una PET con doppio tracciante 68Gallio e 18F-FDG per valutare l'eterogeneità del grading tumorale. La chirurgia potrebbe avere un ruolo anche in casi selezionati di pazienti affetti da PanNET-G3 ben differenziati (18). Il tipo di resezione epatica dipende dal numero di lesioni, dalla loro localizzazione e dalla riserva epatica. L'intervento può prevedere una semplice enucleazione, una segmentectomia o un'epatectomia. La sopravvivenza a 3 e 5 anni nei pazienti affetti da pNEN metastatico sottoposti a resezione epatica radicale, varia dal 79% al 95% (76).

La gestione non medica delle PanNEN associate alla MEN1 rimane controversa perché si tratta solitamente di neoplasie multifocali che coinvolgono spesso l'intera ghiandola. Fino all'80% dei pazienti affetti da MEN1 sviluppano NEN sincrone o metacrone a livello pancreatico o duodenale. Le NEN più frequentemente riscontrate in questi pazienti sono: NEN non funzionanti (80-100%), gastrinomi (54%) e insulinomi (18%) (78).. L'indicazione al trattamento chirurgico è assoluta per 1) le forme funzionanti, 2) le neoplasie con metastasi resecabili, 3) le neoplasie di diametro > 2 cm e 4) le pNEN non funzionanti che causano sintomi . Sebbene spesso le neoplasie siano multifocali, in genere non si raccomanda una pancreasectomia totale ma, se tecnicamente fattibile, interventi che preservino parenchima pancreatico. mentre l'indicazione alla pancreasectomia totale si pone se è presente una storia familiare di elevata mortalità correlata alla malattia. Le PanNEN non funzionanti < 2 cm si associano ad un rischio molto basso di metastasi e mortalità correlata alla malattia. Per questo motivo per PanNEN non funzionanti < 2 cm in pazienti affetti da MEN-1, si raccomanda un trattamento conservativo attraverso un follow-up annuale con un eventuale intervento chirurgico in caso di un aumento del diametro tumorale > 5 mm/anno (78).

Il trattamento non medico dei gastrinomi associati alla MEN1 rimane controverso. Alcuni autori raccomandano un trattamento conservativo controllando gli effetti dell'ipergastrinemia farmacologicamente (79). Altri autori invece sostengono un approccio chirurgico se il tumore raggiunge un diametro di 3 cm (80) o se la diagnosi biochimica è inequivocabile (81). Tuttavia nei pazienti trattati conservativamente il rischio di sviluppare metastasi epatiche è del 23-29% rispetto al 3-5% dei pazienti trattati con intervento chirurgico (76,77). Per questo motivo, un trattamento chirurgico è raccomandato per gastrinomi anche con diametro > 1 cm. Visto l'elevato rischio di recidive dopo l'intervento, lo scopo di questo approccio non è la cura della malattia bensì il suo controllo attraverso la prevenzione di metastasi (82).

## Trattamenti locoregionali delle metastasi epatiche

### *Trattamenti ablativi*

Le tecniche ablative locali rivestono un ruolo importante nel trattamento delle metastasi epatiche per le quali non c'è un'indicazione chirurgica, per sede, numero e dimensioni delle lesioni. Benché siano disponibili più tecniche ablative, quali la crioterapia, la termoablazione con microonde, con laser o con elettroporazione, la tecnica più diffusa è certamente la termoablazione con radiofrequenza (RFA). In pazienti ben selezionati tale metodica consente di ottenere risultati sovrapponibili alla chirurgia (83). La dimensione della lesione epatica è il vero limite della termoablazione. E' difficile trattare radicalmente una lesione epatica con diametro maggiore di 3 cm, ottenendo un margine di necrosi termo-indotta adeguato nel parenchima epatico sano circostante (paragonabile al margine di resezione chirurgica), ed è praticamente impossibile trattare lesioni di diametro di 5 cm. Altro limite della RFA è la vicinanza delle lesioni epatiche ad organi vitali, o metastasi superficiali in contiguità con lo stomaco, il colon ed il diaframma.

### *Trattamenti vascolari*

L'embolizzazione arteriosa epatica, utilizzando la tecnica percutanea di Seldinger, sotto controllo radiologico è stata sviluppata nel trattamento delle metastasi epatiche da NEN sin dagli anni '70. L'embolizzazione arteriosa epatica (TAE) è basata sul principio che i tumori nel fegato (primitivi e metastatici) sono vascolarizzati dal circolo arterioso epatico, mentre gli epatociti non patologici sono vascolarizzati principalmente dalla vena porta.

L'embolizzazione è rivolta alla cura dei pazienti affetti da metastasi epatiche massive, non operabili, sia con lo scopo di ridurre la sintomatologia indotta dalle metastasi stesse, che con lo scopo di debulking, al fine di poter favorire l'efficacia di trattamenti sistemici o di una possibile futura chirurgia resettiva.

Accanto alla embolizzazione può essere proposto un trattamento simile, la chemioembolizzazione (TACE).

Da un punto di vista tecnico i due trattamenti non differiscono molto, se non nel materiale che viene infuso per via intrarteriosa, infatti nella chemioembolizzazione viene impiegato un farmaco (adriamicina, streptozotocina), miscelato ad un agente embolizzante. Quest'ultimo può essere un olio embolizzante (Lipiodol) o microparticelle di diversa

struttura e composizione in base al materiale scelto. Il principio di utilizzare un chemioterapico associato all'agente embolizzante risiede nell'aumentare il danno tissutale indotto dall'ischemia attraverso un agente chimico.

Un ulteriore trattamento con approccio vascolare analogo a quanto descritto per TAE e TACE è la radioembolizzazione delle metastasi epatiche (84,85), che può essere eseguita mediante infusione intrarteriosa di microsferi pre-caricate con Itrio90 ( $^{90}\text{Y}$ ), in pazienti con malattia epatica diffusa, non resecabile, già sottoposti a TAE e/o TACE.

## 1.2. Neoplasie Neuroendocrine Toraciche

### NEN del polmone

Le neoplasie neuroendocrine (NEN) del polmone sono un gruppo eterogeneo di tumori con differenti aspetti morfologici e diversi livelli di aggressività clinica. La terminologia da usare per descrivere le NEN polmonari è quella contenuta nella classificazione OMS, edizione 2015, che identifica quattro varianti morfologiche: carcinoide tipico (CT), carcinoide atipico (CA), carcinoma neuroendocrino (NE) a grandi cellule (*large cell neuroendocrine carcinoma*, LCNEC) e carcinoma a piccole cellule (*small cell carcinoma*, SCLC) (1). Nella nuova classificazione OMS 2015 gli LCNEC sono stati enucleati dal gruppo dei carcinomi a grandi cellule e tutti i tumori NE sono compresi in un capitolo unitario, abbandonando l'attuale ripartizione in sottogruppi separati di neoplasie come nelle precedenti classificazioni OMS del 2004 e 1999.

Sulla base delle similitudini morfologiche e immunofenotipiche tra le cellule neoplastiche dei CT e CA e la controparte cellulare normale del sistema NE diffuso dell'apparato respiratorio, essi rappresentano un gruppo di tumori ben differenziati (WD-NET) in contrapposizione a LCNEC e SCLC che sono carcinomi scarsamente differenziati (PD-NEC).

Dati epidemiologici, genetici, patologici e clinici supportano infatti il concetto che i CT siano tumori maligni di basso grado con lunga sopravvivenza, i CA tumori maligni di grado e prognosi intermedi e LCNEC/SCLC tumori maligni di alto grado e a cattiva prognosi senza rimarchevoli differenze di sopravvivenza fra loro. Oltre alle implicazioni di "follow-up", tale classificazione è utile per il trattamento clinico dei pazienti, che è prevalentemente chirurgico nei CT, multimodale nei CA e prevalentemente chemio-radioterapico nei LCNEC/SCLC. Tuttavia, recentemente è stata avanzata una proposta di "grading" anche delle NEN polmonari, basata sull'integrazione delle informazioni fornite da Ki-67 (percentuale di cellule immunoreattive o indice di marcatura/labeling index = LI), necrosi e conta mitotica, ciascuno identificato da tre differenti "cut-off" con diversi livelli di espressione indipendenti in analisi multivariata, che porta a identificare tre gradi di malattia (G1, G2, G3), indipendenti dalla classificazione istologica e con differente aspettativa di vita dei pazienti. In particolare, i tumori G1 sono quelli che hanno almeno due di tre parametri al livello 1, i tumori G2 hanno almeno due di tre parametri al livello

2 e i tumori G3 hanno almeno due di tre parametri al livello 3. In tal modo, i tumori G1 vanno a comprendere tutti i CT e una frazione di CA, i tumori G2 includono la maggior parte di CA ma anche alcuni SCLC e LCNEC e i tumori G3 assommano la maggior parte di SCLC e LCNEC ma addirittura una piccola frazione di CA. Tale suddivisione è in linea con i dati di letteratura che vedono i CA e LCNEC come categorie alquanto eterogenee di tumori dal punto di vista comportamentale e una frazione di SCLC caratterizzati da lunga sopravvivenza. Tale proposta deve tuttavia essere confermata da studi indipendenti e prospettici di validazione (3). Lo spettro diagnostico e clinico delle NEN polmonari non ha significato patogenetico, nel senso che CT o CA sono tumori istogeneticamente correlati fra loro ma non con LCNEC o SCLC. Questo assunto è ulteriormente confermato dalla preferenziale associazione di iperplasia diffusa idiopatica polmonare a cellule NE (cosiddetta *diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia DIPNECH*), una lesione pre- invasiva caratterizzata da aumentato rischio di sviluppare CT o CA ma non LCNEC o SCLC (1,4) e da differenze maggiori nelle alterazioni genetiche che caratterizzano CT e CA da una parte e LCNEC e SCLC dall'altra.

Tabella 3: Sinossi delle caratteristiche clinico-patologiche delle NEN polmonari.

		CT	CA	LCNEC	SCLC
<b>Età</b>	Media	45 anni*	55 anni	65	65
	Decade	IV-V	V-VI	VI-VII	VI-VII
<b>Sesso</b>		F>M	M>F	M>F	M>F
<b>Prevalenza</b>		1-2%	0.2%	3%	15%
<b>Fumo</b>		No fumatori	Correnti o ex-fumatori	Fumatori	Fumatori
<b>Associazione con MEN 1</b>		5%	Molto rara	Assente	Assente
<b>Metastasi</b>		10-15%	45-50%	50-70%	>80%
<b>Grado</b>		Basso	Intermedio	Alto	Alto
<b>Morfologia</b>		Ben differenziata	Ben differenziata	Poco differenziata	Poco differenziata
<b>Mitosi per 2 mm<sup>2</sup></b>		<2	2-10	>10 (mediana 70)	>10 (mediana 80)
<b>Necrosi</b>		Assente	Presente (focale)	Presente (estesa)	Presente (estesa)

CT: carcinoide tipico; CA: carcinoide atipico; LCNEC: carcinoma neuroendocrino a grandi cellule; SCLC: carcinoma a piccole cellule; \*in età infantile i CT prevalgono sui CA

## NEN del timo

Anche le neoplasie o tumori neuroendocrini (NEN o NET) del timo sono un gruppo eterogeneo di tumori con differenti aspetti morfologici e differenti livelli di aggressività clinica.

L'attuale classificazione segue i criteri dell'OMS 2015 con una terminologia e criteri diagnostici che si sovrappongono a quelli delle NEN polmonari, con un approccio sostanzialmente differente rispetto all'edizione del 2004 dove tutti i NET timici erano considerati complessivamente carcinomi, a loro volta suddivisi in ben differenziati, moderatamente differenziati e scarsamente differenziati. La terminologia attuale identifica invece tumori NE di basso grado corrispondenti ai CT, tumori NE di grado intermedio corrispondenti ai CA e carcinomi NE di alto grado a grandi cellule (carcinoma NE a grandi cellule o LCNEC) o a piccole cellule (carcinoma a piccole cellule o SCC). Tale decisione è motivata dal fatto che anche gli LCNEC o i SCC possono esprimere in modo consistente marcatori NE: quindi si è preferito enfatizzare il concetto di grado tumorale in funzione dell'aggressività biologica piuttosto che quello della differenziazione cellulare. La maggior parte delle NEN timiche appartiene alle categorie di CA e LCNEC, mentre CT e SCC sono alquanto più rari. I CT e CA timici hanno una maggiore propensione alla recidiva locale, metastatizzazione e morte correlata al tumore rispetto alla controparte polmonare, verosimilmente dovute alla difficoltà di diagnosi precoce. Vi è un alto tasso di associazione con la sindrome di Cushing da produzione ectopica di ormone adrenocorticotropo, che si sviluppa tuttavia anche in tumori NE timici di alto grado. Le NEN polmonari rappresentano l'1 - 2 % di tutti i tumori maligni polmonari ed il 10 - 30% di tutte le neoplasie neuroendocrine (86). Il sottotipo più comune è lo SCLC, che ne rappresenta il 20%, mentre l'LCNEC ne rappresenta il 3%, il CA lo 0,2% e il CT l'1-2% (86, 87,88). Spesso la diagnosi è occasionale, quando la malattia è asintomatica; quando sintomatica, i sintomi più frequenti sono legati all'ostruzione delle vie aeree e sono tosse, dispnea, emottisi, stridore; una sindrome da carcinoide può essere osservata nel 1% - 5 % dei casi ed è legata al rilascio di sostanze vasoattive quali la serotonina (87). Le NEN del timo sono ancora più rare, con una incidenza di < 1 caso/100.000 abitanti/anno (89), rappresentando il 2-5% di tutte le neoplasie timiche ed il 2% delle neoplasie mediastiniche (90). Esse mostrano un tasso standardizzato ed una associazione con MEN1 che è maggiore rispetto agli analoghi NET polmonari anche se l'associazione genotipo-fenotipo in questi casi è bassa. I tumori neuroendocrini del timo mostrano un atteggiamento biologico più aggressivo rispetto ai corrispettivi addominali; pertanto, è frequente diagnosticarle in uno stadio più avanzato rispetto alle altre NEN (19);

infatti fino al 30% dei pazienti con NEN del timo presentano metastasi già all'esordio della malattia, prevalentemente al fegato, encefalo, ossa e al distretto testa-collo (91).

### Imaging e terapie

Le metodiche di imaging funzionale medico-nucleare (PET/TC con <sup>68</sup>Ga-DOTA-peptidi, <sup>18</sup>F-DOPA, <sup>18</sup>F-FDG; SRS) affiancano l'imaging morfologico convenzionale (TC, ecografia, RM) nella caratterizzazione delle lesioni NEN polmonari (92-94). Come per NEN di altre primitività (vedi sezione 1.5), anche per quelle polmonari il grado di differenziazione influenza l'uptake dei diversi radiofarmaci. Le forme ben differenziate (CT) presentano generalmente un basso metabolismo glucidico (e quindi bassa avidità per il <sup>18</sup>F-FDG), fattore che limita il suo impiego (95,96). Una significativa e intensa captazione di <sup>18</sup>F-FDG si osserva invece nei carcinoidi atipici (CA), e in misura ancora più elevata nel LGNEC e SCLC. La maggior parte dei CT esprime invece un'alta densità di recettori della somatostatina (SSTR). Nei pazienti candidati a terapia sistemica di prima linea, la terapia con analoghi della somatostatina (octreotide, lanreotide) potrebbe essere presa in considerazione (97,98). Nelle NEN polmonari di basso grado localmente avanzate non resecabili o metastatiche, non funzionanti, Everolimus dovrebbe essere preso in considerazione in progressione di malattia dopo analoghi della somatostatina (99) (Il 14/12/2018 l'AIFA ha approvato la prescrizione di everolimus nelle neoplasie neuroendocrine di origine polmonare metastatico o non operabile "in progressione di malattia dopo analoghi della somatostatina"). I pazienti con carcinoide tipico del polmone radicalmente resecato non dovrebbero essere trattati con chemioterapia a scopo adiuvante.

Pazienti con carcinoide atipico ed interessamento linfonodale (pN1,2) radicalmente resecato non dovrebbero essere trattati con chemioterapia a scopo adiuvante (100). In casi selezionati di carcinoide atipico pN2, potrebbe essere discusso col paziente un eventuale trattamento adiuvante dopo consulto multidisciplinare e discutendo approfonditamente eventuali vantaggi e svantaggi. Nei pazienti affetti da carcinoidi del polmone o del timo, localmente avanzati o metastatici, una chemioterapia contenente Temozolomide potrebbe essere presa in considerazione (101,102). Nei pazienti con carcinoidi del polmone e del timo, localmente avanzati o metastatici, una chemioterapia con oxaliplatino e fluoropirimidine potrebbe essere presa in considerazione in pazienti non suscettibili di terapia standard (103).

I tumori neuroendocrini polmonari possono presentarsi come lesioni più o meno invasive coinvolgenti le vie aeree centrali. I tumori invasivi centrali, condizionanti stenosi o

sanguinamento delle vie aeree, possono essere trattati tramite broncoscopia rigida per la palliazione dei sintomi ad esso correlati.

La disostruzione meccanica laser assistita (DMLA) in broncoscopia rigida (coadiuvata o meno dal posizionamento di stent endobronchiali siliconici o auto espandibili metallici) permette il ripristino della pervietà delle vie aeree con conseguente rapido miglioramento della capacità funzionale respiratoria e sollievo della sintomatologia dispnoica (104).

I tumori neuroendocrini a basso grado (carcinoidi tipici) possono talvolta presentarsi come lesioni esclusivamente endobronchiali con una base di impianto pedunculata senza invasione della sottomucosa. In tali casi, la broncoscopia rigida associata all'utilizzo del laser può avere un ruolo terapeutico definitivo (105-106). Per i carcinoidi tipici con ampia base di impianto e i carcinoidi atipici, la resezione meccanica laser assistita non è curativa e l'intervento chirurgico rimane il trattamento definitivo di prima scelta (107).

In pazienti con NET toracica, ben differenziata, metastatica ed in progressione ad altre terapie, positiva alla PET/TC con 68-Gallio Dota-Peptide, la PRRT potrebbe essere presa in considerazione solo nell'ambito di studi clinici.

## **1.2.NEN Occulti**

### Introduzione

Le neoplasie neuroendocrini a partenza sconosciuta sono tumori abbastanza rari che costituiscono il 5% di tutti i tumori occulti. Rappresentano il 90% dei carcinomi neuroendocrini scarsamente differenziati con una piccola quota di bene o moderatamente differenziati.

Le neoplasie neuroendocrini occulte si possono suddividere in forme scarsamente differenziate (carcinoma a piccole od a grandi cellule), e in neoplasie neuroendocrine ben differenziate sia a carcinoide che a tumore neuroendocrino ben differenziato (140)

I siti di riscontro occasionale della malattia sono i linfonodi mediastinici oppure retroperitoneali seguiti dal fegato e scheletro. Nel caso di riscontro di localizzazioni esclusive a livello linfonodale, deve essere preso in considerazione il tumore di Merkel con presentazione esclusivamente nodale.

### Ricerca del primitivo

Nel tentativo di individuare il primitivo di questi tumori, ci si è avvalsi di diverse tecniche: valutazione anatomo patologica, istopatologica e immunoistochimica. Quest'ultima è quella che è stata di maggiore successo nell'aiutarci a individuare marker che permettessero di orientarci, infatti il primo obiettivo che si pone è dimostrare la natura epiteliale del tumore mediante un pannello di anticorpi come: vimentina, pancitocheratine, CD45 e proteina S-100.

Il secondo step è rappresentato dalla definizione del tipo di tumore, mediante CK7 e CK20 utilizzate per evidenziare le origini di TNPO (Tumori Neuroendocrini primitivi occulti); ovviamente ulteriori informazioni possono giungere mediante l'utilizzo di marcatori d'organo o di istotipo tumorale (141).

Inoltre, grazie all'aumento delle conoscenze genetiche, assistiamo oggi a una vera e propria rivoluzione sia nella diagnostica che nella terapia farmacologica di queste malattie. La possibilità di sequenziamenti sempre più rapidi sta permettendo di conoscere sempre meglio il nostro DNA, e permettendo di trovare anomalie che sempre più spesso vengono correlate a specifiche malattie.

La genetica ha già acquistato un importante ruolo nella definizione di alcuni TEPO, mediante l'individuazione di traslocazioni, inversioni o mutazioni che sono alla base di alcune di queste malattie, tuttavia non appare ancora significativa per la diagnosi di TNPO, per i quali l'immunoistochimica rimane il principale fattore che ci aiuta nell'identificazione dei tumori.

### Imaging

Nella scelta dell'esame più appropriato deve essere valutata la sintomatologia e l'immunoistochimica per la possibile esistenza di sindrome da secrezione ormonale, anche se poco frequente nelle forme scarsamente differenziate.

Nel caso in cui la neoplasia risulti scarsamente differenziata si dovrà procedere con un FDG-PET e l'imaging encefalico, invece la scintigrafia o la Gallio-PET potranno essere utilizzate nel caso di una malattia differenziata che sia in grado di captare il marker. Solo nel caso in cui si evidenzino esclusivamente adenopatie addominali si può iniziare con un'entero-RM o un'entero-TC nel sospetto di un primitivo nell'intestino tenue. (142, 143).

### Terapia

I TNPO sono spesso responsivi a polichemioterapia che permette una sopravvivenza a lungo termine in alcuni casi.

Nello studio di Hainsworth e Coll (5) si è provato un regime polichemioterapico a base di: paclitaxel, carboplatino e etoposide in carcinomi neuroendocrini poco differenziati (CNPD), si è osservata una risposta nel 53% dei pz con una sopravvivenza mediana era di 14,5 mesi. Da questo studio si è reso evidente come questi tumori siano chemiosensibili, con un ottimo tasso di risposta seppur molto variabile.

### **Carcinoma a cellule di Merkel**

Il carcinoma a cellule di Merkel (MCC, Merkel cell Carcinoma), è una neoplasia cutanea rara, che colpisce soprattutto gli anziani (età superiore ai 75 anni) nelle aree foto-esposte, caratterizzato da un decorso clinico potenzialmente aggressivo con tendenza alla recidiva locale e alla metastatizzazione linfonodale a distanza (108-109).

L'eziologia resta ancora sconosciuta, ma epidemiologicamente esiste un legame con gli stati immunodepressivi. Nel 2008 Feng et al. hanno identificato un virus presente nel 80%

di questi tumori (110); questo virus è stato quindi chiamato Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV). È stata osservata forte correlazione della presenza del virus con stati di alterata risposta immunitaria cellulo-mediata (111-112) spiegando quindi la relativa maggiore incidenza di MCC in pazienti trapiantati, portatori di patologie onco-ematologiche o in trattamento immunosoppressivo.

Il MCC si presenta tipicamente nei pazienti più anziani con fototipi chiari prevalentemente sotto forma di lesione nodulare a crescita rapida, asintomatico, di consistenza dura, superficie liscia e lucida e colorito roseo, rosso-bluastro o violaceo. Raramente si presenta ulcerato o dà origine a lesioni crostose; tali aspetti sono più frequenti in lesioni in fase avanzata. La topografia del MCC vede come sedi preferenziali le aree esposte al sole (113-116). Le sedi anatomiche più frequenti per il tumore primario erano: testa-collo (48%); arti superiori e spalle (24%); arti inferiori (15%); tronco (11%); altre regioni corporee (9%). A parte la cute, circa il 5% dei casi di carcinoma di Merkel insorge a livello mucosale, tra cui la laringe è la più frequente. Possono essere riscontrati casi di MCC a primitivo sconosciuto.

Il dermoscopio si sta rivelando utile nell'individuare reperti caratteristici come: vasi irregolari lineari e vasi polimorfi, aree lattescenti e aree bianche brillanti "a croce" (116-117).

Il MCC è spesso diagnosticato tardivamente in quanto interpretato sia come una lesione benigna sia come una differente neoplasia (113). Clinicamente, il MCC deve essere differenziato da molte lesioni benigne e maligne che insorgono sulla cute cronicamente fotoesposta, come il carcinoma basocellulare, il carcinoma squamocellulare, il cheratoacantoma, il melanoma amelanotico, il granuloma piogenico, il lipoma, molti tumori annessiali e rare forme di linfoma cutaneo primitivo a cellule B della cute.

La diagnosi precoce risulta di fondamentale importanza in quanto la prognosi di questo tumore è correlata alle sue dimensioni. Per pazienti con neoplasie di piccole dimensioni (<5mm) infatti, il rischio di coinvolgimento linfonodale era del 20% ma passava al 40% per pazienti con lesioni di maggiori dimensioni (118).

Le caratteristiche cliniche che suggeriscono una diagnosi di MCC possono essere facilmente ricordate con l'acronimo AEIOU:

- A: asintomatico (88% dei casi);
- E: espansione rapida (crescita significativa in meno di 3 mesi nel 63% dei casi);
- I: immunosoppressione (HIV, trapianto di organo solido, LLC nel 18% dei casi);
- O: età avanzata (in inglese older age, nel 90% dei casi);

- U: aree fotoesposte in pazienti con fototipo chiaro (in inglese UV-exposed areas nel 81% dei casi).

La presenza di almeno tre di queste caratteristiche può far avanzare il sospetto clinico. La biopsia della lesione e l'esame istologico sono necessari per effettuare la diagnosi corretta.

Il MCC è costituito da una popolazione di cellule di piccola e media taglia, monomorfe, con nucleo tondeggiante e scarso citoplasma.

Vengono distinte tre varianti morfologiche: solida, trabecolare e diffusa. Il loro significato prognostico ha uno scarso livello di evidenza.

Le cellule tumorali esprimono marcatori epiteliali e neuroendocrini.

Il marcatore generale di natura neuroendocrina è da considerarsi esclusivamente la sinaptofisina.

Il contributo delle metodiche medico-nucleari si esplica, in fase di stadiazione, sia nello studio dei linfonodi regionali con la biopsia del linfonodo sentinella (LS) sia nella ricerca delle metastasi a distanza (PET/CT).

La FDG-PET/CT può essere considerata:

- come completamento di stadiazione, nei pazienti a maggior rischio come in caso di positività della biopsia del LS;
- come approfondimento diagnostico nel sospetto di recidiva;
- come valutazione della risposta alla terapia, se è stato effettuato uno studio FDG PET/CT basale pre-trattamento.

Oggi il MCC viene stadionato mediante il sistema di stadiazione TNM del 2017. (126).

#### *Classificazione TNM*

*TX Primary tumour cannot be assessed T0 No evidence of primary tumour*

*Tis Carcinoma in situ*

*T1 Tumour 2 cm or less in greatest dimension*

*T2 Tumour more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension*

*T3 Tumour more than 5 cm in greatest dimension*

*T4 Tumour invades deep extradermal structures, i.e., cartilage, skeletal muscle, fascia or bone*

*NX Regional lymph nodes cannot be assessed*

*N0 No regional lymph node metastasis*

*N1 Regional lymph node metastasis*

*N2 In transit metastasis without lymph node metastasis N3 In transit metastasis with lymph node metastasis*

Note:

*In transit metastasis: a discontinuous tumour distinct from the primary lesion and located between the primary lesion and the draining regional lymph nodes or distal to the primary lesion.*

*The regional lymph nodes are those appropriate to the site of the primary tumour. See page 8.*

*M0 No distant metastasis*

*M1 Distant metastasis*

*M1a Skin, subcutaneous tissues or non regional lymph node(s) M1b Lung*

*M1c Other site(s)*

*pTNM*

*The pT category corresponds to the T category. For pM see page 8.*

*pN0 Histological examination of a regional lymphadenectomy specimen will ordinarily include 6 or more lymph nodes. If the lymph nodes are negative, but the number ordinarily examined is not met, classify as pN0.*

*pNX Regional lymph nodes cannot be assessed*

*pN0 No regional lymph node metastasis*

*pN1 Regional lymph node metastasis*

*pN1a (sn) Microscopic metastasis detected on sentinel node biopsy*

*pN1a Microscopic metastasis detected on node dissection*

*pN1b Macroscopic metastasis (clinically apparent)*

*pN2 In transit metastasis without lymph node metastasis*

*pN3 In transit metastasis with lymph node metastasis*

Note:

*In transit metastasis: a discontinuous tumour distinct from the primary lesion and located between the primary lesion and the draining regional lymph nodes or distal to the primary lesion.*

*Stadio clinico*

*Stage 0 Tis N0 M0*

*Stage I T1 N0 M0*

*Stage IIA T2,3 N0 M0*

*Stage IIB T4 N0 M0*

*Stage III Any T N1-3 M0*

*Stage IV Any T Any N M1*

*Stadio patologico*

*Stage 0 Tis N0 M0*

*Stage I T1 N0 M0*

*Stage IIA T2,3 N0 M0*

*Stage IIB T4 N0 M0*

*Stage IIIA T0 N1b M0*

*T1-4 N1a, N1a(sn) M0*

*Stage IV Any T Any N M1*

*Tabella 4 Union for International Cancer Control (UICC), TNM eighth edition, 2017*

Il trattamento del carcinoma a cellule di Merkel necessita di un trattamento multidisciplinare, con coinvolgimento del dermatologo, dell'oncologo medico, del radioterapista, del patologo e del chirurgo oncologo.

Nel caso in cui il tumore presenti uno stadio localmente avanzato, allora la radioterapia assume un ruolo di esclusività. In caso di radioterapia adiuvante il corretto timing per la somministrazione sono 6 settimane dalla chirurgia.

Infine, recentemente alcuni lavori dimostrano come sino all'80% dei pz MCC siano positivi per il poliomavirus e che l'utilizzo dei checkpoint inibitori del sistema immunitario (ex.

Permbrolizumab, Avelumab, Nivolumab) in associazione alla radioterapia abbia dimostrato risultati molto promettenti, tali da portare Avelumab ad essere approvato ufficialmente in questa indicazione (127).

Come premesso il MCC si sviluppa più frequentemente in pazienti immunodepressi o immunosoppressi (119). Inoltre, è noto che i pazienti immunosoppressi portatori di MCC hanno sopravvivenza ridotta rispetto a pazienti immunocompetenti, a parità di stadio (120-122) (9-11). Terapie anti PD-1 hanno dimostrato un *Response Rate* dell'80% in trial di fase 1 in pazienti con MCC (123) (12). In altri studi si è osservato come la sopravvivenza possa correlare con profili di espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e con la densità dell'infiltrato infiammatorio (124,125). Un intenso infiltrato intratumorale di linfociti CD8+ correla indipendentemente con l'*outcome*, migliorando la prognosi (125).

Nei pz con metastasi a distanza il trattamento di scelta resta la chemioterapia palliativa.

### **Feocromocitoma/Paraganglioma**

Il Sistema dei Paragangli (SP) (128) è definito dalla costellazione delle cellule cromaffini di derivazione neuroectodermica diffuse in tutto il corpo ed organizzate in strutture anatomiche definite paragangli.

La midollare del surrene rappresenta il paraganglio più grosso del SP, questa è costituita da due popolazioni cellulari: Tipo I o cellule principali, di origine neuroectodermica che contengono granuli ricchi in catecolamine e proteine ricche in triptofano, che permettono la definizione di queste cellule neuroendocrine e le pongono nel sistema neuroendocrino diffuso; Tipo II o cellule sustentacolari, di aspetto ed origine neurale, che hanno funzione di supporto e sostegno per le cellule principali e non contengono granuli. Come gli altri organi endocrini sono dotati di un ricco sistema vascolare che permette l'arrivo in circolo dei loro prodotti di secrezione.

Il feocromocitoma e il paraganglioma sono delle neoplasie rare secernenti catecolamine, che originano rispettivamente dalla midollare del surrene (Feo) o dal tessuto neurale periferico (PG). Non esiste un fattore prognostico preciso per questa malattia, l'indicatore più preciso sono le dimensioni del tumore (129,130). La prognosi di Feo e PG è definita da diverse valutazioni integrate anatomico-cliniche basate su: 1) elementi clinici: malattia extra SP e persistenza post operatoria della sintomatologia ipertensiva (parametro utilizzabile solo

per Feo o per PG secernenti epinefrina); 2) markers biochimici: elevati livelli di dopamina, di norepinefrina ed epinefrina; 3) markers istologici (130).

Questa malattia è strettamente correlata con diverse sindromi ereditarie e rappresenta la più comune categoria tumorale correlata. Sono state identificate mutazioni in almeno una dozzina di geni coinvolti in numerosi pathways responsabili della patogenesi neoplastica, della regolazione dell'ipossia cellulare, del rimodellamento epigenetico e della crescita cellulare. I principali geni mutati sono riportati nella (tabella 5)(131).

Denominazione della sindrome	Prevalenza	Frequenza di Feo/Pgl nella sindrome	Manifestazione associate a Pheo/Pgl	Gene mutato
Sindrome di Von Hippel-Lindau	1:36.000	≈15%	Emangioblastoma cerebellare e spinale, emangioblastoma retinico, cisti e caanero a cellule chiare del rene, cisti e neoplasie neuroendocrine del pancreas, tumore del sacco endolinfatico	VHL
Neoplasia endocrina multipla tipo 2 (2°)	1:30.000	≈50%	Carcinoma midollare della tiroide, iperparatiroidismo primario	RET
Neoplasie endocrina multipla tipo 3 (2B)	1:1.000.000	≈50%	Carcinoma midollare della tiroide, habitus marfnioide, neurinomi mucosi	
Neuorfibromatosi tipo 1	1:3.000	≈1%	Pigmentazione cutanea (macchie "caffè-latte"), neurofibromi cutanei, tumori del sistema nervoso periferico, noduli di Lisch nell'iride	NF1
Sindrome dei PGL ereditari (PGL1, PGL2, PGL3, PGL4)	1:300.000	100%	Carcinoma renale a cellule chiare, tumore stromale gastrointestinale (GIST), adenoma ipofisario, condroma polmonare	SDHD, SDHAF2, SDHC, SDHB, SDHA
Sindorme di Carney-Stratakis	≈20 famiglie	100%	Tumore stromale gastrointestinale (GIST)	SDHB, SDHC, SDHD
Triade di Carney	<100 casi	100%	Tumore stromale Gastrointestinale (GIST), condroma polmonare	? non ereditario
Neoplasia endocrina multipla tipo 1	1:30.000	<1%	Tumori delle paratiroidi, del pancreas endocrino e dell'ipofisi anteriore, altri tumori neuroendocrini e non	MEN1
Feo/Pgl - policitemia	≈ 10 casi	100%	Policitemia, somatostatinomi multipli duodenali	HIF2α, PHD2

*Tabella 5 Contesti sindromici nei quali può manifestarsi un feocromocitoma/paragangioma*

Il riscontro clinico di Feo e/o PG maligni è raro, è stimato nel range del 2,5%-2,8% (132) nella popolazione adulta e 2,4% nell'età pediatrica (133); la diagnosi clinica di malignità è basata su almeno uno dei seguenti criteri:

A. Evidenza di estesa invasione locale

B. Evidenza di metastasi ad uno o più siti anatomici privi di tessuto cromaffine non neoplastico, al fine di evitare l'inadeguata classificazione di lesioni multicentriche sincrone e di recidive locali.

Le sedi più frequenti della malattia metastatica sono: lo scheletro assiale, i linfonodi locoregionali, il fegato, il polmone ed il rene, meno comune la diffusione a pericardio, encefalo e milza (134).

Dal punto di vista istologico, morfologico e immunoistochimico non esiste nessun elemento in grado di permetterci di discriminare tra malattia benigna e maligna. Per questi motivi al fine di avere un'indicazione sul potenziale evolutivo della malattia è stato redatto uno score basato su 12 items che fornisce una ragionevole indicazione di malignità, il Pheocromocitoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) (Tabella 4) proposto da Thompson et al nel 2002.

Lo score finale è così interpretato: valori superiori o uguali a 4 sono associati ad andamento clinico maligno, in dettaglio PASS score <4 predice andamento benigno, PASS score >6 predice andamento maligno, PASS score  $\geq 4$  necessita di stretto follow-up per elevato rischio di recidive. PASS score è validato su ampia casistica e su lunghi periodi di follow-up clinico, è sicuramente il più affidabile degli SM proposti ma presenta una grande variabilità osservatore dipendente: alcuni dei parametri proposti (monotonia cellulare, elevata cellularità e ipercromasia nucleare) risentono pesantemente dell'esperienza dell'osservatore.

<b>Feature</b>	<b>Score if present (no. of points assigned)</b>
Large nests or diffuse growth (>10% of tumor volume)	<b>2</b>
Central (middle of large nests) or confluent tumor necrosis (not degenerative change)	<b>2</b>
High cellularity	<b>2</b>
Cellular monotony	<b>2</b>
Tumor cell spindling (even if focal)	<b>2</b>
Mitotic figures >3/10 HPF	<b>2</b>
Atypical mitotic figure(s)	<b>2</b>
Extension into adipose tissue	
Vascular invasion	<b>1</b>
Capsular invasion	<b>1</b>
profound nuclear pleomorphism	<b>1</b>
Nuclear hyperchromasia	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>20</b>

HPF=high power field

*Tabella 6: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scoring Scale (PASS)*

Le metodiche medico-nucleari vengono utilizzate sia in ambito diagnostico che nella scelta della migliore terapia “target” (co MIBG o PRRT) e nella valutazione della risposta al trattamento.

Come per altre forme NEN, anche per i feocromocitomi/paragangliomi possono essere impiegate diverse metodiche: scintigrafia, SPECT o SPECT/TC con Metaiodobenzilguanidina –MIBG marcata con I131 o I123 e PET/TC con diversi radiofarmaci (18F-FDG, 18F-DOPA, 68Ga-DOTA-peptidi). Inoltre, va ricordato che i feocromocitomi a causa di una espressione variabile dei SSTR si può limitare notevolmente la possibilità di identificazione della lesione mediante PET/TC con 68Ga-DOTA-peptidi; pertanto è preferibile l'utilizzo del 18F-DOPA.

Il trattamento di questi tumori deve essere sempre prioritari rispetto ad altre lesioni, a causa dell'effetto adrenergico a carico del sistema cardiovascolare. La terapia standard consta di un trattamento con  $\alpha$  e  $\beta$  antagonisti, in maniera da evitare crisi ipertensive durante l'intervento, successiva espansioneolemica 30 min prima dell'intervento e asportazione chirurgica della massa.

I pazienti con feocromocitoma maligno e metastasi devono essere trattati con terapia radio-recettoriale ( $^{131}\text{I}$ -MIBG)(136), se c'è un'impedimento a questo trattamento o in caso di mancato controllo della malattia si può passare alla chemioterapia (135).

### **Carcinoma midollare della Tiroide**

Il MTC sporadico si presenta clinicamente come una lesione nodulare solida, singola e unilaterale, al contrario una presentazione multifocale, talvolta bilaterale e associata a un'iperplasia delle cellule C parafollicolari, è riscontrata soprattutto nelle forme a trasmissione familiare.

Alla palpazione la lesione può risultare dolente in alcuni casi. Si presenta tipicamente ai due terzi superiori di ciascun lobo della ghiandola tiroidea riflettendo la distribuzione anatomica delle cellule parafollicolari.

Localizzazioni linfonodali cervicali sono presenti in una percentuale che varia dal 50 al 70% dei pazienti alla diagnosi, anche in base al T del primitivo, e possono talvolta essere il primo segno di presentazione della malattia (137, 138), più frequentemente in pazienti con malattia plurifocale (139).

Metastasi a distanza alla diagnosi sono presenti nel 5-10 % dei pazienti e le sedi più comunemente interessate sono il fegato, i polmoni e le ossa, più raramente la cute e l'encefalo (138). Un coinvolgimento clinico sistemico può verificarsi in seguito alla secrezione ormonale da parte del tumore. Infatti, la secrezione di calcitonina (Ct), peptidi correlati alla Ct e altre sostanze, può causare diarrea e flushing prevalentemente in pazienti con malattia avanzata. In rari casi, il MTC può provocare la sindrome di Cushing a causa di una produzione ectopica di corticotropina (ACTH).

Meno frequentemente, il MTC può essere diagnosticato nell'ambito di work-up per MEN 2, nel caso quest'ultimo sia avviato in seguito al riconoscimento della sindrome per una patologia associata (feocromocitoma o iperparatiroidismo).

Tutti i pazienti con MTC, anche in assenza di evidenza di metastasi linfonodali cervicali all'ecografia del collo, devono essere sottoposti a tiroidectomia totale e dissezione del comparto centrale (144). La linfadenectomia laterocervicale ipsilaterale, anche in assenza di lesioni linfonodali evidenti all'ecografia del collo, dovrebbe essere considerata in base ai valori di Ct (145). In pazienti con MTC ed evidenza all'imaging di lesioni metastatiche linfonodali laterocervicali ipsilaterali, oltre alla linfadenectomia ipsilaterale e del comparto centrale, deve essere considerata una dissezione linfonodale controlaterale in presenza di livelli di Ct > 200 pg/ml (50).

## 2. VITAMINA D

Con il termine vitamina D (Vit D) si intende un gruppo di pro-ormoni di natura steroidea, in particolare ci si riferisce alle due forme principali in cui si può trovare la vitamina D:

- Vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferolo) di derivazione vegetale;
- Vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferolo) di origine animale da derivati del colesterolo

Entrambi questi composti sono privi di efficacia e devono essere attivati. Tuttavia la maggior parte della vitamina D viene prodotta in maniera endogena a livello della cute (146).

1,25-diidrossivitamina D non può essere considerato un indice attendibile, a causa della breve emivita (<4 ore), al contrario la 25-idrossivitamina D risulta essere affidabile ed il suo valore viene utilizzato per monitorare i livelli di Vit D nel nostro organismo. Di seguito sono riportati i parametri per valutare lo status vitaminico D:

- sufficienza: > 30 ng/ml (>75 nmol/L)
- insufficienza: 21-29 ng/ml (51-74 nmol/L)
- carenza: < 20 ng/ml (<50 nmol/L)

Purtroppo, le metodiche d'analisi disponibili in commercio portano a risultati di livelli di Vit D, su uno stesso campione, ampiamente diversi l'uno dall'altro.

## 2.1. FISILOGIA E PRODUZIONE

La vitamina D, come accennato nel paragrafo precedente, viene assunta e prodotta in forma inattiva e necessita perciò di una serie di trasformazioni enzimatiche che le consentano di passare da pro-ormone alla forma attiva, il 1,25-diidrossicolecalciferolo [1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriolo].

La vitamina D è liposolubile e viene assorbita a livello duodenale e digiunale e successivamente distribuita attraverso la circolazione linfatica quasi totalmente al tessuto adiposo da cui viene poi rilasciata in piccole quantità, ciò giustifica l'ipovitaminosi riscontrabile nei grandi obesi. Altri fattori che influenzano la sintesi sono l'età, la superficie e lo spessore della cute esposta al sole, il tempo di irradiazione, l'utilizzo di creme schermanti...(147)

La quota preponderante della vitamina D (80%) origina dall'attivazione del 7-deidrocolesterolo presente nella cute che viene convertito grazie ai raggi ultravioletti (UVB con lunghezza 290-315nm) in colecalciferolo. I raggi UVB oltre a sintetizzare Vit D provvedono anche alla sua inattivazione (151), permettendo in tal modo di evitare accumuli o sindromi ipervitaminosiche.

La vitamina D come tale resta per pochissimo tempo in circolo, la maggior parte viene veicolata al fegato dove subisce la prima idrossilazione diventando 25(OH)-D (calcidiolo), infine subirà un'ulteriore idrossilazione, ad opera dell' $\alpha$ -idrossilasi renale, in posizione 1 formando il calcitriolo. La 25(OH)-D viene idrossilata anche in posizione 24 ottenendo un isomero inattivo ma a lunga emivita (Fig.1)(181). Quindi i pazienti che presentano una grave insufficienza renale (stadio III-IV) sono gli unici in cui è indicata una supplementazione con metabolita attivo (1-calcidiolo).

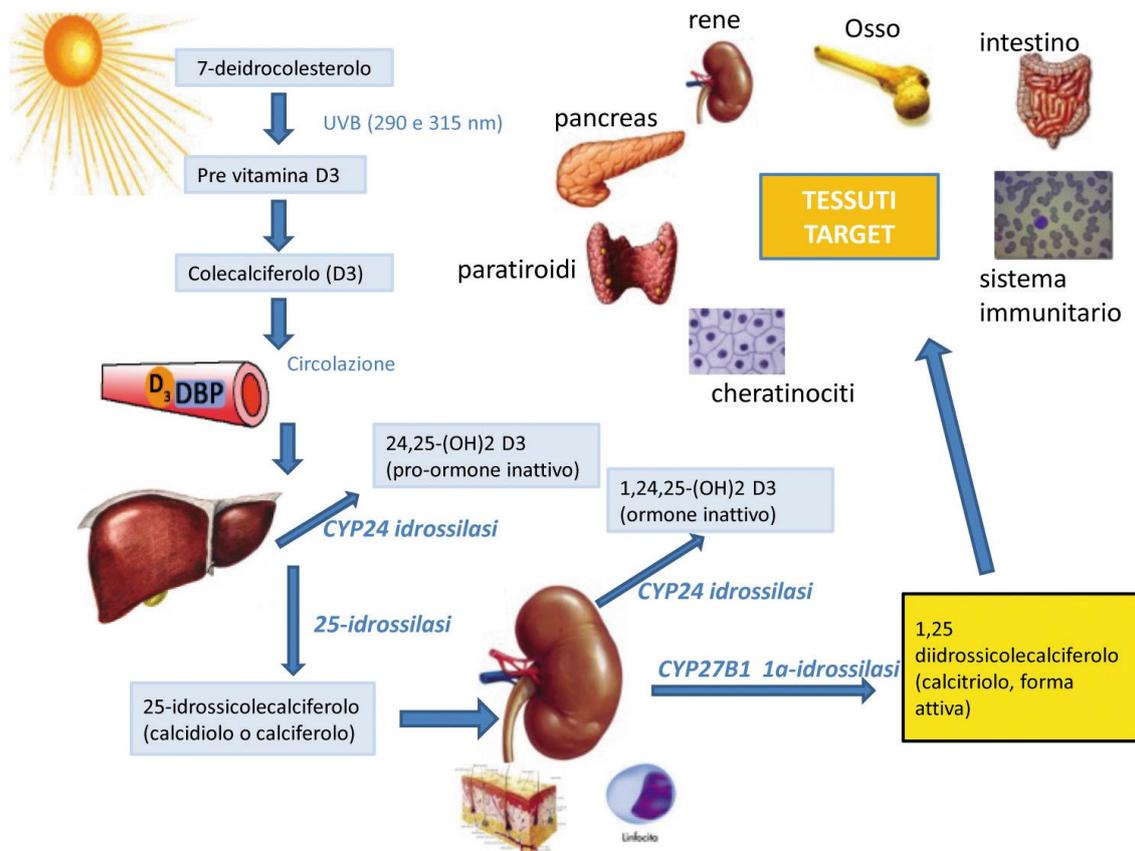


Figura 1 Pathway di sintesi, attivazione e catabolismo del sistema vitaminico D.

Oltre ad essere trasformata nel fegato e nel rene, la vitamina D può essere metabolizzata da molte altre cellule, in particolare da quelle del sistema immunitario e dei cheratinociti (149,151,152). Nel sistema immunitario la vitamina D agisce prevalentemente su sistema linfoide aumentandone l'azione specifica e limitando gli effetti sistemici. Inoltre, i macrofagi ed alcune cellule dendritiche esprimono tutti gli enzimi necessari per convertire la vitamina D in 1,25-diidrossivitaminina D, spiegando la patogenesi dell'ipercalcemia e dell'ipercalciuria in malattie associate all'attivazione del sistema immunitario come sarcoidosi, tubercolosi, artriti infiammatorie, morbo di Crohn e disordini linfoproliferativi delle cellule T (153).

I meccanismi regolatori del metabolismo della vitamina D sono complessi (Fig. 1): il calcio, il fosforo ed alcuni ormoni; tra i più importanti abbiamo il paratormone (PTH) e la calcitonina (148).

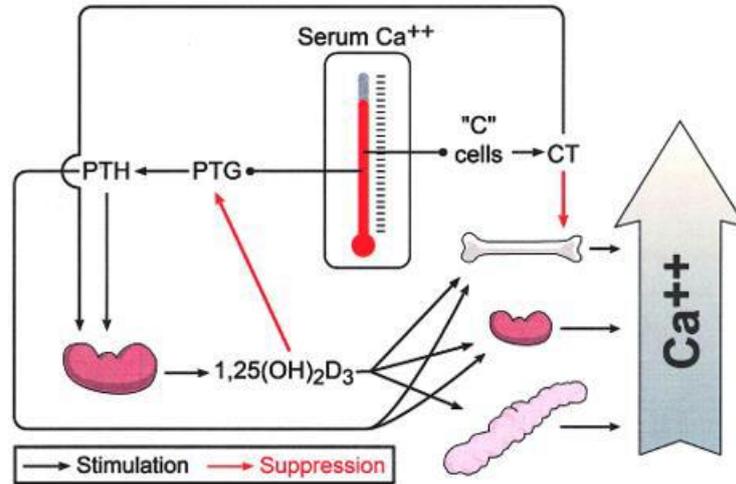


Figura 2 Pathway di secrezione e azione della Vit D

Il recettore della vitamina D (VDR) è l'unico recettore in grado di interagire con la forma attiva della Vit. D. sono stati individuati due diversi tipi di recettori:

- Il primo, localizzato nel nucleo, appartiene alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei di classe 2, strettamente legato al recettore dell'acido retinoico ed a quello dell'ormone tiroideo (148). Si eterodimerizza con RXR e insieme si legano ai VDREs (vitamin Response elements), stimolando direttamente l'espressione genica.
- Il secondo, è localizzato sulla membrana cellulare ed agisce inducendo secondi messaggeri (cAMP, diacilglicerolo, inositolo trifosfato, acido arachidonico) o fosforilando alcune proteine cellulari.

Questi recettori sono ubiquitari, perciò, hanno un ruolo fisiologico non solo nel metabolismo minerale ma anche in numerose altre funzioni dell'organismo.

## 2.2. EFFETTI DELLA VITAMINA D

La carenza di Vitamina D in età infantile può portare a rachitismo con deficit di accrescimento dell'apparato muscolo scheletrico e mancata deposizione di Ca. mentre nell'età adulta tipicamente può esacerbare una condizione di osteopenia o osteoporosi, causando osteomalacia e debolezza muscolare, aumentando i rischi di frattura. La 1,25-diidrossivitamina D è un ormone fondamentale per l'omeostasi ossea e il mantenimento delle concentrazioni di  $\text{Ca}^{++}$  e fosfato attraverso 3 meccanismi (Fig. 3):

1. Induce sintesi a livello intestinale delle proteine coinvolte nell'assorbimento di calcio e fosfato;
2. Stimola il RANK ligando negli osteoblasti attivando la osteoclastogenesi e accelerando il riassorbimento osseo (148);
3. Interviene sui tubuli distali renali aumentando il riassorbimento di calcio e fosfato, agendo in maniera sinergica al PTH (148);

La forma 25-idrossivitamina D, peraltro, comporta una più potente stimolazione, rispetto alla forma 1,25-diidrossivitamina D, ai fini del riassorbimento renale di calcio e fosfato e può rappresentare il mediatore maggiormente attivo nella regolazione dei flussi di calcio e della contrattilità a livello muscolare.

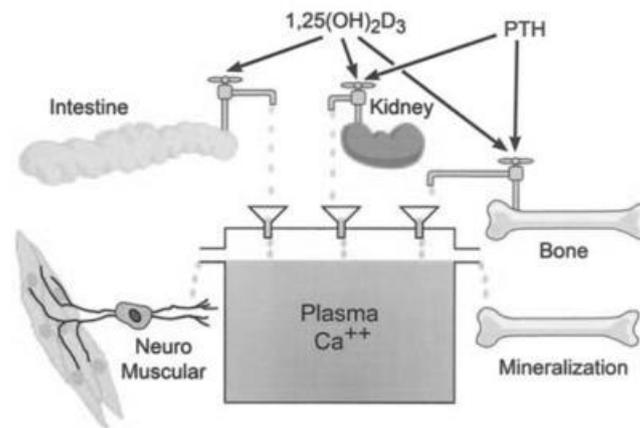


Figura 3 Input e output del Ca sotto stimolazione da Vit D

La vitamina D svolge importanti funzioni anche a livello extra-scheletrico. È stata infatti osservata la presenza di recettori per la vitamina D in vari tipi cellulari ed è stata documentata l'espressione della 1 $\alpha$ -idrossilasi nei macrofagi attivati, negli osteoblasti, nei

cheratinociti e a livello di prostata, colon e mammella. La produzione locale di 1,25(OH)<sub>2</sub>D non contribuisce al mantenimento dell'omeostasi calcemica e lo dimostra il fatto che i pazienti nefrectomizzati o con grave insufficienza renale presentano livelli indosabili; la produzione locale invece sarebbe implicata nei meccanismi di regolazione paracrina della crescita cellulare, compresa quella tumorale (154,155). La correlazione negativa riscontrata tra i livelli di 1,25(OH)<sub>2</sub>D e renina suggeriscono un possibile ruolo della Vit. D nella regolazione della pressione arteriosa (156).

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D non solo modula la crescita cellulare e la differenziazione, ma comporta la produzione di beta-defensine e catelicidina e modula la produzione di citochine anti-infiammatorie quali IL-4 ed IL-5.

In considerazione di queste molteplici azioni non sorprende che sia stata ritrovata una correlazione tra numerose malattie, in diversi ambiti della medicina (infettivologico, autoimmune, endocrinologiche, respiratorie, cardiovascolari e oncologico), nonostante queste evidenze il dibattito sulla correlazione e il ruolo della vitamina D è ancora aperto soprattutto per quanto riguarda la correlazione con la progressione neoplastica.

### 2.3. SUPPLEMENTAZIONE DI VITAMINA D

Non esistono linee guida internazionali sulla supplementazione della Vit D, infatti è molto difficile stabilire una dose giornaliera raccomandata. Esistono linee guida diverse per ogni società scientifica (Tab. 7), le quali sono state recentemente aggiornate con un abbassamento delle concentrazioni medie di Vit. D somministrata (182).

Pawel Pludoski, nel 2018 (158) ha effettuato una revisione di tutte le diverse linee guida, suggerendo la massima dose di supplementazione per fascia di età, e riassumendole nel seguente pattern di somministrazione:

- •1000 UI/die (25 mcg/die) per neonati (max 1 mese di vita)
- •2000 – 3000 UI/die (50-75mcg/die) per gli infanti da 1 a 12 mesi di vita
- •3000 – 5000 UI/die (75- 125 mcg/die) per bambini ed adolescenti da 1 a 18 anni d'età
- •7000–10000 UI/die (175-250mcg/die) o 50000 UI/settimana (1250 mcg/settimana) per adulti e anziani

*Tabella 7: Valori di introito di Vit. D superiori accettabili in pazienti sani\**

\*The upper limit did not apply to individuals with certain medical conditions such as normocalcaemic hyperparathyroidism and granulomatous conditions (sarcoidosis and tuberculosis) which predispose to hypercalcaemia, or to those with genetic conditions such as familial hypocalciuric hypercalcaemia. ESPG, Endocrine Society Practice Guideline; SACN, Scientific Advisory Committee on Nutrition; IOM, Institute of Medicine; EFSA, European Food Safety Authority

Age	ESPG	SACN	IOM	EFSA
Infant	0-6 m: 1000 IU (25 µg)/d 6-12 m: 1500 IU (37.5 µg)/d	1000 IU (25 µg)/d	0-6 m: 1000 IU (25 µg)/d 6-12 m: 1500 IU (37.5 µg)/d	1000 IU (25 µg)/d
1-10 y	1-3 y: 2500 IU (62.5 µg)/d 4-8 y: 3000 IU (75 µg)/d	2000 IU (50 µg)/d	1-3 y: 2500 IU (62.5 µg)/d 4-8 y: 3000 IU (75 µg)/d	2000 IU (50 µg)/d (children and adolescents)
11-17 y	>8 y: 4000 IU (100 µg)/d	4000 IU (100 µg)/d	9-18 y: 4000 IU (100 µg)/d	
Adult	4000 IU (100 µg)/d	4000 IU (100 µg)/d	19->70 y: 4000 IU (100 µg)/d	4000 IU (100 µg)/d

Siccome l'alimentazione in Italia fornisce in media circa 300 UI/die, consigliano, qualora l'esposizione solare fosse virtualmente assente, di garantire supplementi per 1.200-2.000 UI/die. Inoltre, secondo gli autori italiani la dose massima giornaliera oltre cui è ritenuto elevato il rischio di intossicazione è stata identificata in 4.000 UI.

Nei soggetti con malassorbimento intestinale la vitamina D dovrebbe essere somministrata in dosi superiori: 50000 UI/2-3 volte a settimana o in formulazione intramuscolare.

I Pazienti con insufficienza epatica o renale cronica necessitano la somministrazione di metaboliti attivi di vitamina D: per deficit epatico è raccomandato l'uso di calcifediolo; mentre per l'IRC l'alfacalcidiolo o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriolo).

Le cause di ipovitaminosi (151,152,157) per cui si può necessitare di supplementazione sono:

- |  |   |
|--|---|
| 1. produzione cutanea compromessa;   | 6. malassorbimento  |
| 2. farmaci: antiepilettici, glucocorticoidi, rifampicina, iperico, HAART (terapia anti-retrovirale); | 7. allattamento al seno   |
| 3. obesità (sequestro di vitamina D nel tessuto adiposo);  | 8. disordini genetici ereditabili: mutazione dei geni codificanti CYP27B1 o il VDR  |
| 4. insufficienza epatica;  | 9. disordini acquisiti: produzione ectopica noplastica di FGF 23, Iperparatiroidismo, sarcoidosi, TBC, linfomi, ipertiroidismo, |
| 5. nefropatie: IRC, sindrome nefrosica   | invecchiamento, uso di protezione solare (SPF 15), pigmento cutaneo   |

### **3. BACKGROUND**

#### **3.1. IPOVITAMINOSI D: conseguenze oncologiche**

Da diverse decine d'anni, in letteratura, diversi studi hanno evidenziato uno stato deficitario di vitamina D in pazienti affetti da diverse forme tumorali; solo recentemente però sono stati esplicitati i diversi meccanismi con cui la vitamina D potrebbe presentare un effetto modulatore sulle cellule tumorali (159): 1,25(OH)<sub>2</sub>D stimola l'espressione cellulare degli inibitori del ciclo p21 e p27 (160) e l'espressione della molecola d'adesione cellulare E-caderina; mentre inibisce l'attività trascrizionale della Beta-catenina (161, 162). Queste azioni potrebbero bloccare il potenziale proliferativo delle cellule.

Nei cheratinociti la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D promuove la riparazione di eventuali danni del DNA indotto dai raggi UV ed incrementa l'espressione cellulare di p53 nelle cellule danneggiate (163).

La vitamina D eserciterebbe inoltre attività antineoplastica attraverso molecole chiavi coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare; tra queste si ricordano c-Myc e c-Fos (164). Nello specifico è stato osservato come la vitamina D sopprima l'espressione dell'oncogene c-Myc e, pertanto, promuova l'incremento dell'espressione di un suo antagonista, l'inibitore trascrizionale MAD1/MXD1.

L'effetto antiproliferativo della vitamina D sarebbe inoltre legato alla sua capacità d'incrementare l'espressione dell'insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGF-BP3), inibendo così il segnale mitogeno da parte di fattori di crescita come l'insulin like growth factor 1 (IGF-1) ed inducendo l'apoptosi cellulare attraverso la soppressione di fattore antiapoptotici come il BCL2 (165).

La vitamina D stimola la differenziazione cellulare ed inibisce l'invasione e lo sviluppo di metastasi attraverso l'incremento dell'espressione di E-caderina, un gene inversamente correlato alla capacità metastatica del tumore (166). Inoltre, inibendo l'angiogenesi, attraverso l'espressione di fattori di crescita endoteliali (167), riduce l'invasione ed il potenziale di crescita del tumore.

Nella tabella 8 vengono riassunti i meccanismi d'azione antitumorali della vitamina D (168).

Non tutti i meccanismi di funzionamento della vitamina D sono oggi compresi, tuttavia risulta chiaro il suo ruolo nel miglioramento dell'outcome e nella prevenzione della malattia neoplastica.

<b>Proliferation</b>	Increase in p21 and p27 expression <sup>116</sup>
	Decrease in CDKs, cyclins, MYC and RB expression <sup>117</sup>
<b>Apoptosis</b>	Increase in BAX <sup>118</sup>
	Decrease in BCL-2 <sup>119</sup>
	Increased sensitivity to radiation and chemotherapy <sup>120</sup>
<b>Differentiation</b>	Myeloid leukemia cells differentiate into monocytes <sup>121</sup>
	Increased expression of differentiation factors such as casein, lipids, PSA, E-cadherin <sup>82,83</sup>
<b>Inflammation</b>	Inhibition of expression of COX2, PG receptors, stress kinase, and NF-κB signaling <sup>12,122</sup>
	Increased TIMP 1 and E-cadherin response <sup>123</sup>
<b>Invasion and metastasis</b>	Decreased expression of MMP9, α6 integrin, α4 integrin, plasminogen activator <sup>123</sup>
<b>Angiogenesis</b>	Decreased HIF1 α, VEGF, IL-8, tenascin C, PGE2 levels <sup>124</sup>

CDK indicates cyclin-dependent kinase; COX2, cyclooxygenase 2; HIF1 α, hypoxia inducible factor 1alpha; IL-8, interleukin 8; MAPK5, mitogen activated protein kinase phosphatase 5; MMP9, metalloproteinase 9; NF-κB, nuclear factor κB; PG, prostaglandin; 15-PGDH, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase; PGE, prostaglandin E; POL II, polymerase II; PSA, prostate-specific antigen; TIMP1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Tabella 8

Un importante studio denominato VITAL 2018, pubblicato sul The New England Journal of Medicine (179), randomizzato, in cui 25871 partecipanti sono stati suddivisi in due bracci, di cui uno solo in trattamento con colecalciferolo alla posologia di 2000UI/die. Dopo un follow-up di 5 anni circa, veniva diagnosticata una neoplasia in 1617 partecipanti ma senza correlazione statisticamente significativa (793 nel gruppo trattato con vitamina D ed 824 in quelli con placebo, HR 0.96; 95% con CI 0.88-1.06; P=0.47), per cui lo studio concludeva che la supplementazione con vitamina D non riduceva la comparsa di tumore invasivo.

Tuttavia una metanalisi recentissima, di luglio 2019, di autori cinesi (180), che ha analizzato 52 diversi trials clinici, per un totale di 75454 partecipanti, ha evidenziato come la supplementazione di vitamina D riduca in maniera statisticamente significativa il rischio di mortalità per neoplasia di circa il 16% (RR 0.84; 95% CI 0.74-0.95).

Rimane dibattuta la possibilità di un miglior outcome nei pazienti neoplastici supplementati con vitamina D.

### 3.2. IPOVITAMINOSI D: risvolti sulle NEN

Un case report del 2013 (169) ha riportato come una donna affetta da carcinoma polmonare tipico presentasse un'importante osteoporosi ed ha posto il quesito se si trattasse di una semplice coincidenza o meno. Poco più tardi, nel 2014, uno studio francese su pazienti affetti da carcinoma a cellule di Merkel (170), ha ipotizzato, come per i diversi studi su melanoma, che ci fosse un'associazione tra i livelli di vitamina D e le caratteristiche tumorali e la prognosi. In particolare, gli autori hanno trovato una correlazione tra il deficit di vitamina D ed una dimensione maggiore del tumore alla diagnosi ( $p=0.006$ ) ed una prognosi peggiore, intesa come una minor PFS ( $p=0.029$ ) come si può osservare dalle curve di Kaplan–Meier (Grafico 1). Tuttavia, lo studio presentava alcuni bias legati alla mancata valutazione dell'indice di massa corporea come possibile fattore confondente i livelli di 25OHvitD ed il tempo del prelievo ematico, in quanto gli autori avevano considerate come valore basale di 25OHvitD anche prelievi eseguiti fino a tre anni dalla diagnosi di MCC.

Nel 2016 sono stati pubblicati 3 articoli riguardanti la vitamina D ed i NET: uno studio nutrizionale svedese (171) comprendente 50 pazienti affetti da NET del piccolo intestino sono stati valutati biochimicamente per il loro valore di 25(OH)D e radiologicamente tramite densitometria ossea; gli autori hanno rilevato un importante deficit di colecalciferolo ed una riduzione del bone mineral density (BMD) in più del 50% dei pazienti. Una nota importante è che non è stata osservata alcuna correlazione statisticamente significativa tra i valori di 25(OH)D e l'età, il sesso, l'intervento chirurgico, il trattamento con analoghi della somatostatina, presenza di steatorrea. Gli stessi autori hanno quindi diviso i pazienti in due coorti e solo alla seconda coorte è stata avviata supplementazione con vitamine e sali minerali per almeno 6 mesi mostrando valori finali di vitamina D sufficienti nella sola coorte in trattamento, suggerendo quindi come raccomandazione pratica di controllare lo stato vitaminico in questi pazienti e di effettuare una terapia integrativa.

Uno studio in vitro internazionale dello stesso anno (172) ha dimostrato come in linee cellulari di insulinoma di topo (rat insulinoma cell line – RIN-m) esprimano VDR, ma soprattutto che il trattamento con 1,25(OH)<sub>2</sub>D o con il 19 Nor-2alfa-3idrossipropil-1alfa,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (MART-10), un nuovo analogo che ha prospettato in altri studi una sua azione antitumorale (173,174), comporti un incremento della percentuale di cellule RIN-m allo stadio G1/G0, indicando perciò come questi 2 agenti possano indurre un arresto del ciclo cellulare al G0/G1 ed indurre apoptosis cellulare. L'effetto antiproliferativo di 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e MART-10 risulta esser dose-dipendente, in questo senso risulterebbe più agevole nella pratica clinica l'uso di MART-10 che presenta un minor effetto ipercalcemico.

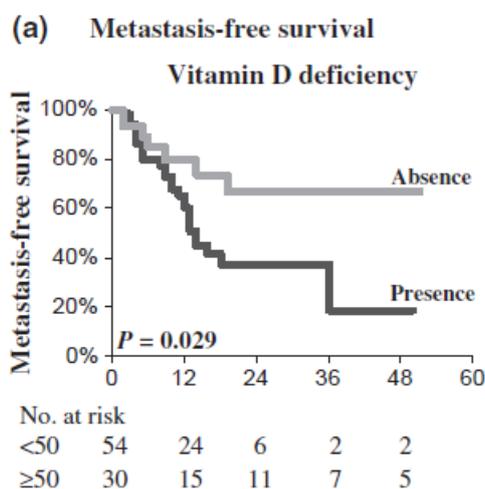


Grafico 1: Kaplan–Meier curves for nodal and distant metastasis-free survival (a) and MCC-specific survival

Uno studio polacco (175) su 36 pazienti affetti da NET (23 GEP-NET- 7 NET del polmone e 6 classificabili in altre forme), alcuni in trattamento con analogo della somatostatina (5 in octreotide e 14 in lanreotide), altri senza SSA, ha comparato i livelli di vitamina D di questi pazienti con 16 controlli sani senza aver dimostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra le due popolazioni. Anche i livelli di vitamina D non sono risultati differenti tra le diverse forme di NET, così come non si sono osservate differenze dei valori sierici di 25(OH)D nei pazienti NET trattati o non trattati con SSA (Grafico 2). Nessuna correlazione neppure tra i livelli di vitamina D e quelli di cromogranina A. Un possibile bias dello studio potrebbe esser che il kit per il dosaggio di 25(OH)D (Roche, Mannheim Germany) misuri altri metaboliti della vitamina D come il 3-epimero 25(OH)D, presente normalmente nel siero di diverse persone in percentuali variabili

(fino ad un 5% del valore stimato di 25(OH)D) e con un'attività ancora poco chiarita; ma anche la 24,25(OH)<sub>2</sub>D che si trova presente nel siero dal 2 al 10% del valore totale di 25(OH)D. Lo studio concludeva asserendo che il deficit di vitamina D è un problema che non riguarda solo i pazienti affetti da NET, ma che è molto diffuso nella popolazione in generale, e pertanto veniva suggerita terapia integrativa anche in relazione alle possibili azioni anti-tumorali della stessa.

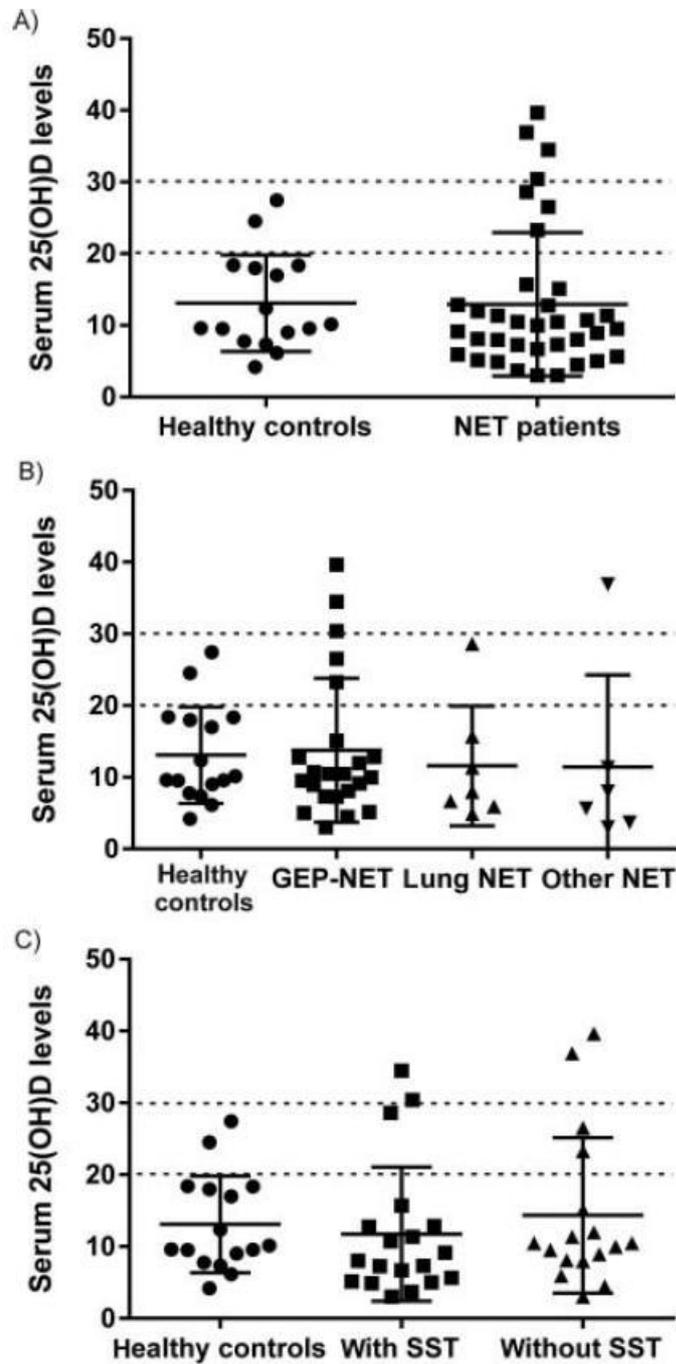


Grafico 2: Livelli di 25OH VitD nel gruppo di studio NEN e nei soggetti sani, secondo origine primitiva, terapia con analoghi della somatostatina

Ad oggi però lo studio più importante in questo ambito è uno studio italiano (176), in cui Massironi et al. hanno dimostrato un' elevata prevalenza di deficit di vitamina D in una popolazione di GEP-NEN (138 pazienti): il 68% dei pazienti presentava valori di 25(OH)D < 20ng/mL e, a differenza dello studio precedente, veniva osservata una differenza statisticamente significativa nei livelli di vitamina D tra i pazienti con NEN ed i controlli (Fig. 7); veniva registrata una differenza significativa nei livelli di vitamina D tra i pazienti trattati con SSA e quelli non trattati (Fig. 8); inoltre questo studio dimostrava una correlazione inversa tra i livelli di 25(OH)D, l'OS ( $p=0.03$ ,  $r_s=-0.18$ ) e la PFS ( $p=0.01$ ,  $r_s=-0.22$ ) (Fig. 9). Gli autori evidenziavano come una supplementazione di vitamina D potesse influenzare l'outcome del paziente: lo studio infatti mostrava un'associazione statisticamente significativa tra la supplementazione di vitamina D e l'OS ( $p=0.035$ ). Come per altri studi già citati, un possibile bias per questo studio è rappresentato dalla mancata esclusione dei pazienti con BMI elevato e dalla assenza di una chiara definizione dei livelli di "vitamina D al baseline".

Sempre nel 2017 Chiang KC et al. (177) pubblicavano uno studio in vitro utilizzando l'analogo della vitamina D MART-10 e dimostrando, su cellule di PanNETs, una sua azione nel ridurre l'espressione di VEGF, normalmente responsabile della migrazione ed invasione delle cellule di PanNET e quindi coinvolto nello sviluppo di metastasi.

Nel 2018 uno studio inglese (178) su 183 pazienti affetti da GEP-NET ha confermato che questa categoria di pazienti presenta allo stadio iniziale di malattia un deficit di vitamina D in circa il 66% dei casi.

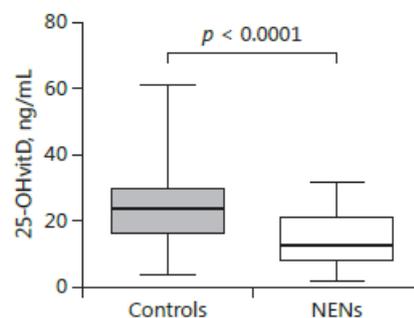


Grafico 3 Valori di 25-OHvitD nei pazienti con NEN rispetto ai controlli (mediana 12,9 vs. 23,9 ng / mL,  $p < 0,0001$ ). Adattato da Massironi et al. 2017 (176).

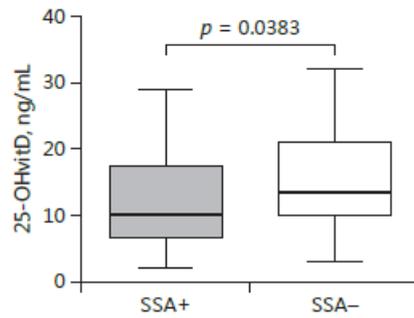


Grafico 4 Livelli circolanti di 25 OHVitD in pazienti trattati con analoghi della somatostatina (SSA+) rispetto a quelli non trattati (mediana 10 contro 13,5 ng /mL;  $p < 0,05$ ). Adattato da Massironi et al. 2017 (176).

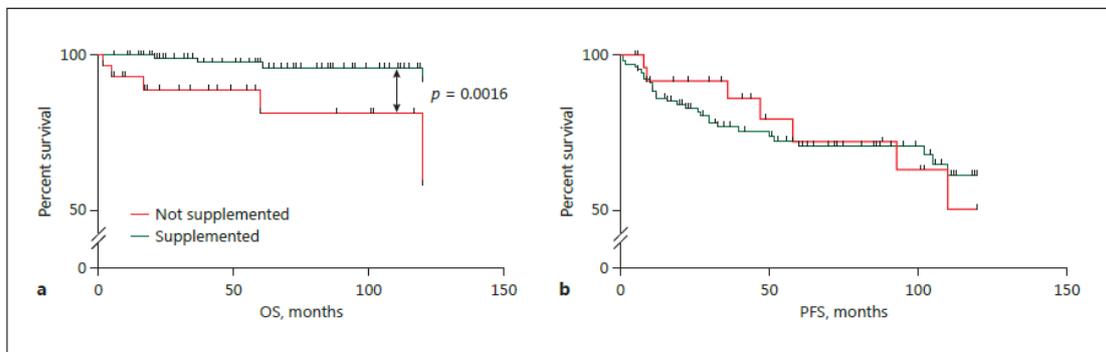


Grafico 5 a) Sopravvivenza globale (OS) dei pazienti che hanno ricevuto un'integrazione di vitamina D rispetto a quelli che non la hanno ricevuta. b) Sopravvivenza libera da progressione (PFS) dei pazienti che hanno ricevuto un'integrazione di vitamina D rispetto

# **MATERIALI & METODI**

---

## **1. SCOPO DELLO STUDIO**

Gli scopi di questo studio osservazionale retrospettivo-prospettico sono stati:

- valutare la prevalenza di deficit di vitamina D in pazienti con neoplasie neuroendocrine, in confronto alla popolazione generale sana;
- valutare la possibile correlazione tra il deficit di vitamina D e il rischio di progressione o come fattore prognostico per NEN correlando l'ipovitaminosi D alla presenza di metastasi alla diagnosi di NEN, alla sopravvivenza globale (overall survival, OS) ed alla sopravvivenza libera da progressione (progression free survival, PFS).
- valutare l'impatto che la correzione della vitamina D ha in pazienti affetti da NEN e identificare un pattern di progressione specifico.

## **2. RACCOLTA DATI**

La raccolta dei dati è avvenuta nell'arco di 12 anni, dal 2009 al 2021, durante i quali tramite visite ambulatoriali sono stati raccolti, in maniera periodica, i dati riguardanti i livelli di: Vit D, PTH, Ca, P e creatinina, oltre dati riguardanti parametri antropometrici e andamento della malattia oncologica di cui erano affetti i pazienti.

Al termine di questi 12 anni, tutti i dati sono stati riuniti in un database costituito da 420 pazienti e rapportati alla mortalità e all'evoluzione della malattia in base alla correzione della vitamina D. Ottenendo in questo modo un profilo prognostico dei valori di vitamina D in soggetti affetti da NEN.

## **3. CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE**

Dal 2009 al 2021, sono stati valutati presso il nostro centro, 420 pazienti affetti da neoplasie neuroendocrine, di questi sono stati preliminarmente selezionati 237 pazienti che avessero effettuato almeno una misurazione dei livelli di 25 OH vitamina D, calcio, fosforo, PTH e creatinina. Dallo studio sono stati poi esclusi tutti i pazienti affetti da iperparatiroidismo primitivo, insufficienza renale o epatica e coloro che presentavano BMI >35 kg/mq alla diagnosi: pertanto sono stati valutati per l'analisi statistica 204 pazienti (118 femmine e 86 maschi) pazienti. Le principali caratteristiche cliniche,

biochimiche ed istologiche della popolazione in esame sono state analizzate e riportate nella tabella n° 9.

Le caratteristiche cliniche prese in considerazione sono state: la presenza di ipovitaminosi D nei pazienti presi in esame, il progression free survival (PFS) e l'overall survival (OS). La storia clinica, i trattamenti, i dati biochimici e le risposte obiettive di tutti i pazienti sono state registrate e valutate. Tutti i soggetti in corso di supplementazione di vitD, neoplasia avanzata, iperparatiroidismo primario noto, con insufficienza renale o epatica e BMI>35 Kg/mq sono stati esclusi anche dal gruppo di controllo.

#### **4. PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DEI LIVELLI VIT.D**

In tutti i pazienti (NEN e controlli) i livelli di 25 OH vitamina D sono stati misurati con test immunologico di chemiluminescenza (chemiluminescence immunoassay CLIA) tramite kit LIASON, DIA, Sorin; con una sensibilità funzionale di 4 ng/ml. Il CV intra-dosaggio ed inter-dosaggi è di 6%. È stato considerato come un valore indicativo di adeguato apporto di vitamina D un livello sierico > 30 ng/ml.

I livelli di paratormone (PTH) sono stati misurati tramite immuno-chemi-illuminiscenza (LIASON N-tact PTH, DIA Sorin, Saluggia, VC, Italia). La riproducibilità dei dati della metodica è risultata ottimale. Le variazioni intra- e inter-dosaggio espresse come coefficiente di variazione (CV) era del 6% e la sensibilità funzionale era 2 pg/ml. Nel nostro laboratorio, il range di normalità del PTH è <65 pg/ml.

Calcio e fosforo sierico e creatinina sono stati misurati tramite le tecniche colorimetriche standard su campioni di sangue eparinizzato.

#### **5. ANALISI STATISTICA**

L'analisi descrittiva è stata effettuata utilizzando frequenza, media, range, mediana e range interquartile (IQR, 25°-75° percentile). La PFS è stata definita come l'intervallo tra la diagnosi e la data di progressione di malattia. La OS è stata definita come l'intervallo tra la diagnosi e la data del decesso. La PFS e l'OS sono state valutate utilizzando il metodo Kaplan-Meier e i risultati sono stati confrontati utilizzando il test log-rank.

I fattori di rischio predittivi di risposta alla terapia sono stati valutati mediante analisi univariata e multivariata, utilizzando il metodo dei rischi proporzionali di Cox. I fattori di rischio sono stati espressi come Hazard Ratio (HR) ed è stato utilizzato l'intervallo di confidenza (CI) al 95%. L'analisi multivariata è stata effettuata utilizzando il metodo

forward stepwise dopo aver incluso tutte le variabili. Il confronto tra sottogruppi è stato effettuato con il test Chi-quadro di Person (ove possibile è stato applicato il test esatto di Fisher) per variabili discrete ed il Mann-Witney U test o il test di Kruskal-Wallis per le variabili continue.

Tutte le analisi effettuate sono state riportate in tabelle e curve. Il valore p è stato considerato significativo quando inferiore a 0.05. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando software dedicato (IBM – SPSS Statistics v. 22).

## RISULTATI

---

Nello studio sono stati considerati 204 pazienti, di cui 118 erano donne (58%) e 86 erano uomini (42%). L'età media alla diagnosi era di 62 anni (13-89, 95%CI 57.5 – 64,5), e il BMI medio 24,0 Kg/ m<sup>2</sup> (16.4-21-1, 95%CI 22.5 – 25.0 kg/ m<sup>2</sup>).

Il più comune sito di localizzazione è stato il pancreas (56 casi), seguito dal digiuno (40), i polmoni (30), lo stomaco (13), l'appendice (10), il colon (6) e il duodeno (2). In sei casi, è stato ritrovato più di un primitivo, mentre in 54 è stato descritto un sito differente di localizzazione del tumore rispetto al primitivo.

Successivamente all'intervento, 71 di questi sono stati classificati come grado I, 45 come grado II e 5 come grado III; per i rimanenti 83 i dati riguardanti il grado non erano disponibili, poiché 30 di questi pazienti presentavano un NEN polmonare nel quale la valutazione del grading non viene effettuata. La stima del Ki67 è disponibile in 134 report istologici, e il valore medio è 2% (0-100, 95%CI 2.0 to 3.0%).

Per le forme toraciche (30 casi) il 73% (22 casi) erano carcinoidi tipici e il restante 27% (8 casi) atipici.

A seguito dell'analisi si è riscontrato una percentuale di NEN secernenti del 34,8% (71 pazienti), mentre i pazienti affetti da sindrome associata sono il 31,8 (65 pazienti).

Inoltre, la malattia metastatica è stata riscontrata in 85 pazienti (42%).

Le caratteristiche clinico patologiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 9.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Popolazione totale</b>
<b>Totale pazienti, n</b>	204
<b>Maschi/Femmine, n</b>	86/118
<b>Età alla diagnosi, aa</b>	62 (13-89)
<b>BMI, kg/m2</b>	24 (16,4-21,1)
<b>Localizzazione del tumore primitivo, n</b>	
- <b>GEP-NEN</b>	127
○ <b>pNEN</b>	56
○ <b>GI-NEN</b>	71
▪ <b>Stomaco</b>	13
▪ <b>Duodeno</b>	2
▪ <b>Digiuno/ileo</b>	40
▪ <b>Appendice</b>	10
▪ <b>Colon/retto</b>	6
▪ <b>oculto</b>	
- <b>NEN polmone</b>	30
○ <b>Atipici</b>	4
○ <b>Tipici</b>	22
○ <b>LCNEC</b>	1
○ <b>(NA)</b>	3
- <b>Feocromocitoma/paraganglioma</b>	12/3
- <b>Carcinoma a cellule di Merkel</b>	4
- <b>Carcinoma midollare</b>	7
- <b>Altro</b>	5
○ <b>NEN del Timo</b>	3
○ <b>NEN dell'ovaio</b>	2
<b>Grading, n</b>	
<b>G1</b>	71
<b>G2</b>	45
<b>G3</b>	5
<b>Singoli/multipli %</b>	144/60
<b>Ki67%</b>	2%
<b>Funzionante/Non Funzionanti, %</b>	33/67

*Tabella 9 Caratteristiche clinico patologiche della popolazione in esame*

Alla prima valutazione, i valori medi di 25OHvitD sono 15.0 ng/mL (3.9-45.9, 95%CI 13.8-18.4mL), e in particolare l'ipovitaminosi è stata dimostrata in 177 soggetti (86.7%). Si è riscontrata una variazione sui livelli di Calcio che sono 9.5 (7.7-11.4, 95%CI 9.5 e 9.6) mg/dL, PTH 32.0 (8.3-347.0, 95%CI 29.0 to 35.0) ng/L, fosforo 3.1 (1.6-8.9, 95%CI 3.0 to 3.2) mg/dL e creatinina 0.9 (0.5-4.4, 95%CI 0.8-0.9) mg/dL. Tutte queste caratteristiche sono riassunte nella tabella 10.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Popolazione totale</b>	<b>controlli</b>
<b>25-OHvitD, ng/mL</b>	15,0 (3,9 – 45.9)	30,5 (16 - 60)
<b>PTH, ng/L</b>	32.0 (8.3 – 347)	34.5 (9 – 112)
<b>Ca, mg/dL</b>	9.5 (7.7 – 11.4)	
<b>P, mg/dL</b>	3.1 (1.6 – 8.9)	
<b>Creatinina, mg/dL</b>	0.9 (0.5-4.4)	

*Tabella 10 Metabolismo Vit D*

La durata media del follow-up è stata di 38,5 mesi (1.0-372.0, 95%CI 33.0 to 46.4). Per quanto riguarda l'outcome oncologico, una progression della malattia è stata documentata in 60 pazienti, e la media di sopravvivenza liberi da malattia è stata di 20 mesi (1.0-264.0, 95%CI 12.50 to 33.50). Dell'intera popolazione in studio, 22 pazienti sono deceduti a causa della progressione della malattia, con una sopravvivenza globale mediana di 39,0 (7,0 - 132,0, IC 95% da 14,0 a 66,6) mesi.

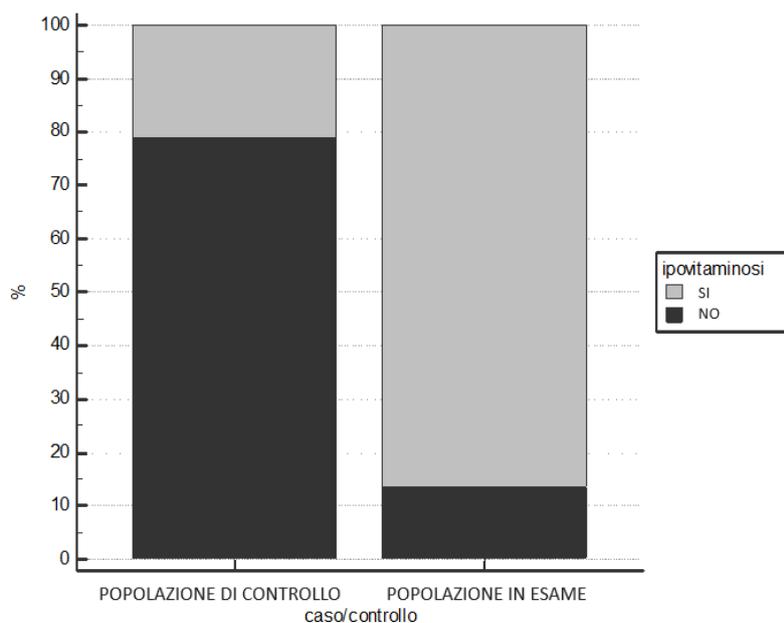
Durate il follow-up, 159 pazienti hanno avuto supplementazione con 25OHvitD, ma solo in 87 (54,7%) di loro è stato funzionale nell'ottenere adeguati livelli ematici di 25OHvitD.

## **Ipovitaminosi**

Nella popolazione totale il deficit di vitamina D inteso come 25OH vitD<30 ng/ml, al primo rilievo post-diagnostico, era presente nel 86.7% (177 pazienti su 204) dei casi e i livelli mediani erano di 15.0 (4 – 45,9). Nello specifico, il 29.9% presentava valori di 25OH vitD <10 ng/ml e il 18.7% aveva valori >30 ng/ml.

Nel sottogruppo baseline, il livello mediano di 25 OHvitD di 15.0 ng/ml (intervallo 4–46) risultava significativamente inferiore a quello dei controlli (mediana 30,5 ng/ml, intervallo 16–60, p <0,001) (Fig. 4). Nel dettaglio, 177 pazienti (86.7%) avevano livelli <30 ng/ml, di questi ultimi, 61 casi (30%) si presentavano con ipovitaminosi molto grave (25 OHvitD <10 ng/ml), 70 casi (34,3%) in ipovitaminosi grave (25 OHvitD <20 ng/ml), mentre 51 pazienti (25%) avevano livelli tra 20 e 30 ng/ml e 22 (10.7%) presentavano valori >30 ng/ml. Anche se il valore mediano PTH era 32 ng/l (intervallo 8–128). Il livello totale di calcio sierico mediano era 9,5 (intervallo 7,7 – 11,3) mg/dl (Tab. 10).

Il confronto della prevalenza di ipovitaminosi D della popolazione affetta da NEN (86,7%) con la popolazione di controllo (21,2%), mette in evidenza la maggiore incidenza del deficit di 25OHvitD nei pazienti affetti da questa neoplasia (Fig.4)



*Figura 4 Prevalenza ipovitaminosi D nelle NEN (1) e nei controlli (0).0*

La valutazione della mediana dei valori di vitamina D secondo il sito di origine delle singole neoplasie neuroendocrine ci permettono di mettere in evidenza che non ci sono sostanziali variazioni nei valori di 25OHvitD tra le diverse localizzazioni del tumore. Quindi possiamo affermare che l'ipovitaminosi D non sia correlata all'organo da cui ha origine la malattia (Grafico 6).

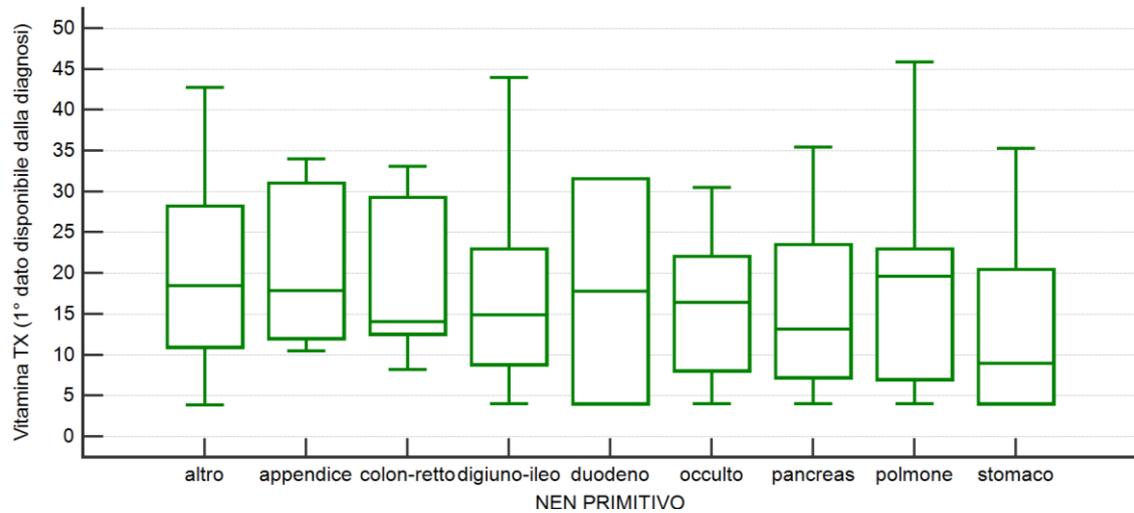


Grafico 6 Prevalenza ipovitaminosi D nei diversi NEN

## Sopravvivenza

L'efficacia nella supplementazione e nel raggiungere adeguati livelli di 25OHvitD non è associato al sesso ( $p=0.675$ ) o all'età della diagnosi ( $p=0.588$ ), mentre sembra essere legata al BMI ( $p=0.012$ ), il quale si è dimostrato più basso in coloro che raggiungono il giusto introito ( $23$  vs  $26\text{kg/ m}^2$ ,  $p=0.016$ ).

Non è stata trovata nessuna associazione tra i livelli di 25OHvitD alla diagnosi e il grado di malattia ( $p=0.252$ ), espressione del Ki67 ( $p=0.386$ ) o la presenza di metastasi ( $p=0.801$ ). Lo stato alterato della 25OHvitD non correla con il PFS ( $p=0.818$ ), invece, nel sottogruppo dei pazienti deceduti per la patologia neoplastica, è stata dimostrata una maggiore sopravvivenza (OS) in coloro che avessero adeguati livelli di 25OHvitD alla diagnosi. In particolare, abbiamo preso in considerazione tutti i pazienti deceduti nel nostro gruppo di ricerca, e li abbiamo divisi in pazienti ipovitaminosici D alla diagnosi e non ipovitaminosici D, ottenendo una stratificazione della sopravvivenza media dei due gruppi, che si è rivelata maggiore nei pazienti senza deficit di 25OHvitD ( $52.0$  vs  $8.0$  mesi,  $p=0.042$ ) (Grafico 7).

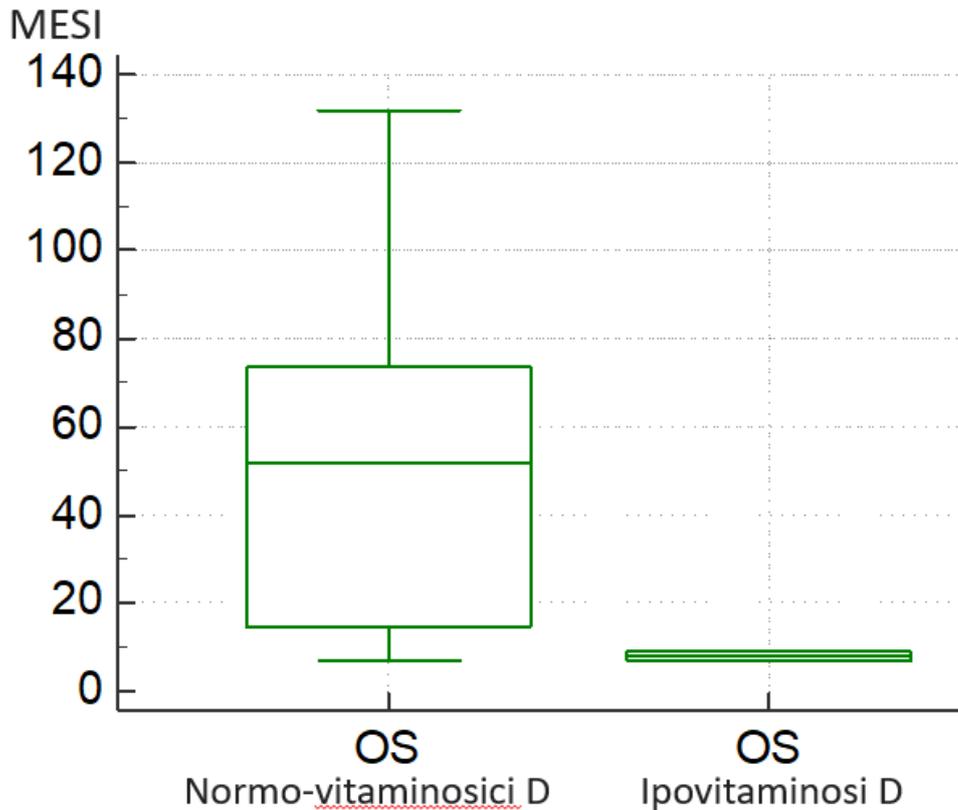


Grafico 7 OS pazienti con vitamina D in range alla diagnosi VS OS in pazienti non in range

Durante il Follow-up del gruppo di pazienti in esame, che hanno supplementato la carenza di Vit D con 25OHvitD, sembra esserci un miglioramento della sopravvivenza globale (OS) che risulta essere direttamente proporzionale al miglioramento dei livelli medi di vitamina D nel sangue ( $p=0.036$ )(Grafico 8)

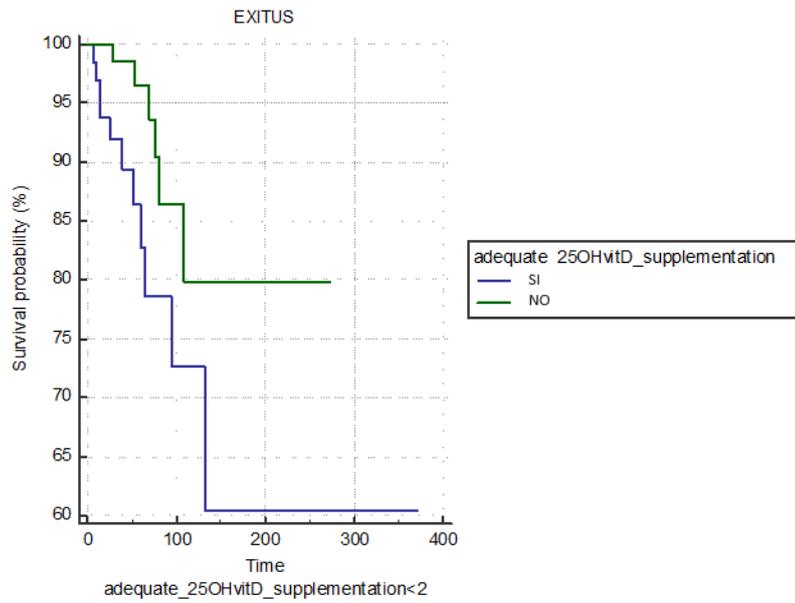


Grafico 8

## CONCLUSIONI

---

In letteratura sono presenti pochissimi studi riguardanti il rapporto tra ipovitaminosi D e l'impatto che questa ha sulla prognosi delle NEN, sia considerando il ruolo della vitamina D nella modulazione della risposta immunitaria e antitumorale, ruolo non ancora ben chiarito, sia considerando che non è ancora stato trovato un cut-off univoco per tutte le società scientifiche di valore minimo di Vit D.

Nel nostro studio retrospettivo-prospettico, monocentrico, la maggior parte dei pazienti presentavano valori di 25OHvitD più bassi rispetto ai controlli sani, con valori che si attestavano in media, di un punto inferiore rispetto ai controlli sani (15.0ng/mL; vn 16-60). Questi dati risultano in analogia con quanto riportato da Massironi et al. 2017 (176) e di Robbins et al 2018 (178), mentre sono in contrapposizione a quanto rilevato dallo studio di Motylewska et al (175).

Distaccandosi da quanto riportato da Massironi et al., ma mantenendo la stessa tendenza, la prevalenza di ipovitaminosi risulta essere del 87% tra i pazienti affetti da NEN, di cui in ipovitaminosi grave il 28,9%.

Dalla valutazione dei dati ottenuti dallo studio si evince un'elevata prevalenza di ipovitaminosi nella popolazione di NEN, e la differenza tra i livelli di 25OHvitD nei NEN e nei controlli sani, che potrebbero suggerire un ruolo del deficit come fattore di rischio per lo sviluppo di NEN.

Analogamente a quanto osservato da Massironi et al. (226) nel nostro studio non è stata riscontrata associazione tra ipovitaminosi e stadio della malattia, grading, PFS. Tuttavia, è stato riscontrato una correlazione significativa tra i livelli di 25OHvitD alla diagnosi e l'OS nel sottogruppo di pazienti deceduti per la patologia oncologica, in particolare a livelli maggiori di vit D corrisponde una migliore sopravvivenza del paziente, quantificabili in un miglioramento della sopravvivenza di 6,5 (52 mesi contro 8)(figura 6). Inoltre, coerentemente con quanto noto dalla letteratura, bassi livelli di vitamina D sono risultati associati ai BMI più elevati.

La mancata possibilità di correlare l'ipovitaminosi con il grading, il PFS, stadio della malattia o con una terapia antineoplastica ottimale potrebbe essere legata alla difficoltà di reperire dati precisi su ogni paziente che si articolano su diverse decadi e in diverse modalità tra cartaceo e digitale. Anche nel nostro studio, infatti, nonostante il follow-up

prolungato, si è evidenziata la difficoltà di raggiungere mediane di sopravvivenza a causa del carattere indolente della patologia in studio e, quindi, del ridotto numero di eventi, intesi come morte o progressione, registrati durante il follow-up. Un Bias potrebbe dato dalla popolazione di neoplasie fortemente differenziate G1 e G2, visto l'elevato numero di questi gradi di differenziazione nella nostra popolazione e del basso numero di casi G3. Un ulteriore motivo di errore nella correzione della vitamina D nei pz affetti da NEN ileale potrebbe essere l'eventuale trattamento chirurgico che il paziente avrebbe subito prima della supplementazione, il quale inficerebbe le capacità di assorbimento

Ciò premesso, il nostro studio ha evidenziato un significativo miglioramento della curva di sopravvivenza (OS) nei pazienti supplementati efficacemente con Vitamina D rispetto a quelli "non trattati". Questo dato, seppur da verificare ulteriormente, ci permette di sostenere e suggerire una raccomandazione a favore di un efficace supplementazione con vitamina D in queste neoplasie, anche in quei casi di ipovitaminosi lieve, stante il beneficio clinico sull'OS. Anche in considerazione delle capacità autoregolanti del nostro organismo e della funzione immunoregolatoria dimostrata dalla Vitamina D, si potrebbe presumere che l'integrazione con vitamina D possa avere un effetto positivo sulla progressione della malattia indipendentemente dai livelli di vitamina D circolante (Grafico 7).

Inoltre, ad avvalorare ulteriormente la nostra tesi, in una precedente valutazione retrospettiva della nostra coorte di pazienti su un campione ridotto di pazienti si è evidenziato un trend, importante e chiaro, che differenzia le due curve di PFS dei pazienti "trattati con vitamina D" rispetto a quelli "non trattati," con un andamento della PFS a favore dei "trattati" rispetto ai "non trattati" ( $p=0,19$ ).

Solo i trial randomizzati potranno esplorare in maniera più approfondita il ruolo della vitamina D nel paziente oncologico. In tal senso alcuni studi randomizzati di supplementazione vs non supplementazione con vitamina D sono stati condotti in ampi studi di popolazione, tuttavia senza un particolare riferimento alle NEN (229, 230). Ad oggi, la letteratura riguardante deficit di vitamina D e cancro è ancora controversa e il ruolo protettivo/preventivo della vitamina D nel paziente oncologico è ancora ampiamente dibattuto (229,230).

In conclusione, il nostro studio conferma una elevata prevalenza di ipovitaminosi D nei pazienti affetti da NEN, con livelli di 25OH vitD significativamente più bassi rispetto ad una popolazione di controllo non neoplastica. Pertanto, il monitoraggio dei livelli di 25OH vitD in questa categoria di pazienti risulta utile al fine di riconoscere e trattare questa frequente condizione di deficit concomitante. L'ipovitaminosi D alla diagnosi sembra essere correlato a un peggior outcome della malattia neoplastica (grafico 7). Conseguentemente la supplementazione efficace con vitamina D sembra avere un impatto sull'outcome clinico, in termini di miglioramento dell'OS, in pazienti affetti da NEN e ipovitaminosi. Quest'ultimo dato spinge ulteriormente sull'importante ruolo che la vitamina D potrebbe rivestire nel trattamento di numerose patologie neoplastiche e non solo.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Dasari A, Shen C, Halperin D et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes inpatients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol* 2017;3:1335–1342..
2. Ramage JK, Ahmed A, Ardill J, Bax N, Breen DJ, Caplin ME, et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut*. 2012;61:6-32.
3. Bosman FT. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumors of the Digestive System. IARC Press. 2010.
4. Boudreaux JP, Klimstra DS, Hassan MM, Woltering EA, Jensen RT, Goldsmith SJ, et al. The NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: well-differentiated neuroendocrine tumors of the Jejunum, Ileum, Appendix, and Cecum. *Pancreas*. 2010;39:753-66.
5. Panzuto F, Boninsegna L, Fazio N et al. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: Analysis of factors associated with disease progression. *J Clin Oncol* 2011;29:2372–2377. Vinik AI, Woltering EA, Warner RR, Caplin M, O'Dorisio TM, Wiseman GA, et al. NANETS consensus guidelines for the diagnosis of neuroendocrine tumor. *Pancreas*. 2010;39:713-34.
6. La Rosa S, Sessa F, Uccella S. Mixed Neuroendocrine-Nonneuroendocrine Neoplasms (MiNENs): Unifying the Concept of a Heterogeneous Group of Neoplasms. *Endocrine pathology*. 2016.
7. La Rosa S, Adsay V, Albarello L, Asioli S, Casnedi S, Franzi F, et al. Clinicopathologic study of 62 acinar cell carcinomas of the pancreas: insights into the morphology and immunophenotype and search for prognostic markers. *The American journal of surgical pathology*. 2012;36:1782-95.
8. Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW, et al. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104:764-77.
9. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;449:395-401.
10. Carlinfante G, Baccarini P, Berretti D, Cassetti T, Cavina M, Conigliaro R, et al. Ki-67 cytological index can distinguish well-differentiated from poorly differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative cytohistological study of 53 cases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;465:49-55.
11. Neoplasms of the neuroendocrine pancreas. In: WHO Classification of Tumours of Endocrine Or- gans. WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 10. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J (Editors). 2017, page 209–239.
12. Grillo F, Albertelli M, Brisigotti MP, Borra T, Boschetti M, Fiocca R, et al. Grade Increases in Gastro-Entero- Pancreatic Neuroendocrine Tumor Metastases Compared to the Primary Tumor. *Neuroendocrinology*. 2015.
13. Tatsumoto S KY, Sakurai Y, Shinohara T, Katanuma A, Maguchi H. Pancreatic neuroendocrine neoplasm: correlation between computed tomography enhancement patterns and prognostic factors of surgical and endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy specimens. *Abdom Imaging*. 2013;38:358-66.

14. Bettini R, Boninsegna L, Mantovani W, Capelli P, Bassi C, Pederzoli P, et al. Prognostic factors at diagnosis and value of WHO classification in a mono-institutional series of 180 non-functioning pancreatic endocrine tumours. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19:903-8.
15. Ekeblad S, Skogseid B, Dunder K, Oberg K, Eriksson B. Prognostic factors and survival in 324 patients with pancreatic endocrine tumor treated at a single institution. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14:7798-803.
16. Franko J, Feng W, Yip L, Genovese E, Moser AJ. Non-functional neuroendocrine carcinoma of the pancreas: incidence, tumor biology, and outcomes in 2,158 patients. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2010;14:541-8.
17. Panzuto F, Nasoni S, Falconi M, Corleto VD, Capurso G, Cassetta S, et al. Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization. *Endocrine-related cancer*. 2005;12:1083-92.
18. Kloppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010;456:595-7.
19. Pape UF, Perren A, Niederle B, Gross D, Gress T, Costa F, et al. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with neuroendocrine neoplasms from the jejunum-ileum and the appendix including goblet cell carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2012;95:135-56.
20. Pavel M, Baudin E, Couvelard A, Krenning E, Oberg K, Steinmuller T, et al. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology*. 2012;95:157-76.
21. Scarpa A, Mantovani W, Capelli P, Beghelli S, Boninsegna L, Bettini R, et al. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2010;23:824-33.
22. Sobin LH. *TNM classification of malignant tumors, 7th edition*. UICC. 2009.
23. Peghini PL, Annibale B, Azzoni C, Milione M, Corleto VD, Gibril F, et al. Effect of chronic hypergastrinemia on human enterochromaffin-like cells: insights from patients with sporadic gastrinomas. *Gastroenterology*. 2002;123:68-85.
24. Vanoli A, La Rosa S, Luinetti O, Klersy C, Manca R, Alvisi C, et al. Histologic changes in type A chronic atrophic gastritis indicating increased risk of neuroendocrine tumor development: the predictive role of dysplastic and severely hyperplastic enterochromaffin-like cell lesions. *Human pathology*. 2013;44:1827-37.
25. La Rosa S, Marando A, Gatti G, Rapa I, Volante M, Papotti M, et al. Achaete-scute homolog 1 as a marker of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of different sites: a validation study using immunohistochemistry and quantitative real-time polymerase chain reaction on 335 cases. *Human pathology*. 2013;44:1391-9.
26. Milione M, Gasparini P, Sozzi G, Mazzaferro V, Ferrari A, Casali PG, et al. Ewing sarcoma of the small bowel: a study of seven cases, including one with the uncommonly reported EWSR1-FEV translocation. *Histopathology*. 2014;64:1014-26.

27. Zhang C, Schmidt LA, Hatanaka K, Thomas D, Lagstein A, Myers JL. Evaluation of napsin A, TTF-1, p63, p40, and CK5/6 immunohistochemical stains in pulmonary neuroendocrine tumors. *American journal of clinical pathology*. 2014;142:320-4.
28. Zimmermann N, Lazar-Karsten P, Keck T, Billmann F, Schmid S, Brabant G, et al. Expression Pattern of CDX2, Estrogen and Progesterone Receptors in Primary Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Metastases. *Anticancer research*. 2016;36:921-4.
29. Schmitt AM, Riniker F, Anlauf M, Schmid S, Soltermann A, Moch H, et al. Islet 1 (Isl1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases. *The American journal of surgical pathology*. 2008;32:420-5.
30. Agaimy A, Erlenbach-Wunsch K, Konukiewitz B, Schmitt AM, Rieker RJ, Vieth M, et al. ISL1 expression is not restricted to pancreatic well-differentiated neuroendocrine neoplasms, but is also commonly found in well and poorly differentiated neuroendocrine neoplasms of extrapancreatic origin. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2013;26:995-1003.
31. Bari MF, Brown H, Nicholson AG, Kerr KM, Gosney JR, Wallace WA, et al. BAI3, CDX2 and VIL1: a panel of three antibodies to distinguish small cell from large cell neuroendocrine lung carcinomas. *Histopathology*. 2014;64:547-56.
32. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, et al. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2007;20:1172-82.
33. WHO classification of Tumours Editorial Board. *Digestive Tumours*. Lyon ( France): International Agency for Research on Cancer; 2019 (WHO Classification of tumours series 5th ed.; vol1).
34. Volante M, Daniele L, Asioli S, Cassoni P, Comino A, Coverlizza S, et al. Tumor staging but not grading is associated with adverse clinical outcome in neuroendocrine tumors of the appendix: a retrospective clinical pathologic analysis of 138 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37:606-12.
35. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Digestive system tumours*. Lyon (France): International Agency fir Research on cancer; 2019 ( WHO classification of tumours seires,5th ed; vol.1) <http://publications.iarc.fr/579>
36. Milione M, Maisonneuve P, Pellegrinelli A, Grillo F, Albarello L, Spaggiari P, Vanoli A, Tagliabue G, Pisa E, Messerini L, Centonze G, Inzani F, Scarpa A, Papotti M, Volante M, Sessa F, Fazio N, Pruneri G, Rindi G, Solcia E, La Rosa S, Capella C. Ki67 proliferative index of the neuroendocrine component drives MANEC prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2018 May;25(5):583-593. doi: 10.1530/ERC-17-0557. Epub 2018 Mar 28. PubMed PMID: 29592868.
37. Soyer P, Dohan A, Eveno C, Dray X, Hamzi L, Hoeffel C, et al. Carcinoid tumors of the small-bowel: evaluation with 64-section CT-enteroclysis. *Eur J Radiol* 2013;82: 943–50.
38. Kamaoui I, De-Luca V, Ficarelli S, Mennesson N, Lombard-Bohas C, Pilleul F. Value of CT enteroclysis in suspected small-bowel carcinoid tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2010;194:629–33.
39. Soyer P, AoutM, Hoeffel C, Vicaut E, Placé V, BoudiafM. Helical CT-enteroclysis in the detection of small-bowel tumours: a meta-analysis. *Eur Radiol* 2013;23:388–99.

40. Ambrosini V, Campana D, Bodei L, et al. 68Ga-DOTANOC PET/CT clinical impact in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2010; 51(5): 669-73.
41. Frilling A, Sotiropoulos GC, Radtke A, et al. The impact of 68Ga-DOTATOC positron emission tomography/computed tomography on the multimodal management of patients with neuroendocrine tumors. *Ann Surg* 2010; 252(5): 850-6.
42. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, et al. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA- conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37(10): 2004-10.
43. Jacobsson H. et al. Normal uptake of 68Ga-DOTA-TOC by the pancreas uncinate process mimicking malignancy at somatostatin receptor PET. *Clin Nucl Med* 2012; Apr;37(4):362-5.
44. Castellucci P, Pou Ucha J, Fuccio C, et al. Incidence of increased 68Ga-DOTANOC uptake in the pancreatic head in a large series of extrapancreatic NET patients studied with sequential PET/CT. *J Nucl Med* 2011; 52 (6): 886-90.
45. Bunning J, Merchant SH, Crooks LA, et al. Indium-111 Pentetreotide uptake by pancreatic polypeptide cell hyperplasia. *Pancreas* 2007; 35:372-375.
46. Skoura E, Michopoulou S, Mohmaduvesh M, Panagiotidis E, Al Harbi M, Toumpanakis C, Almukhailed O, Kayani I, Syed R, Navalkisoor S, Ell PJ, Caplin ME, Bomanji J. The Impact of 68Ga-DOTATATE PET/CT Imaging on Management of Patients with Neuroendocrine Tumors: Experience from a National Referral Center in the United Kingdom. *J Nucl Med*. 2016 Jan;57(1):34-40
47. Bodei L, Mueller-Brand J, Baum RP, Pavel ME, Hörsch D, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Howe JR, Cremonesi M, Kwekkeboom DJ, Zaknun JJ. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013 May;40(5):800-16.
48. Montravers F, Grahek D, Kerrou K, et al. Can fluorodihydroxyphenylalanine PET replace somatostatin receptor scintigraphy in patients with digestive endocrine tumors? *J Nucl Med* 2006; 47(9): 1455-62.
49. Binderup T, Knigge U, Loft A, et al. Functional imaging of neuroendocrine tumors: a head-to-head comparison of somatostatin receptor scintigraphy, 123I-MIBG scintigraphy, and 18F-FDG PET. *J Nucl Med* 2010; 51(5): 704-12.
50. Binderup T, Knigge U, Loft A, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival of patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 978-85.
51. Rinzivillo M, Partelli S, Prosperi D. Clinical Usefulness of 18F-FDG-PET in the diagnostic Algorithm of advanced entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms. *The Oncologist* 2018.23(2)-186-92.
52. Bozkurt MF, Virgolini I, Balogova S, et al. Guideline for PET/CT imaging of neuroendocrine neoplasms with 68Ga-DOTA-conjugated somatostatin receptor targeting peptides and 18F-DOPA. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017 Aug;44(9):1588-1601.
53. Sundin A, Arnold R, Baudin E, et al. Antibes Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological, Nuclear Medicine & Hybrid Imaging. *Neuroendocrinology*. 2017;105(3):212-244
54. Oberg K, Kvols L, Caplin M et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 2004; 15: 966–973

55. Modlin IM, Pavel M, Kidd M et al. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 169–188.
56. Rubin J, Ajani J, Schirmer W et al. Octreotide long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome. *J Clin Oncol* 1999; 17: 600–606.
57. Caron P. Somatuline\_ Autogel\_, a new formulation of lanreotide for the treatment of acromegalic patients. *Ann Endocrinol* 2002; 63 (2 pt3): 2S19–24.
58. William H. Ludlam · Lowell Anthony. Safety Review: Dose Optimization of Somatostatin Analogs in Patients with Acromegaly and Neuroendocrine Tumors. *Adv Ther* (2011) 28(10):825-841.
59. Panzuto F, Di Fonzo M, Iannicelli E, et al. Long-term clinical outcome of somatostatin analogues for treatment of progressive, metastatic, well-differentiated entero-pancreatic endocrine carcinoma. *Annals of Oncology* 17: 461– 466, 2006.
60. De Dosso S, Bajetta E., Procopio G. et al. Pulmonary carcinoid tumours: indolent but not benign. *Oncology* 2007;73(3-4):162-8.
61. Strosberg J, Gardner N, Kvols L. Survival and Prognostic Factor Analysis of 146 Metastatic Neuroendocrine Tumors of the Mid-Gut. *Neuroendocrinology* 2009;89(4):471-6.
62. Yao JC, Hassan M, Phan A, et al. One hundred years after ‘carcinoid’: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26:3063–72.
63. Partelli, Ciocchi R, Crippa S, et al. Systematic review of active surveillance versus surgical management of asymptomatic small non-functioning pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Br J Surg* 2017 Jan;104(1):34-41.
64. Sallinen V, Le Large TY, Galeev S, et al. Surveillance strategy for small asymptomatic non-functional pancreatic neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford)*. 2017 Apr;19(4):310-320.
65. Vagefi PA, Razo O, Deshpande V et al. Evolving patterns in the detection and outcomes of pancreatic neuroendocrine neoplasms: the Massachusetts General Hospital experience from 1977 to 2005. *Arch Surg* 2007; 142: 347-354.
66. Cheema A, Weber J, Strosberg JR. Incidental detection of pancreatic neuroendocrine tumors: an analysis of incidence and outcomes. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2932-2936.
67. Hill JS, McPhee JT, McDade TP et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: the impact of surgical resection on survival. *Cancer* 2009; 115: 741-751.
68. Falconi M, Zerbi A, Crippa S et al. Parenchyma-preserving resections for small nonfunctioning pancreatic endocrine tumors. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1621-1627.
69. Nikfarjam M, Warshaw AL, Axelrod L et al. Improved contemporary surgical management of insulinomas: a 25- year experience at the Massachusetts General Hospital. *Ann Surg* 2008; 247: 165-172.
70. Crippa S, Zerbi A, Boninsegna L et al. Surgical management of insulinomas: short- and long-term outcomes after enucleations and pancreatic resections. *Arch Surg* 2012; 147: 261-266.
71. Pederzoli P, Falconi M, Bonora A et al. Cytoreductive surgery in advanced endocrine tumours of the pancreas. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31 Suppl 2: S207-212.
72. Abu Hilal M, McPhail MJ, Zeidan BA et al. Aggressive multi-visceral pancreatic resections for locally advanced neuroendocrine tumours. Is it worth it? *JOP* 2009; 10: 276-279.

73. Kleine M, Schrem H, Vondran FW et al. Extended surgery for advanced pancreatic endocrine tumours. *Br J Surg* 2012; 99: 88-94.
74. Teh SH, Deveney C, Sheppard BC. Aggressive pancreatic resection for primary pancreatic neuroendocrine tumor: is it justifiable? *Am J Surg* 2007; 193: 610-613; discussion 613.
75. Partelli S, Cirocchi R, Rancita PM et al. A systematic review and meta-analysis on the role of palliative primary resection for pancreatic neuroendocrine neoplasm with liver metastases. *HPB (Oxford)* 2018 Mar; 20(3): 197-203
76. Frilling A, Li J, Malamutmann E et al. Treatment of liver metastases from neuroendocrine tumours in relation to the extent of hepatic disease. *Br J Surg* 2009; 96: 175-184.
77. Fendrich V, Langer P, Celik I et al. An aggressive surgical approach leads to long-term survival in patients with pancreatic endocrine tumors. *Ann Surg* 2006; 244: 845-851; discussion 852-843
78. Triponez F, Cadiot G. Non-functioning tumours of the pancreas in MEN1 patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 295-296.
79. Norton JA, Jensen RT. Resolved and unresolved controversies in the surgical management of patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Ann Surg* 2004; 240: 757-773.
80. Mignon M, Cadiot G. Diagnostic and therapeutic criteria in patients with Zollinger-Ellison syndrome and multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med* 1998; 243: 489-494.
81. MacFarlane MP, Fraker DL, Alexander HR et al. Prospective study of surgical resection of duodenal and pancreatic gastrinomas in multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* 1995; 118: 973-979; discussion 979-980.
82. Bartsch DK, Fendrich V, Langer P et al. Outcome of duodenopancreatic resections in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Ann Surg* 2005; 242: 757-764, discussion 764-756.
83. Eriksson J, Stalberg P, Nilsson A, et al. Surgery and radiofrequency ablation for treatment of liver metastases from midgut and foregut carcinoids and endocrine pancreatic tumors. *World Journal of Surgery* 2008; 32(5):930-938.
84. Kennedy AS, Dezarn WA, McNeillie P, et al. Radioembolization for unresectable neuroendocrine hepatic metastases using resin 90Y-microspheres: early results in 148 patients. *American Journal of Clinical Oncology* 2008; 31 (3): 271-279.
85. Murthy R, Kamat P, Nunez R, et al. Yttrium-90 microsphere radioembolotherapy of hepatic metastatic neuroendocrine carcinomas after hepatic arterial embolization. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2008; 19 (1): 145-151.
86. Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, A. G. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Fourth ed., Vol. 7, Lyon: IARC Press; 2015.
87. Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1628-38.
88. Srirajaskanthan R et al Surgical management and palliative treatment in bronchial neuroendocrine tumours: a clinical study of 45 patients *Lung Cancer* 65 (2009) 68 – 73.
89. Oberg et al Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* 2008;19:ii102-3.
90. Wick ME et al Carcinoid tumor of the thymus: a clinicopathologic report of seven cases with review of literature *Mayo Clin Proc* 1980;55:246-54

91. 91. Levine GD et al Thymic hyperplasia and neoplasia. A review of current concepts Hum Pathol 1978;9:295-514
92. 92. Evaluation of primary pulmonary carcinoid tumors using FDG PET. Erasmus JJ, McAdams HP, Patz EF Jr, et al. AJR Am J Roentgenol 1998;170(5):1369-1373.
93. 93. Society of Nuclear Medicine. Procedure guideline for somatostatin receptor scintigraphy with (111)In-pentetreotide. Balon HR, Goldsmith SJ, Siegel BA, et al; J Nucl Med 2001;42(7):1134-1138.
94. 94. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010;37(10):2004-2010.
95. 95. Use of integrated FDG PET/CT imaging in pulmonary carcinoid tumours. Krüger S, Buck AK, Blumstein NM, et al. J Intern Med. 2006;260(6):545-550.
96. 96. The utility of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the evaluation of carcinoid tumors presenting as pulmonary nodules. Daniels CE, Lowe VJ, Aubry MC, et al. Chest 2007;131(1):255-260.
97. 97. Aparicio T, Ducreux M, Baudin E, et al. Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours. Eur J Cancer, 2001, 37:1014–1019.
98. 98. Filosso PL, Ruffini E, Oliaro A, et al. Long-term survival of atypical bronchial carcinoids with liver metastases, treated with octreotide. Eur J Cardiothorac Surg, 2002, 21:913–917.
99. 99. Yao JC, Fazio N, Singh S, et al. RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung and gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet, 2016, 5;387(10022):968-77
100. 100. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, et al. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. Ann Thorac Surg, 2004, 77(5):1781-1785.
101. 101. Eklebad S, Sundin A, Janson ET, et al. Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res, 2007, 13(10):2986-2991.
102. 102. Crona J, Fanola I, Lindholm DP, et al. Effect of temozolomide in patients with metastatic bronchial carcinoids. Neuroendocrinology, 2013, 98(2): 151-155.
103. 103. Bajetta E, Catena L, Procopio G, De Dosso S, Bichisao E, Ferrari L, Martinetti A, Platania M, Verzoni E, Formisano B, Bajetta R. Are capecitabine and oxaliplatin (XELOX) suitable treatments for progressing low-grade and high-grade neuroendocrine tumours? Cancer Chemother Pharmacol 2007 59(5):637-42
104. 104. Cavaliere S, Venuta F, Foccoli P, et al. Endoscopic treatment of malignant airway obstructions in 2008 patients. Chest 1996;110:1536-1542.
105. 105. Sutedja TG, Schreurs AJ, Vanderschueren RG, et al. Bronchoscopic therapy in patients with intraluminal typical bronchial carcinoid. Chest 1995;107:556-558.
106. 106. Luckraz H, Amer K, Thomas L, Gibbs A, Butchart EG. Long-term outcome of bronchoscopically resected endobronchial typical carcinoid tumors. J Thorac Cardiovasc Surg 2006;132:113-5.
107. 107. Detterbeck FC. Management of carcinoid tumors. Ann thor Surg 2010;89:998-1005
108. 108. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. Arch Dermatol 1972; 105:107-10.

109. Ratner D, Nelson BR, Brown MD, Johnson TM. Merkel cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29:143-56
110. Amber K, McLeod MP, Nouri K. The Merkel cell polyomavirus and its involvement in Merkel cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2013;39:232–8.
111. Robak E, Biernat W, Krykowski E, Jeziorski A, Robak T. Merkel cell carcinoma in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia treated with cladribine and rituximab. *Leuk Lymphoma* 2005;46:909–14.
112. Tadmor T, Liphshitz I, Aviv A, Landgren O, Barchana M, Polliack A. Increased incidence of chronic lymphocytic leukaemia and lymphomas in patients with Merkel cell carcinoma – a population based study of 335 cases with neuroendocrine skin tumour. *Br J Haematol* 2012;157:457–62.
113. M. Heath, N. Jaimes, B. Lemos et al., “Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features,” *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 58, no. 3, pp. 375–381, 2008.
114. Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, et al. Merkel cell carcinoma: demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J Cutan Pathol* 2010; 37:20-27
115. Schadendorf D, Lebbé C, Zur Hausen A, et al. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *Eur J Cancer* 2017; 71:53-69.
116. Jalilian C, Chamberlain AJ, Haskett M, et al. Clinical and dermoscopic characteristics of Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2013; 169:294-7.
117. Harting MS, Ludgate MW, Fullen DR, et al. Dermatoscopic vascular patterns in cutaneous Merkel cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66:923-7.
118. Iyer JG, Storer BE, Paulson KG, et al. Relationships among primary tumor size, number of involved nodes, and survival for 8044 cases of Merkel cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(4):637-643.
119. Engels EA, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ, Miller RW. Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet*. 2002;359:497-8.
120. Guler-Nizam E, Leiter U, Metzler G, Breuninger H, Garbe C, Eigentler TK. Clinical course and prognostic factors of Merkel cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*. 2009;161:90-4.
121. Tarantola TI, Vallow LA, Halyard MY, Weenig RH, Warschaw KE, Grotz TE, et al. Prognostic factors in Merkel cell carcinoma: analysis of 240 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68:425-32.
122. Paulson KG, Iyer JG, Blom A, Warton EM, Sokil M, Yelistratova L, et al. Systemic immune suppression predicts diminished Merkel cell carcinoma-specific survival independent of stage. *J Invest Dermatol*. 2013;133:642-6.
123. Nghiem P BS, Daud A, Friedlander P, Kluger H, Kohort H, Kudchadkar R, Lipson E, Lundgren L, Margolin K, Reddy S, Shantha E, Sharfman W, Sharon E, Thompson J, Topalian S, and Cheever M. Activity of PD-1 blockade with pembrolizumab as first systemic therapy in patients with advanced Merkel Cell Carcinoma. *European Society for Medical Oncology 2015;Annual Meeting 22LBA*.
124. Paulson KG, Iyer JG, Simonson WT, Blom A, Thibodeau RM, Schmidt M, et al. CD8+ lymphocyte intratumoral infiltration as a stage-independent predictor of Merkel cell carcinoma survival: a population-based study. *Am J Clin Pathol*. 2014;142:452-8

125. Sihto H, Bohling T, Kavola H, Koljonen V, Salmi M, Jalkanen S, et al. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2872-81.
126. Union for International Cancer Control. Briely JD, Gospodarowicz MK, Wittekind CH, eds. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 8th ed. Oxford UK and Hoboken, NJ: John Wiley; 2017
127. Garcia-Carbonero R, Marquez-Rodas I, de la Cruz-Merino L et al. Recent Therapeutic Advances and Change in Treatment Paradigm of Patients with Merkel Cell Carcinoma. *Oncologist* (Apr 8) 2019
128. Mascorro JA, Yates RD, Chen IL. A glutaraldehyde/potassium dichromate tracing method for the localization and preservation of abdominal extra-adrenal chromaffin tissues. *Stain Technol* 1975;50:391-396.
129. Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I et al. The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:569-585.
130. Korevaar TI, Grossman AB. Pheochromocytomas and paragangliomas: Assessment of malignant potential. *Endocrine* 2011;40:354-365
131. Dahia PL. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: Learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 2014;14:108-119
132. Symington T, Goodall AL. Studies in pheochromocytoma. I. Pathological aspects. *Glasgow Med J* 1953;34:75-96
133. Hume DM. Pheochromocytoma in the adult and in the child. *Am J Surg* 1960;99:458-496
134. Thompson LDR. Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (pass) to separate benign from malignant neoplasm. A clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 2002;26:551-566
135. Ayala-Ramirez M, Feng L, Habra MA, Rich T, Dickson PV, Perrier N, Phan A, Waguespack S, Patel S, Jimenez C. Clinical benefits of systemic chemotherapy for patients with metastatic pheochromocytomas or sympathetic extra- adrenal paragangliomas: insights from the largest single-institutional experience. *Cancer.* 2012 Jun 1;118(11):2804- 12.
136. van Hulsteijn LT1, Niemeijer ND, Dekkers OM, et al. (131)I-MIBG therapy for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Apr;80(4):487-501. doi: 10.1111/cen.12341. Epub 2013 Nov 19)
137. Pacini, F., et al., Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010. 22(6): p. 475-85.
138. Moley, J.F., Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. *J Natl Compr Canc Netw*, 2010. 8(5): p. 549-56.
139. Machens, A., S. Hauptmann, and H. Dralle, Increased risk of lymph node metastasis in multifocal hereditary and sporadic medullary thyroid cancer. *World J Surg*, 2007. 31(10): p. 1960-5.
140. Guida, Linee. «TUMORI EPITELIALI PRIMITIVI OCCULTI (TEPO)», 2019, 34.
141. Adattato da Kandukuri SR, Lin F, Gui L et al. *Application od immunohistochemistry in Undifferentiated Neoplasms: A Pratical Approach.*, Arch Pathol Lab Med. 2017 Aug; 141(8):1014-1032

142. Minordi L.M. et al. Multidetector CT in small-bowel neoplasms, *La Radiologia Medica*, Edizioni Minerva Medica, Torino, 2007, 112: 1013-1025.
143. Moller AK, Loft A, Berthelsen AK et al.: 18 -FDG PET/CT as a diagnostic tool in patients with extracervical carcinoma of unknown primary site: a literature review. *Oncologist* 2011, 16:445-51
144. Wells, S.A., Jr., et al., Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*, 2015.
145. Machens, A., et al., Prospects of remission in medullary thyroid carcinoma according to basal calcitonin level. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(4): p. 2029-34.
146. 146.Boscaro M. et al. *Guida Pratica di Endocrinologia*. Padova: PICCIN editore; 2019.
147. Wells, S.A., Jr., et al., Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol*, 2012. 30(2): p. 134-41
148. Elisei, R., et al., Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 2013. 31(29): p. 3639-46
149. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets, *J Clin Invest*, 2006; 116:2062-72.
150. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D, *Am. J. Clinical Nutrition*, 2004; 80(6):1689S-96S.
151. 151.Tavera-Mendoza, Luz E, White, John H. Cell Defenses and the Sunshine Vitamin, *Scientific American*, 2007; 297(5):62-72.
152. 152.Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity, *Dermatol. Therapy*, 2010; 23:13-22.
153. 153.Bikle DD. Vitamin D and Immune Function: Understanding Common Pathways, *Current Osteoporosis Reports*, 2009; 7:58-63.
154. 154.McAlindon TE et al. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham study, *Ann Intern Med*, 1996; 125:353-
155. 155.Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis, *Am J Clin Nutr*, 2004; 79:362-71.
156. 156.Li Y Kong J et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is an negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system, *J Clin Invest*, 200; 110:229-38
157. 157.McCullough LM. Correlates of Circulating 25-Hydroxyvitamin D, *Am J of Epidemiol*,2010; 172(1):21-35.
158. 158.Pludowski P. et al. Vitamina D supplementation guidelines, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 175 (2018) 125-135.
159. 159.Marcinkowska E. et al. The use of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) as an anticancer agent. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:E729.
160. 160.Ingraham BA. Et al. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr Med Res Opin*. 2008; 24:139-149.
161. 161.Palmer HG. et al.Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol*. 2001; 154:369-387.

162. 162. Shah S. et al. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell*. 2006; 21:799-809.
163. 163. Gupta R. et al. Photoprotection by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with an increase in p53 and a decrease in nitric oxide products. *J Invest Dermatol*. 2007; 127:707-715.
164. 164. Rohan JN. Et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2009; 150:2046-2054.
165. 165. Blutt SE. et al. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000; 141:10-17.
166. 166. Campbell Mj. et al. Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-norhexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. *J Mol. Endocrinol*. 1997; 19:15-27.
167. 167. Bao BY. et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2006; 27:1883-1893.
168. 168. Edwards B.J., Anticancer Effects of Vitamins, *The American Journal of Hematology/oncology*, 2015; vol. 11, NO, 10
169. 169. Poiana C. et al. Well-differentiated neuroendocrine tumor and osteoporosis: incidental findings? *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(4):1169-1171
170. 170. Samimi M. et al Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients. *JEADV* 2014, 28, 298-308
171. 171. Lind A. et al. Vitamin D and vitamin B12 deficiencies are common in patients with midgut carcinoid (SI-NET), *European Journal of Clinical Nutrition*, 2016, 70, 990-994
172. 172. Chiang KC. et al. 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 Analog, MART-10, inhibits neuroendocrine tumor cell growth through induction of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Research* 2016, 36:3307-3314
173. 173. Chiang KC. et al. MART-10, a less calcemic vitamin D analog, is more potent than 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in inhibiting the metastatic potential of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014, 139: 54-60
174. 174. Chiang KC. et al MART-10, a novel vitamin D analog, inhibits head and neck squamous carcinoma cells growth through cell-cycle arrest at G0/G1 with up regulation of p21 and p27 and down-regulation of telomerase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013, 138:427-434
175. 175. Motylewska E. et al. Somatostatin Analogs and tumor localization do not influence vitamin D concentration in patients with neuroendocrine tumors. *Nutrition and Cancer*. 2016, vol 68, NO. 3, 428-434
176. 176. Massironi S. et al. Impact of vitamin D on the clinical outcome of gastroentero-pancreatic neuroendocrine neoplasm: report on a series from a single institute. *Neuroendocrinology*, 2017; 105: 403-411
177. 177. Chiang KC. 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 analog, MART-10, inhibits Neuroendocrine tumor cell metastasis after VEGF-A stimulation. *Anticancer Res*. 2017; 37(11): 6215-6221
178. 178. Robbins HL et al. Supplementation of vitamin D deficiency in patients with neuroendocrine tumors using over-the-counter vitamin D3 preparations. *Nutr Cancer* 2018; 70(5): 748-754
179. 179. Manson JE et al. Vitamin D Supplements and Prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Eng J Med*. 2018; 380 (1)

180. 180.Zhang Yu et al. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis
181. Monticone M, Celletti C, Gatta G. ORGANISMI SOCIETARI NAZIONALI (2011-2014). :48.
182. Ramasamy I. Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation. Clin Biochem Rev. dicembre 2020;41(3):103–26.

## INDICE DELLE FIGURE

---

Figura 1 Pathway di sintesi, attivazione e catabolismo del sistema vitaminico D.....	41
Figura 2 Pathway di secrezione e azione della Vit D.....	42
Figura 3 Input e output del Ca sotto stimolazione da Vit D.....	43
Figura 4 Prevalenza ipovitaminosi.....	60

## INDICE DEI GRAFICI

---

Grafico 1: Kaplan–Meier curves for nodal and distant metastasis-free survival (a) and MCC-specific survival .....	50
Grafico 2: Livelli di 25OH VitD nel gruppo di studio NEN e nei soggetti sani, secondo origine primitivo, terapia con analoghi della somatostatina.....	51
Grafico 3 Valori di 25-OHvitD nei pazienti con NEN rispetto ai controlli (mediana 12,9 vs. 23,9 ng / mL, p <0,0001). Adattato da Massironi et al. 2017 (176).....	52
Grafico 4 Livelli circolanti di 25 OHVitD in pazienti trattati con analoghi della somatostatina (SSA+) rispetto a quelli non trattati (mediana 10 contro 13,5 ng /mL; p <0,05). Adattato da Massironi et al. 2017 (176). .....	53
Grafico 5 a) Sopravvivenza globale (OS) dei pazienti che hanno ricevuto un'integrazione di vitamina D rispetto a quelli che non la hanno ricevuta. b) Sopravvivenza libera da progressione (PFS) dei pazienti che hanno ricevuto un'integrazione di vitamina D rispetto .....	53
Grafico 6 Prevalenza ipovitaminosi D nei diversi NEN .....	61
Grafico 7 OS pazienti con vitamina D in range ala diagnosi VS OS in pazienti non in range ...	62
Grafico 8.....	63

## INDICE DELLE TABELLE

---

Tabella 1: Classificazione OMS 2019.....	6
Tabella 2: Marcatori per la caratterizzazione delle GEP NEN.....	7
Tabella 3: Sinossi delle caratteristiche clinico-patologiche delle NEN polmonari.....	25
Tabella 4 Union for Intenational cancer Control (UICC), TNM eighth edition,2017.....	33
Tabella 5 Contesti sindromici nei quali può manifestarsi un feocromocitoma/paragangioma ...	35
Tabella 6: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scoring Scale (PASS).....	36
Tabella 7: Valori di introito di Vit. D superiori accettabili in pazienti sani* .....	45
Tabella 8.....	48
Tabella 9 Caratteristiche clinico patologiche della popolazione in esame.....	58
Tabella 10 Metabolismo Vit D.....	59

# RINGRAZIAMENTI

---

Oramai giunti al termine di questo percorso, costellato di momenti stupendi e ricordi indelebili ma anche da momenti difficili, in cui ho conosciuto persone straordinarie, e ho fatto esperienze incredibili, riguardando il me stesso di 6 anni fa, che in quella stanza di Ingegneria apriva il sito del MIUR scoprendo di essere entrato a Medicina e mi sento di dovere dei ringraziamenti...

Grazie al Professor Diego Ferone il mio relatore ma anche un docente, un maestro di vita e un amico;

Grazie alla Professoressa Albertelli che in questi anni è sempre stata al mio fianco insegnandomi e guidandomi nel mondo dell'Endocrinologia;

Grazie a mia mamma, senza la quale sicuramente non ce l'avrei fatta, grazie per avermi sopportato quando scleravo prima degli esami e spesso anche dopo...

Grazie a mio padre per avermi sempre accontentato su ogni cazzata e per essersi fatto migliaia di Km in macchina per me;

Grazie per tutti i sacrifici che avete fatto...e grazie per essere i fantastici genitori che tutti vorrebbero;

Grazie a mia sorella, con la quale a causa del covid non litigo da fin troppo tempo, ma alla quale voglio un mondo di bene;

Grazie a Tutti coloro che dicevano che ci sarebbero sempre stati, e a chi c'è stato davvero;

Grazie ai Professori, quelli di dubbia moralità e a coloro che mi hanno fatto innamorare della medicina;

Grazie a chi mi ha saputo ascoltare anche solo per un minuto e chi tempo non lo aveva mai;

Grazie a chi mi ha solo sfruttato e a chi non ha mai preteso nulla;

Grazie agli amici, quelli nuovi e quelli di una vita; quelli veri, e anche a quelli finti;

Grazie a chi se ne è andato e a chi è ritornato;

Grazie a chi mi ha stretto forte quando avevo paura e a chi mi ha detto arrangiate;

Grazie a chi mi ha perdonato e a chi forse non lo farà mai;

Grazie a chi nonostante a centinaia di Km è stato come averlo accanto e a chi anche se a due passi non si fa sentire;

Grazie a chi queste parole non le leggerà mai, e a te che le stai leggendo ora;

Grazie a tutti voi e a molti altri, perchè nel bene o nel male senza di voi non ce l'avrei fatta e senza di voi non sarei l'uomo e il medico che sono oggi.

Grazie