

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ SI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

**FACTORI CLINICI ȘI PARACLINICI
PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA
POSTOPERATORIE ȘI PROGNOSTIC
ÎN PATOLOGIA NODULARĂ
TIROIDIANĂ
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. FICA SIMONA

Student-doctorand:
Dr. GIULEA COSMIN

BUCUREȘTI 2020

CUPRINSUL TEZEI

I. INTRODUCERE

II. PARTE GENERALĂ

1. Embriologie

2. Anatomie

3. Fiziologia glandei tiroide

4. Nodulii tiroidieni și Gușa multinodulară

Epidemiologie

Factori de risc

Cinica

Paraclinica

Teste biochimice

Imagistica

Puncția cu ac fin – clasificarea Bethesda

5. Carcinomul tiroidian

Clasificare

Carcinomul tiroidian papilar (CTP)

Carcinomul tiroidian folicular (FTC) și carcinomul cu celule Hurthle (HCC)

Carcinomul tiroidian medular (CTM)

Carcinomul tiroidian slab diferențiat (CTSD)

Carcinomul tiroidian nediferențiat (CTND) sau anaplastic

6. Managementul postoperator al carcinomului tiroidian diferențiat

Managementul postoperator

Terapia cu iod radioactiv

Supresia TSH

Radioterapia externă

Tratamentul metastazelor la distanță

7. Tehnica operatorie

Tiroidectomia totală

Tehnici alternative

Disecția gâtului

III. CONTRIBUȚIA ORIGINALĂ

1. Studiul I

Studiul 1 (retrospectiv). Efectul disecției centrale a gâtului asupra riscului lezional și complicațiilor postoperatorii privind paralizia de corzi vocale și hipocalcemia la pacienții cu carcinom tiroidian

Studiul 2 (prospectiv). Paralizia recurențială după tiroidectomia totală la pacienții monitorizați prin control ORL postoperator

- 1.1. Introducere
- 1.2. Obiective
- 1.3. Material și metodă
- 1.4. Rezultate
 - 1.4.1. Caracteristici generale
 - 1.4.2. Rezultate - Studiul 1
 - 1.4.3. Rezultate - Studiul 2
- 1.5. Discuții
 - 1.5.1. Discuții - Studiul 1
 - 1.5.2. Discuții - Studiul 2
- 1.6. Concluzii

2. Studiul II

Factorii clinici și paraclinici asociați cu complicațiile postoperatorii în patologia nodulara tiroidiană (studiu prospectiv)

- 2.1. Introducere
- 2.2. Obiective
- 2.3. Material și metodă
- 2.4. Rezultate
- 2.5. Discuții
- 2.6. Concluzii

3. Studiul III

Utilizarea markerilor plasmatici moleculari pentru diagnosticul precoce în carcinomul tiroidian diferențiat (studiu prospectiv)

- 3.1. Introducere
- 3.2. Obiective
- 3.3. Material și metodă
- 3.4. Rezultate
- 3.5. Discuții
- 3.6. Concluzii

4. Studiul IV

Implicațiile mutației V600E a genei BRAF și a polimorfismelor mononucleotidice ale 735 C>T al MMP-2 și 1562 C>T al MMP-9 în diagnosticul precoce și evoluția pe termen scurt în chirurgia pentru cancerul tiroidian (studiu prospectiv)

4.1. Introducere

4.2. Obiective

4.3. Material și metodă

4.4. Rezultate

4.4.1. Caracteristici generale

4.4.2. Implicațiile mutației V600E a genei BRAF în carcinomul tiroidian

4.4.3. Asocierea dintre nivelurile serice de MMP-9 și carcinomul papilar tiroidian

4.4.4. Implicațiile polimorfismelor mononucleotidice ale MMP-urilor în cancerul tiroidian

4.4.4.1. Implicația polimorfismului 735 CT al MMP-2 în patogenia carcinomului papilar tiroidian

4.4.4.2. Implicația polimorfismului 1562 CT al MMP-9 în patogenia carcinomului papilar tiroidian

4.5. Discuții

4.6. Concluzii

IV. CONCLUZII FINALE, ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

BIBLIOGRAFIE

LISTA DE PUBLICAȚII

ANEXE

Patologia nodulară tiroidiană este frecvent întâlnită în populația adultă și nu numai. Prevalența nodulilor tiroidieni palpabili este în jur de 4% în populația adultă cu o rată femei-bărbați de 4:1. (copii mici: 1%, copii 11-18 ani: 1,5%, adulți peste 60 de ani: 5%). (Cooper et al., 2011, Haugen et al., 2016, Feldman et al., 2004) Ecografia tiroidiană detectează nodulii tiroidieni la aproximativ 50% dintre indivizii sănătoși, în special la persoanele de vârstă mijlocie și la femeile vârstnice, aceasta în contrast cu prevalența relativ scăzută a nodulilor tiroidieni palpabili. În plus, la evaluarea ecografică 20-48% din pacienții cu un singur nodul tiroidian palpabil au noduli suplimentari, fapt ce determină actual o epidemie de noduli tiroidieni, cu impact asupra practicii medicale. (Cooper et al., 2011, Haugen et al., 2016)

În marea lor majoritate (95%), nodulii tiroidieni sunt benigni, cancerul tiroidian reprezentând 5% din nodulii tiroidieni și 2% din toate formele de cancer la om, fiind cel mai frecvent cancer endocrin. (Cooper et al., 2011, Shaha 2004, Tuttle et al., 2013) Carcinomul tiroidian afectează mai mult femeile decât bărbații și în majoritatea cazurilor pacienții între 25 și 65 de ani. (Sanders et al., 1998, Tennvall et al., 1986, Shah et al., 1992) Carcinoamele diferențiate includ formele papilar (75-80%) și folicular (11%), fiind derivate din celulele foliculare producătoare de tiroglobulină. Carcinomul tiroidian diferențiat are o incidență anuală variabilă, între 0,5-10 la 100000 de locuitori, reprezentând sub 1% din totalitatea neoplaziilor umane. (Cooper et al., 2011) Rata supraviețuirii este în creștere (terapie primară și monitorizare postterapie), în SUA fiind 190000 supraviețuitori ai carcinomului tiroidian la peste 40 de ani de la diagnostic. (Shaha 2004)

Carcinomul tiroidian diferențiat reprezintă tipul de cancer tiroidian cel mai frecvent întâlnit; adenoamele foliculare reprezintă tumorile tiroidiene benigne cel mai des întâlnite. Carcinomul tiroidian diferențiat este reprezentat în cea mai mare parte de carcinomul papilar și, într-o măsură mai mică de carcinomul folicular, aceste cancere având o incidență mai mare în cazul pacienților de sex feminin. Dintre pacienții diagnosticați cu cancer tiroidian, aproximativ 5% pot dezvolta metastaze și pot avea un risc crescut de mortalitate. (Busaidy et al., 2012)

Managementul pacienților cu patologie nodulară tiroidiană a reprezentat o preocupare permanentă, identificarea factorilor de risc clinici, biologici, histopatologici/imunohistochimici și genetici asociați cu complicațiile postoperatorii și evoluția pacienților cu patologie nodulară tiroidiană fiind o temă atent urmărită în ultimii ani.

Teza de față și-a propus identificarea și descrierea unor factori clinici și paraclinici care sunt implicați în patologia nodulară tiroidiană. Au fost studiați factori de risc asociați cu patologia nodulară tiroidiană malignă, încercând de asemenea, a evalua evoluția postoperatorie și prognosticul în funcție de prezența acestora. Am cercetat atât factori care țin de istoric, caracteristici fizice, caracteristici ecografice, factori intraoperatori, caracteristici histopatologice, precum și factori genetici și moleculari.

Au fost realizate 4 studii. Unul a fost retrospectiv, efectuat pe un lot de 148 de carcinoame tiroidiene operate într-un interval de 5 ani, celelalte studii fiind prospective, realizate pe diferite loturi de pacienți.

Studiul I

Primul studiu a încercat să analizeze pe un lot de pacienți, retrospectiv, un deziderat major urmărit de către echipa operatorie, acela al reducerii riscurilor complicațiilor postoperatorii, obiectivul principal al prezentului studiu fiind acela de a compara complicațiile postoperatorii apărute după tiroidectomia totală la pacienții cu diferite afecțiuni tiroidiene, precum și implicațiile efectuării diferitelor tipuri de intervenții chirurgicale asupra apariției complicațiilor postoperatorii (Studiul 1). Tot în această perioadă luată în calcul, s-a realizat pe un număr de 100 de pacienți operați consecutiv un alt studiu prospectiv care a urmărit evaluarea complicațiilor recurențiale după tiroidectomie totală printr-un examen endoscopic ORL (Studiul 2).

Studiul 1.

În cadrul studiului 1 am analizat comparativ apariția hipocalcemiei postoperatorii și a paraliziei nervilor laringei recurenți în cadrul unui lot de 148 de pacienți operați într-o perioadă de 5 ani (ianuarie 2012 - decembrie 2016) pentru o afecțiune malignă tiroidiană, împărțiți în două grupuri (grupul A - pacienți care au suferit doar tiroidectomie totală și grupul B - pacienți care au suferit o tiroidectomie totală plus disecția centrală a gâtului asociată sau nu cu o altă tehnică de disecție a gâtului - disecția selectivă a gâtului sau disecția radicală modificată a gâtului)

Din întregul lot de pacienți, majoritatea au fost diagnosticați cu o formă de cancer tiroidian diferențiat. În urma examenului histopatologic au fost descoperite 5 cazuri de cancer tiroidian medular, două în grupul doar cu tiroidectomie totală și trei în grupul cu

tiroidectomie totală și disecție a gâtului, trei cazuri de carcinom slab diferențiat, toate în grupul cu disecție a gâtului și două cazuri de cancer tiroidian anaplastic, ambele în grupul fără disecție.

Dintre cei 148 de pacienți care au suferit o intervenție chirurgicală, la 8 (5,4%) pacienți au apărut complicații legate de nervul laringeu recurent, însă nici unul nu a prezentat semne de insuficiență glotică.

În grupul pacienților doar cu tiroidectomie totală (grup A) am avut 3 (2,65%) pacienți diagnosticați cu paralizie unilaterală în ziua 1 postoperator, iar la controlul postoperator de la 30 de zile, în 2 (1,76%) cazuri recuperarea clinic a fost completă, în timp ce al treilea (0,88%) s-a recuperat parțial, iar examinarea fibroscopică ORL a evidențiat pierderea motilității corzii vocale.

În grupul pacienților care au asociat tiroidectomiei totale și disecția centrală a gâtului (grup B), au existat 5 (14,28%) cazuri care au prezentat modificări ale vocii după intervenția chirurgicală, iar după examinarea ORL toți cei 5 pacienți au fost diagnosticați cu paralizie de coardă vocală unilateral. La urmărirea de 30 de zile, 4 (11,42%) au fost recuperați complet, în timp ce un (2,85%) pacient a avut modificări persistente ale vocii, iar examenul fibroscopic ORL a indicat pierderea completă a motilității corzii vocale.

Rezultatele obținute au arătat că prezența leziunilor RLN se corelează semnificativ statistic cu tiroidectomia totală + CND, ceea ce ne îndreptățește să afirmăm că tiroidectomia totală asociată cu disecție centrală a gâtului este asociată semnificativ statistic cu un risc crescut de leziuni la nivelul nervului laringeu recurent ($r = 0.2185$, $p = 0.007$), leziunea de nerv laringeu recurent a fost corelată pozitiv semnificativ statistic cu limfodisecția compartimentului central al gâtului.

Din totalul celor 148 de cazuri luate în studiu, am avut 36 (24,32%) de pacienți care au prezentat diferite grade de hipocalcemie ($s\text{-Ca} < 8 \text{ mg / dl}$), în prima zi postoperatorie. Dintre aceștia, 17 (15,04%) pacienți au fost din grupul A și 19 (54,28%) pacienți din grupul B, cu sau fără simptome clinice. Controlul postoperator la 30 de zile a arătat că numai 3 (2,65%) pacienți din lotul fără disecție a ganglionilor limfatici și 6 (17,14%) pacienți din lotul cu disecție a ganglionilor limfatici au avut hipocalcemie. Tratamentul cu suplimente de calciu a fost continuat de către toți pacienții și niciunul dintre aceștia nu a prezentat hipoparatiroidism permanent, așa cum s-a constatat prin valorile normale ale iPTH-ului determinate în timpul urmăririi în ambulatoriu.

Din datele obținute s-au observat corelații cu semnificație statistică crescută atât între scăderea calcemiei în ziua 1 postoperatorie ($r = 0.3886$, $p < 0.0001$) și disecția centrală a

gâtului, cât și între hipocalcemia din ziua 30 postoperator ($r = 0.2576$, $p = 0.001$) și disecția centrală a gâtului. Nivelurile calcemiei postoperatorii sub 8 mg / dl atât din ziua 1 cât și din ziua 30 postoperator s-au corelat pozitiv cu tiroidectomia totală asociată cu disecția centrală a gâtului, în timp ce nivelurile de peste 8 mg / dl s-au corelat negativ.

Aceste rezultate ne demonstrează supoziția că disecția centrală a gâtului reprezintă un factor de risc în ceea ce privește apariția complicațiilor postoperatorii legate de leziunile glandelor paratiroide sau a nervilor laringei recurenți.

Morbiditatea postoperatorie în ceea ce privește leziunile nervilor laringei recurenți și glandelor paratiroide este crescută atunci când se realizează disecția compartimentului central al gâtului, singură sau asociată cu alte tipuri de disecție a gâtului, comparativ cu cazurile când s-a efectuat doar o tiroidectomie totală pentru cancer. De asemenea, apariția complicațiilor postoperatorii (hipocalcemie și leziune NLR) a fost comparată cu extensia carcinomului, din aceasta putând vedea că frecvența acestora este corelată semnificativ statistic cu prezența semnelor histopatologice de extensie a carcinomului, aceste constatări putând fi explicate prin disecția mai dificilă în cazul extensiei extracapsulare a carcinomului tiroidian.

Putem concluziona că o disecție mai amplă în zona nervului laringeu recurent și a glandelor paratiroide fie că este una mai dificilă ca în cazul extensiei extracapsulare a carcinomului tiroidian, fie că este mai de amploare ca în cazul disecției centrale a gâtului efectuată pentru evidarea adenopatiilor de la acest nivel prezente în cancerul tiroidian sau un efect cumulat al celor două, poate duce la creșterea riscului de lezare a acestor structuri, crescând astfel rata de apariție a complicațiilor postoperatorii (hipocalcemia și paralizia de nerv laringeu recurent). Înțelegerea relației dintre creșterea riscului de complicații postoperatorii care pot reduce calitatea vieții pacientului și alegerea efectuării unei intervenții chirurgicale extensive reprezintă suma și substanța operațiilor pentru carcinom tiroidian.

Studiul 2.

Studiul 2 a fost efectuat pe un număr de 100 de cazuri operate consecutiv în 2010-2011 pentru diferite afecțiuni tiroidiene, nu doar pentru cancer, pacienții fiind urmăriți și evaluați prin examen endoscopic ORL pre și postoperator, din întregul lot rezultând un număr de 190 de nervi la risc. Întregul lot a fost împărțit în două grupuri: grupul pacienților cu nervi cu risc lezional crescut (grupul A), care a cuprins 19 de nervi și grupul pacienților cu nervi cu risc lezional scăzut (grupul B), în care au fost incluși 19 nervi.

Analizând complicațiile postoperatorii, am constatat că din numărul total de 100 de pacienți examinați cu 190 de nervi la risc, în 8 cazuri au fost găsite modificări unilaterale ale motilității corzilor vocale, doi dintre cei opt fiind din grupul cu risc ridicat (grupul A) și 6 din grupul cu risc scăzut (grupul B). Prelucrarea datelor a dus la un risc relativ de 3 ($0,65 < RR < 13,83$), ceea ce arată că frecvența crescută a tulburărilor de motilitate nu s-a asociat cu apartenența la un grup de risc, aceeași concluzie rezultând și din aplicarea testului exact Fisher ($p\text{-value} = 0.18 > 0.05$), care a fost necesar a fi aplicat deoarece au existat mai puțin de 5 cazuri în categoria pacienților cu risc ridicat de leziune recurențială.

Din întreg lotul de 8 cazuri cu modificări unilaterale ale motilității, un pacient avea tulburări de mișcare preexistente ale corzii vocale, evidențiate prin examinarea ORL, acesta fiind exclus din calculul final, obținând astfel un număr total de 7 pacienți cu paralizii recurențiale temporare (3,7% - comparativ cu numărul de nervi la risc). Dintre aceștia, la controlul postoperator efectuat la 6 luni de la intervenția chirurgicală a mai fost un singur pacient cu paralizie recurențială (0,5% - comparativ cu numărul de nervi la risc), iar la un an postoperator nu a existat nici un pacient cu pareză, putând afirma că în ceea ce privește paralizia recurențială permanentă, aceasta a fost zero (0%).

Studiul a evidențiat incidența paraliziei postoperatorii a corzilor vocale după o tiroidectomie efectuată de o singură echipă chirurgicală pe o perioadă relativ scurtă, rezultatele obținute arătând că funcția de deteriorare a nervului laringeu recurent este recuperată în 30 de zile în majoritatea cazurilor și aproape 100% în șase luni, însă urmărirea simplă a manifestărilor clinice în absența unui examen ORL putând duce la concluzii eronate.

Frecvența complicațiilor în cadrul lotului nostru a fost una redusă, tiroidectomia totală fiind compatibilă cu un risc acceptabil de leziuni ale nervilor laringei recurenți, însă, un lucru foarte important este acela ca pacientul să fie informat cu privire la cauzele și durata modificărilor potențiale de fonație.

Studiul II

Al doilea studiu a avut ca obiectiv evaluarea unor factori clinici și paraclinici care pot fi asociați cu patologia nodulară tiroidiană și cu complicațiile postoperatorii imediate.

Studiul a fost efectuat pe un lot de 128 de pacienți operați pentru gușă polinodulară între 2014-2016, aceștia fiind evaluați prospective. Studiul a luat în discuție mulți factori cu valoare prognostică pentru patologia nodulară tiroidiană, de la factorii de risc utilizați în

diferențierea leziunilor tiroidiene maligne sau benigne (factori care țin de istoric, caracteristici fizice, caracteristici ecografice, dimensiunea nodulului dominant, puncția biopsie cu ac fin) până la caracterele ecografice de malignitate (hipoecogenitatea, microcalcificările, marginile neregulate, fluxul sangvin crescut, invazia capsulară și adenopatiile, plus prezența nodulilor nepalpabili diagnosticați ecografic) sau factori fizici clinici sau paraclinici: gradul gușii, prezența gușii plonjante, gradul tuberculului Zuckerkandl, încadrarea tuberculului Zuckerkandl într-o categorie (mic/mare), dimensiunea ecografică maximă a lobului tiroidian ($<$ sau > 5 cm), dimensiunea nodulului dominant ($<$ sau > 1 cm), pierderea sangvină intraoperatorie, tipul operației, tipul histopatologic (malign/benign), diagnosticul histopatologic și stadiul tumoral.

Dintre factorii de risc preoperatori care se asociază mai degrabă cu benignitatea sau malignitatea, doar cei care țin de istoric și de caracterele fizice de benignitate (istoric familial de gușă benignă, rezidență în zonă endemică, femei în vârstă, nodul moale, gușă multinodulară) s-au corelat cu malignitatea, însă negativ ($p=0.0002$, $r=-0.3192$, respectiv $p=0.002$, $r=-0.2685$); astfel, putem spune că factorii de risc “mai degrabă benign” care țin de istoric și caracterele fizice reprezintă un factor de protecție, riscul acestor pacienți de a avea un nodul malign este mult mai redus. În ceea ce privește caracterele FNAB, s-a observat că cele maligne s-au corelat înalt semnificativ cu malignitatea, iar cele benigne s-au corelat negativ cu aceasta ($p=0.001$, $r=0.7385$, respectiv $p=0.001$, $r=-0.7385$). Se demonstrează, astfel ceea ce era știut din literatură, că FNAB reprezintă un bun reper pentru evidențierea malignității.

Caracterele ecografice de malignitate (hipoecogenitate, microcalcificări, margini neregulate, fluxul sangvin Doppler, invazie capsulară, adenopatii) găsite la pacienții din lotul nostru au confirmat, ceea ce era cunoscut din literatura de specialitate, că se corelează semnificativ statistic cu malignitatea, corelația cea mai puternică în lotul nostru fiind reprezentată de cea a microcalcificărilor, care a fost înalt semnificativă statistic ($p<0.0001$, $r=0.4260$), apoi a hipoecogenității ecografice a nodulilor ($p=0.001$, $r=0.2759$), a adenopatiilor ($p=0.007$, $r=0.2378$), a invaziei capsulare ($p=0.01$, $r=0.2220$) și mai puțin a marginilor neregulate ($p=0.05$, $r=0.1668$).

Simptomele preoperatorii asociate cu compresia (dispnee, disfagie, disfonie) au fost mai prezente în cazul gușilor plonjante, a nodulului dominant cu dimensiunea de peste 1 cm, precum și în cazul tuberculului Zuckerkandl de mari dimensiuni, corelându-se înalt semnificativ statistic cu gușa plonjantă ($p=0.0003$, $r=0.3157$) și cu dimensiunea de peste 1 cm a nodulului dominant ($p=0.009$, $r=0.2290$). De asemenea compararea gradului

tuberculului Zuckerkandl cu compresia a arătat că, cu cât acesta este mai mare cu atât riscul de apariție a simptomelor de compresie este mai crescut, între acestea existând o corelație foarte înaltă semnificativ statistic ($p < 0.0001$, $r_s = 0.52$).

Fenomenele de compresie se asociază cu dimensiunea tuberculului Zuckerkandl atât în cazul dimensiunii lobului tiroidian mai mică de 5 cm, cât și în cazul dimensiunii mai mari de 5 cm, dar corelația este mai puternică la pacienții cu lob tiroidian mai mic de 5 cm ($p < 0.0001$ față de doar $p = 0.01$ la cei cu lob tiroidian de peste 5 cm). Astfel, putem spune că fenomenele de compresie se asociază mai degrabă cu dimensiunea mare a tuberculului Zuckerkandl decât cu dimensiunea crescută a lobului tiroidian, aceasta probabil datorită poziției anatomice a tuberculului, a cărei creștere în dimensiune se produce într-un plan posterior față de corpul glandei.

Un alt parametru studiat a fost durata tiroidectomiei totale. Astfel, prezența gușii plonjante mediastinal retrosternal s-a corelat semnificativ statistic cu durata de peste 120 de minute a operației ($p = 0.01$, $r = 0.2450$). Încadrarea tuberculului Zuckerkandl într-o grupă de dimensiune mare (grad 2-3), precum și pierderea sangvină mai mare s-au corelat înalt semnificativ statistic cu o durată mare a intervenției chirurgicale ($p = 0.001$, $r = 0.3230$, respectiv $p = 0.004$, $r = 0.2856$).

În continuare, am încercat găsirea unor parametri care ar putea fi asociați cu apariția hipocalcemiei postoperatorii sau a parezei de nerv laringeu recurent.

În urma analizei, am constatat că dintre parametrii luați în calcul au existat unii care se asociază cu scăderea calcemiei postoperatorii sau cu pareza recurențială. Astfel, se observă că riscul de a face hipocalcemie crește cu cât gradul tuberculului Zuckerkandl e mai mare, între prezența hipocalcemiei postoperatorii și creșterea gradului tuberculului Zuckerkandl existând o corelație moderată ($r_s = 0.40$), însă foarte înalt semnificativă statistic ($p < 0.0001$), dimensiunea mare (grad 2-3) prezentând un risc mult mai mare decât dimensiunea mică (grad 0-1) a tuberculului ($p < 0.0001$, $r = 0.4756$). De asemenea, hipocalcemia postoperatorie s-a mai corelat semnificativ statistic și cu dimensiunea peste 1 cm a nodulului dominant ($p = 0.01$, $r = 0.2224$).

În ceea ce privește paralizia de nerv laringeu recurent, se observă că, cu cât gradul tuberculului Zuckerkandl e mai mare cu atât riscul de a face paralizie de nerv laringeu recurent crește, paralizia recurențială postoperatorie fiind corelată înalt semnificativ statistic cu creșterea gradului tuberculului Zuckerkandl ($p = 0.004$, $r_s = 0.25$), dimensiunea mare (grad 2-3) prezentând un risc mult mai mare decât dimensiunea mică (grad 0-1) a tuberculului ($p = 0.004$, $r = 0.2523$). De asemenea, paralizia postoperatorie de nerv laringeu recurent s-a

mai corelat semnificativ statistic și cu prezența carcinomului papilar varianta sclerozantă ($p=0.01$, $r=0.2247$).

Aceste concluzii se pot explica prin creșterea dificultății disecției în cazul unui tubercul mare, cunoscută fiind relația de strânsă vecinătate între tuberculul Zuckerkandl și paratiroidalele superioare și între acesta și nervul laringeu recurent.

Tuberculul Zuckerkandl, cu toate că a fost descris acum o sută de ani, a devenit un reper constant pentru descoperirea și conservarea nervului laringeu recurent și a glandelor paratiroidale superioare odată cu trecerea de la tiroidectomia subtotală la tiroidectomia totală pentru boală benignă, identificarea și rezecția acestuia asigurând o rezecție completă și evitând tiroidectomiile secundare pentru boala benignă.

Studiul III

Al treilea studiu a urmărit identificarea unor potențiali markeri tumorali moleculari din microveziculele plasmatiche, folosind spectrometria de masă de înaltă performanță, ceea ce ar putea duce la ușurarea detectării și diagnosticării precoce, a monitorizării pe termen lung a neoplasmelor tiroidiene, precum și la evaluarea prognosticului carcinomului comparativ cu leziunile benigne tiroidiene, în special de tip adenom folicular.

Conform unor descoperiri recente, au fost studiate mecanismele și s-au făcut progrese în descifrarea căilor de transformare a unei celule normale într-una malignă, fiind evidențiate în sânge microvezicule (MV) care sunt eliberate de către focarul de carcinom tiroidian și care conțin informație genetică și celulară. (Grogan et al., 2010; D'Souza-Schorey et al., 2012, Manne et al., 2005; Li et al., 2012; Arcinas et al., 2009, Pagni et al., 2015). În ultimele decenii, datorită identificării unor biomarkeri folosiți ca predictor ai evoluției nefavorabile, a crescut interesul pentru detectarea proteinelor din microveziculele eliberate de tumori în diferite fluide ale organismului (ascită, revărsat pleural, salivă, urină sau direct în sânge). (D'Souza-Schorey et al., 2012). Datele din literatură arată că malignitatea poate duce la concentrații sangvine crescute ale microveziculelor cu compoziții ce variază de la pacient la pacient. Microveziculele derivate din celulele tumorale pot induce angiogeneza în timpul creșterii tumorale și pot contribui la inițierea metastazării. (Chandler et al., 2013; Raposo et al., 2013; Janowska-Wieczorek et al., 2005).

Studiul a fost efectuat pe un lot de 50 de pacienți, dintre care 40 au fost operați pentru o afecțiune tiroidiană (20 cu carcinom tiroidian diferențiat – grup DTC și 20 cu adenom folicular tiroidian – grup A), iar 10 pacienți au reprezentat lotul control – grup C.

Din plasma recoltată preoperator, în întreg lotul de 50 de pacienți au fost identificate un total de 1218 proteine. Cele mai multe proteine au fost identificate în grupul A, N=921 (75,6%), mai multe decât în grupul DTC, în care au fost evidențiate 874 de proteine (71,7%), cele mai puține fiind în grupul C, 552 de proteine (45,3%). Aceeași clasificare s-a păstrat și pentru proteinele unic identificate în fiecare grup, în grupul A fiind 253 (20,7%) de proteine specifice, în timp ce 215 (17,6%) proteine au fost identificate doar în grupul DTC, iar 66 (5,4%) în grupul C. Procentul de proteine comune tuturor grupurilor a fost de 36,5%, cu un număr de 445. (Fig. 1).

Proteinele comune identificate în toate cele 3 grupuri au fost comparate cu bazele de date KEGG, câteva dintre ele fiind suprareprezentate semnificativ statistic în aceste căi de semnalizare (FDR P-value < 0.05; FDR: False Discovery Rate). Dintre acestea, harta inter-relației proteoglicanilor în cancer (KEGG 05205) s-a dovedit a fi corelată în mod special cu patologia malignă.

Analiza cantitativă a probelor tisulare tumorale și non-tumorale a indicat diferențe semnificative statistic în cazul a 10 proteine implicate în calea de semnalizare „proteoglicani în cancer” KEGG 05205.

Din cele 10 proteine asociate glicozaminoglicanilor provenite din țesutul tiroidian și microvezicule (antigenul CD44 (CD44), integrina beta-1 (ITGB1), omologul 42 al proteinei de control a diviziunii celulare (*cell division control protein 42 homolog* - CDC42), filamina-A (FLNA), Ras-related C3 botulinum toxic substrate 1 (RAC1), vitronectina (VTN), ezrina (EZR), moesina (MSN), lumican (LUM) și proteina de bază a heparin sulfat proteoglicanilor specifică membrane bazale (*basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein* - HSPG2)) 9 au prezentat un trend de supraexprimare semnificativ statistic. De notat că în afară de lumican, s-a observat că celelalte 8 proteine au fost exprimate diferit în microveziculele izolate din grupurile cu adenom tiroidian (A) și carcinom tiroidian diferențiat (DTC) față de grupul de control (C). Abundența proteinelor tisulare în CTD și A a fost exprimată în funcție de raportul tumoral versus nontumoral (t/nt).

Plasma din sângele recoltat postoperator la o lună a fost prelucrată și analizată ca și probele preoperatorii și intraoperatorii prin spectrofotometria de masă de înaltă performanță.

Analiza comparativă proteomică dintre microveziculele plasmatice și cele tisulare a identificat 8 dintre proteinele întâlnite în mod obișnuit în toate cele 3 grupuri de pacienți incluși (carcinom tiroidian diferențiat, adenom tiroidian și control) și exprimate diferit în microveziculele plasmatice: FLNA (filamin-A), RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), ITGB1 (integrina beta-1), MSN (moesina), CD44 (antigenul CD44), EZR

(ezrina), VTN (vitronectina), CDC42 (cell division control protein 42 homolog). Acestea au fost asociate cu proteoglicanii hialuronan și heparansulfat, implicați în calea de semnalizare „proteoglicani în cancer” KEGG.

Dintre cele opt proteine, 3 proteine (ITGB1, FLNA și EZR) au fost găsite în cantitate crescută în microveziculele plasmatiche atât în carcinomul tiroidian diferențiat (DTC) cât și în adenomul tiroidian (A). În grupul cu carcinom tiroidian diferențiat au existat 5 proteine care au avut o abundență crescută în microvezicule ((ITGB1, FLNA, RAC1, EZR și MSN) și o proteină cu abundență scăzută (VNT), în timp ce în grupul cu adenom tiroidian au fost 3 proteine cu abundență crescută în microveziculele de după intervenția chirurgicală (ITGB1, FLNA, EYR) și 4 proteine în cantitate mai mică (CD44, CDC42, MSN și VTN). De observat că vitronectina (VTN) a fost singura care scăzut în abundență după operație atât în carcinomul tiroidian diferențiat (DTC), cât și adenomul tiroidian (A).

Îndepărtarea chirurgicală a întregului țesut tiroidian în cadrul gușilor nodulare a fost urmată de o creștere semnificativă a proteinelor ITGB1 și FLNA atât în cazul tumorilor benigne (adenomul), cât și în cazul celor maligne (carcinomul diferențiat). După intervenție, în cazul carcinomului tiroidian diferențiat, spre deosebire de adenom, RAC1, EZR și MSN au prezentat o supraexprimare notabilă.

Rezultatele studiului nostru au demonstrat ca anumite proteine pot prezenta valori cantitative distincte și semnificative în plasma pacienților cu un tip de carcinom tiroidian diferențiat față de grupul fără afecțiuni tiroidiene. Aceste proteine împreună cu glicozaminoglicanii hialuronan și *heparan sulfate proteoglycans* au prezentat modificări semnificative ale nivelurilor ceea ce ar putea indica participarea în procesele de carcinogeneză și metastazare. Aceasta ar putea fi un indicator valoros pentru evoluția fiecărui tip de leziune tiroidiană, astfel ele putând fi luate în calcul ca niște predictori importanți ai carcinomului tiroidian diferențiat, ceea ce ar putea duce la un diagnostic precoce și la un tratament adecvat.

Studiul IV

Al patrulea studiu a încercat evaluarea unor factori genetici care ar putea fi implicați în apariția cancerului tiroidian, în patogeneza tumorilor maligne fiind incriminate multiple cauze, interacțiunea dintre fondul genetic și diferiți factorii de risc din mediul înconjurător determinând apariția acestor afecțiuni. Diferite studii sugerează prin rezultatele lor că factorii genetici, cum ar fi polimorfismele mononucleotidice, mutațiile

și rearanjamentele de inserție sau ștergere pot influența puternic susceptibilitatea individului la diferite tipuri de cancer. (Boroujeni et al., 2013)

Dintre genele implicate în patogeneza cancerului tiroidian, o parte (BRAF, RET/PTC) se găsesc preponderent în carcinomul papilar, altele (RAS, PAX8/PPAR γ) au o prevalență crescută în carcinomul folicular. Mutația V600E a genei BRAF se asociază cu caracteristici agresive ale carcinomului papilar tiroidian, cu rată de recidivă și metastazare ganglionare crescută, precum și cu scăderea capacității de iodocaptare. (Xing et al., 2013, 2016, Cabanillas et al., 2016, Iribarren et al., 2001, Haugen et al., 2016, Nikiforov 2011, Lee et al., 2013, Tufano et al., 2012, Fisher et al., 2013, Yim et al., 2013)

MMP-2 este localizată pe 16q13-q2, are 13 exoni și este capabilă să degradeze colagenul de tip IV și gelatina, care sunt principalii constituenți ai laminei bazale, precum și unele molecule bioactive, cum ar fi proteinele de legare a factorului de creștere și receptorii factorului de creștere și pot afecta evenimentele precoce în carcinogeneza și invazia tumorală și / sau metastază (Sanii et al., 2012, Saeed et al., 2013).

MMP-9 este localizată pe cromozomul 20q11.2-q13.1, fiind cel mai complex membru al familiei matrix metaloproteinazelor din punct de vedere al structurii domeniului. MMP-9 are o activitate proteolitică împotriva colagenului de tip IV, a proteinei de bază a proteoglicanilor și a elastinei.

Reglarea transcripțională este un mecanism important care influențează nivelurile de exprimare ale acestor MMP-uri. Un polimorfism funcțional mononucleotidic în elementul de reglare care acționează în regiunea promotor a MMP poate influența expresia acestei gene. (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2013) În zonele promotor ale matrix metaloproteinazelor 2 și 9 au fost identificate trei polimorfisme funcționale mononucleotidice (SNP), acestea având efecte specifice alelelor asupra reglării transcripției genei MMP. Cele trei polimorfisme sunt MMP2 1306 C>T (rs243865), MMP2 735 C>T (rs2285053) și MMP9 1562 C>T (rs3918242). (Decock et al., 2008; Zhou et al., 2007; Qiu et al., 2008)

Astfel, studiul nostru a încercat evaluarea prezenței mutației V600 E a genei BRAF în patologia nodulară tiroidiană și corelația între aceasta și evoluția postoperatorie în chirurgia pentru cancerul tiroidian; de asemenea a fost evaluată asocierea dintre secreția MMP-9 și carcinomul tiroidian și a fost analizată și prezența polimorfismelor mononucleotidice C(-

735)T al MMP-2 și C(-1562)T al MMP-9 și posibila asociere a acestora cu riscul de cancer tiroidian la populația din țara noastră.

Începand cu anul 2012 în cadrul Institutului Național de Endocrinologie C. I. Parhon a fost inițiat și derulat un **studiu prospectiv, observațional**, care ulterior, din 2014 și până în 2016, a cuprins și pacienți din Spitalul Universitar de Urgență Elias. În cadrul acestui studiu au fost înrolați 365 de pacienți nou diagnosticați cu *noduli tiroidieni cu indicație chirurgicală* care au fost investigați în cadrul Institutului Național de Endocrinologie C. I. Parhon și în Clinica de Endocrinologie, Diabet Zaharat și Boli de Nutriție Elias sau în alte secții de endocrinologie și operați în Secțiile de Chirurgie ale Spitalelor Elias și Parhon.

Analiza prezenței mutației V600E a genei BRAF s-a realizat la un număr de 150 de pacienți din întreg lotul, dintre care 79 (52,6%) au prezentat o boală benignă și 71 (47,3%) de pacienți au fost diagnosticați cu carcinom tiroidian diferențiat. Mutația V600E a genei BRAF a fost găsită doar în 10 cazuri din întreg lotul de 150 de pacienți. Toate cazurile în care a fost prezentă au avut un diagnostic de carcinom papilar, 7 cazuri fiind carcinom papilar varianta clasică și 3 cazuri forma mai agresivă de carcinom papilar varianta sclerozantă. De notat că toate cele 10 cazuri în care a fost prezentă mutația V600E a genei BRAF se aflau în stadiul pT3 sau pT4.

Prezența mutației a fost corelată înalt semnificativ statistic cu forma clasică a carcinomului papilar și cu forma sclerozantă ($p=0.008$, $r=0.21$, respectiv $p<0,0001$, $r=0.49$) și fiind corelată negativ cu adenomul folicular ($p=0.04$, $r=-0.16$). De asemenea prezența mutației V600E a genei BRAF se corelează înalt semnificativ statistic pozitiv cu stadiile avansate (pT3, pT4) ale carcinoamelor ($p<0.0001$, $r=0.35$, respectiv $p=0.002$, $r=0.24$) și negativ cu benignitatea ($p=0,002$, $r=-0,24$). Conform rezultatelor noastre, putem spune că mutația BRAF poate fi utilă în diagnosticul carcinomului papilar, prezența ei fiind corelată negativ cu benignitatea. Evoluția postoperatorie pe termen scurt nu este influențată de prezența mutației V600E a genei BRAF în carcinomul papilar, în schimb evoluția pe termen lung ar putea fi influențată de prezența mutației V600E a genei BRAF, prezența acesteia fiind corelată înalt semnificativ statistic cu stadiile avansate (pT3, pT4) ale carcinomului. De asemenea prezența mutației V600E a genei BRAF s-a corelat înalt semnificativ statistic cu forma clasică a carcinomului papilar și cu forma sclerozantă.

Secreția MMP-9 a fost studiată pe un număr de 329 de pacienți din întreg lotul: 309 pacienți cu patologie nodulară tiroidiană și 20 de subiecți sănătoși care au constituit lotul

control. După efectuarea examenului histopatologic, pacienții au fost împărțiți în două grupe: pacienți cu noduli benigni (N=176) și pacienți cu carcinom papilar tiroidian (N=133). Din punct de vedere histopatologic, grupul pacienților cu tumori maligne a cuprins 49 de cazuri cu carcinom papilar tiroidian varianta clasică (cPTC), 52 de pacienți cu carcinom papilar tiroidian varianta foliculară (fvPTC) și 32 de pacienți cu forme agresive (AGR). MMP-9 seric a fost determinat cu kit-ul Quantikine (R&D System).

Analiza comparativă între cele două grupuri de pacienți (cei cu tumori tiroidiene maligne și cei cu o patologie benignă) a constatat că valorile serice ale MMP-9 au fost semnificativ crescute la lotul cu tumori tiroidiene față de lotul control (medie $\pm$ SEM: 787,47 $\pm$ 31.24ng/ml vs, 561,45 $\pm$ 49.37ng/ml p<0.0001). Valorile serice ale MMP-9 au fost comparate în funcție de stadiul tumoral, aceasta analiză evidențiind valori semnificativ crescute în stadiul T3 față de T1 și T2 (T1 vs T3 p<0,01, T2 vs T3 p<0,03). Probele au fost comparate apoi în funcție de diagnosticul histopatologic. În carcinomul papilar varianta foliculară (fvPTC) valorile de MMP-9 au fost mai scăzute decât în carcinomul papilar varianta clasică (cPTC) sau variantele mai agresive (AGR). (596,38 $\pm$ 34.76ng/ml vs 760,35 $\pm$ 70.54ng/ml, respectiv 835.75 $\pm$ 109.9ng/ml, p<0,05). Analiza valorilor MMP-9 în funcție de invazivitatea tumorală a arătat că pacienții cu tumori invazive au avut valori semnificativ mai mari decât cei cu tumori non-invazive (838.14 $\pm$ 80.3ng/ml vs 618.68 $\pm$ 30.9ng/ml, p<0.02). Astfel, putem spune că valorile serice MMP-9 pot indica riscul unor tumori invazive și cu o agresivitate crescută, cu influență în rezultatul tratamentului cu radioiod și a evoluției postoperatorii.

Studierea polimorfismelor mononucleotidice C(-735)T al MMP-2 și C(-1562)T al MMP-9 s-a realizat la cei 365 de pacienți incluși în studiu. S-a aplicat o analiză statistică specifică evaluării riscului dat de un anumit genotip asupra apariției unei patologii specifice, în cazul de față asupra dezvoltării carcinomului papilar tiroidian cu cele două forme ale sale cuprinse în studiul nostru, varianta clasică și varianta foliculară.

Am realizat astfel, folosind testele de asociere specifice pentru echilibrul Hardy-Weinberg (HWE - Hardy-Weinberg equilibrium) o analiză între grupul pacienților cu carcinom papilar tiroidian (varianta clasică + varianta foliculară) și grupul pacienților cu patologie benignă (atât grupul gușă + adenom, cât și doar grupul gușă). De asemenea am analizat alte două comparații, pe de o parte între pacienții cu carcinom papilar tiroidian varianta clasică și cei cu gușă polinodulară, iar pe de altă parte între pacienții cu carcinom papilar tiroidian varianta foliculară și cei cu gușă polinodulară.

Distribuția genotipurilor polimorfismului 735 CT al MMP-2 / 1562 CT al MMP-9 a fost în concordanță cu echilibrul Hardy-Weinberg în toate grupurile de pacienți comparate.

În urma acestei analize s-au desprins câteva concluzii cu semnificație statistică legate de polimorfismele mononucleotidice studiate:

Astfel, în cazul polimorfismului 735 CT al MMP-2, prezența genotipului heterozigot CT, cât și a genotipului combinat CT + TT s-a corelat semnificativ statistic cu carcinomul papilar tiroidian varianta foliculară comparativ cu gușa polinodulară. Se observă astfel că la genotipurile care au alela T (CT sau CT + TT) comparativ cu genotipul fără alela T (CC) din cadrul polimorfismului 735 CT al MMP-2, riscul de a dezvolta un carcinom papilar tiroidian varianta foliculară este de 2 ori mai mare.

În cazul polimorfismului 1562 CT al MMP-9 s-a constatat că prezența alelei T comparativ cu alela C s-a corelat semnificativ statistic cu malignitatea tumorală (carcinomul tiroidian) atât în comparație cu întreaga patologia benignă analizată (gușă + adenom), cât și cu lotul doar al pacienților cu gușă nodulară. De asemenea, s-a corelat înalt semnificativ statistic cu carcinomul papilar tiroidian varianta clasică în comparație cu lotul pacienților cu gușă polinodulară și nu s-au asociat semnificativ statistic cu carcinomul papilar tiroidian varianta foliculară.

De asemenea, tot în cadrul polimorfismului 1562 CT al MMP-9, prezența genotipului CT, cât și a celui combinat (CT + TT) a fost corelată semnificativ statistic cu patologia malignă tiroidiană atât în comparație cu întreg lotul benign analizat (gușă + adenom), cât și în comparație doar cu gușa polinodulară. De asemenea, s-a corelat înalt semnificativ statistic cu carcinomul papilar tiroidian varianta clasică în comparație cu lotul pacienților cu gușă polinodulară și nu s-au asociat semnificativ statistic cu carcinomul papilar tiroidian varianta foliculară.

Astfel, se poate observa că la genotipurile care au alela T (CT sau CT + TT) comparativ cu genotipul fără alela T (CC) din cadrul polimorfismului 1562 CT al MMP-9, riscul de a dezvolta un carcinom papilar tiroidian este de 2 ori mai mare și de aproape 4 ori mai mare riscul de a dezvolta un carcinom papilar tiroidian varianta clasică, în timp ce alela *wildetype* poate fi considerată un factor de protecție, analiza ei ca factor de risc comparativ cu alela T arătând o corelație inversă între prezența alelei C și riscul de cancer tiroidian și în special de carcinom papilar tiroidian varianta clasică.

Direcții viitoare de cercetare derivate din studiul actual:

1. Prognosticul pe termen lung al pacienților operați pentru un carcinom tiroidian ar trebui evaluat pe studii epidemiologice prospective, multicentrice, care să cuprindă un număr mai mare de pacienți, urmăriți atât de la aflarea diagnosticului cât și postoperator prin numere personale de identificare în toată rețeaua de sănătate locală, pe perioade lungi de timp, ideal minim 5 ani postoperator.

2. Considerăm că ar fi util un studiu mai amplu, prospectiv, privind complicațiile postoperatorii după intervențiile pentru carcinomul tiroidian în care toți pacienții să fie evaluați atât pre cât și postoperator prin examen fibroscopic ORL, reușind astfel să descoperim cu acuratețe toate cazurile cu complicații postoperatorii, atât cele cu manifestări clinice cât mai ales pe acelea mute simptomatologic.

3. Studiul nostru privind implicarea tuberculului Zuckerkandl în apariția diferitelor simptome, cât și a complicațiilor postoperatorii legate de lezarea glandelor paratiroide sau a nervului laringeu recurent, ar putea fi continuat pe loturi mai extinse de pacienți împărțiți în grupe cu aceeași patologie și, de asemenea, ar fi utilă studierea intraoperatorie a relației de vecinătate a acestuia cu nervul laringeu recurent și glandele paratiroide.

4. Deși valoroase, datele noastre privind markerii tumorali moleculari din microveziculele plasmatice evidențiați folosind spectrometria de masă de înaltă performanță ar trebui interpretate cu precauție din cauza numărului redus de pacienți din grupurile examinate, putând constitui totuși un început în cercetarea din țara noastră privind implicațiile markerilor plasmatici moleculari în carcinomul tiroidian, care ar putea fi continuat pe loturi mai mari de pacienți.

5. În aceeași idee, având în vedere numărul mic de cazuri în care a fost prezentă mutația V600E a genei BRAF, procentele fiind diferite de cele din literatură, rezultatele studiului nostru ar trebui utilizate cu atenție, putând constitui o bază de pornire pentru studii ulterioare pe populația din țara noastră, care ar putea oferi informații suplimentare.

6. Identificarea polimorfismului 1562 CT al MMP-9 ca factor de risc pentru carcinomul tiroidian și mai ales pentru carcinomul papilar varianta clasică, precum și identificarea polimorfismului 735 CT al MMP-2 ca factor de risc pentru carcinomul papilar tiroidian varianta foliculară reprezintă unele din rezultatele cele mai importante ale acestei teze. Ar merita luarea în calcul și studierea și a altor polimorfisme în raport cu malignitatea tiroidiană, precum și introducerea acestora într-un algoritm de diagnostic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Arcinas A, T. YenTY, Kebebew E, Macher BA. Cell surface and secreted protein profiles of human thyroid cancer cell lines reveal distinct glycoprotein patterns. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 3958-3968.

Boroujeni HR, Karimi M, Moshkelani S, Parsaei P. Association of the p53 codon 72 polymorphism with breast cancer in central part of Iran. *African J Pharm Pharmacol* 2013;7, 356-9.

Busaidy NL, Cabanillas ME. Differentiated thyroid cancer: Management of patients with radioiodine nonresponsive disease. *Journal of Thyroid Research* 2012:1-12.

Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet* 2016;388:2783-2795.

Chandler WL. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2013; 24: 125-132.

Cooper DS, Ladenson PW. The Thyroid Gland (Chapter 7). In David G. Gardner, Dolores Shoback (editori). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 9th ed. The McGraw-Hill Companies, USA, 2011, ISBN 978-0-07-162243-1.

D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes & Development* 2012; 26: 1287-1299.

Decock J, Paridaens R, Ye S. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin. Genet.* 2008; 73, 197–211.

Feldman EC, Nelson RW. Canine ad feline endocrinology reproduction. Third Edition. Ed. Saunders, Elsevier Science 2004:219.

Fisher KE, Jani JC, Fisher SB, Foulks C, Hill CE, Weber CJ, Cohen C, Sharma J. Epidermal growth factor receptor overexpression is a marker for adverse pathologic features in papillary thyroid carcinoma. *J Surg Res.* 2013;185(1):217-24.

Ghid pentru diagnosticul și tratamentul cancerului tiroidian diferențiat derivat din epiteliul folicular și cancerului tiroidian medular, extras din Ghidurile de practică medicală pentru specialitatea endocrinologie anexe 5 și 6, Monitorul Oficial, Partea I, nr.799 din 30 noiembrie 2010.

Grogan RH, Mitmaker EJ, Clark OH, The evolution of biomarkers in thyroid cancer- from mass screening to a personalized biosignature. *Cancers* 2010; 2: 885-912.

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1-92.

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1-92.

Iribarren C, Haselkor T, Tekawa IS, Friedma GD. Cohort study of thyroid cancer in San Francisco bay area population. *International Journal of Cancer* 2001;93:745.

Lee YM, Lee JB. Prognostic value of epidermal growth factor receptor, p53 and galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma. *J Int Med Res.* 2013;41(3):825-34.

Li X, Wang Z, Liu J, Tang C, Duan C, Li C. The thyroid cancer PAX8-PPARG Fusion Protein activates Wnt/TCF responsive cells that have a transformed phenotype *Endocrine-Related Cancer* 2012; 19: 681- 694.

Manne U, Srivastava RG, Srivastava S. Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment. *Drug Discov. Today* 2005; 10: 965–976.

Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):569-77.

Pagni F, L'Imperio V, Bono F, Garancini M, Roversi G, De Sio G, Galli M, Smith AJ, Chinello C, Magni F. Proteome analysis in thyroid pathology *Expert Rev. Proteomics* 2015; 12: 375-390.

Qiu W, Zhou GQ, Zhai Y. No association of MMP-7, MMP-8, and MMP-21 polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008;17:2514–2518.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2013; 200: 373-383.

Saeed HM, Alanazi MS, Parine NR, et al (2013). Matrix metalloproteinase-2 (-1306 c>t) promoter polymorphism and risk of colorectal cancer in the Saudi population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:6025-6030.

Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Archives of Surgery* 1998;133:419.

Sanii S, Saffar H, Tabriz HM, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2, but not caspase-3, facilitates distinction between benign and malignant thyroid follicular neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2175-8.

Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strog EW, Begg C, Vlamis V. Pronostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *American Journal of Surgery* 1992;164:658.

Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope*. 2004;114(3):393-402.

Tennvall J, Biorklund A, Moller T, Ramstam J, Akermam M. Is the EORTC pronostic index of thyroid cancer in differentiated thyroid carcinoma?: retrospective multivariate analysis of differentiated thyroid carcinoma with long follow-up. *Cancer* 1986;57:1405.

Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(5):274-86.

Tuttle et al, NCCN Guidelines for Thyroid cancer Version 2.2013

Wang F, Jin X-P, Zhu M, et al. Genotype association of C (-735) T polymorphism of the MMP-2 gene with the risk of carotid atherosclerosis-vulnerable plaque in the Han Chinese population. *Vasc Med* 2011;16:13-18.

Xing M, Alzahrani AS, Carson KA et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:42-50.

Yim JH, Kim EY, Bae Kim W, Kim WG, Kim TY, Ryu JS, Gong G, Hong SJ, Yoon JH, Shong YK. Long-term consequence of elevated thyroglobulin in differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2013;23(1):58-63.

Zhang Y, Gu Z, Qui G. Association of the polymorphism of MMP2 with the risk and severity of lumbar disc degeneration in the Chinese Han population. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:1830-4.

Zhou G, Zhai Y, Cui Y. Functional polymorphisms and haplotypes in the promoter of the MMP2 gene are associated with risk of nasopharyngeal carcinoma. *Hum. Mutat*. 2007;28:1091–1097.

LISTA DE PUBLICAȚII

A. Articole din tema tezei publicate în reviste:

1. The Tubercle of Zuckerkandl is Associated with Increased Rates of Transient Postoperative Hypocalcemia and Recurrent Laryngeal Nerve Palsy after Total Thyroidectomy. **C. Giulea**, O. Enciu, EA Toma, V. Calu, A. Miron. *Chirurgia*, 2019; 114(5): 579-585.
2. Total Thyroidectomy for Malignancy - Is Central Neck Dissection a Risk Factor for Recurrent Nerve Injury and Postoperative Hypocalcemia? A Tertiary Center Experience in Romania. **C. Giulea**, O. Enciu, A. Toma, S Martin, S Fica, A. Miron. *Acta Endocrinologica* (Buc), 2019, 15: 80-85.
3. Pemberton's Sign and Intense Facial Edema in Superior Vena Cava Syndrome due to Retrosternal Goiter. **C. Giulea**, O. Enciu, M. Nadragea, C. Badiu, A. Miron. *Acta Endocrinologica* (Buc), 2016, 12(2): 227–229.
4. Prospective evaluation of recurrential complications after total thyroidectomy. **C Giulea**, S Martin, D Safta, A Miron. *Acta Endocrinologica* (Buc), 2015, 11: 124-129.
5. Proteomic Analysis of Plasma Molecular Markers as Predictors of Differentiated Thyroid Cancer. A. E. Baciuc, E. Uyy, V. I. Suica, R. M. Boteanu, A. I. Popescu, **C. Giulea**, D. Manda, C. Badiu, F. Antohe. *Romanian Reports in Physics*, 2017, 69(601).
6. The Tubercle of Zuckerkandl – Significance in Thyroid Surgery. **C Giulea**, O Enciu, FM Filipoiu, A Miron. *Revista Română de Anatomie funcțională și clinică, macro- și microscopică și de Antropologie*, 2015, XIV(3):422-424.
7. Total Thyroidectomy – Surgical Anatomy Considerations. A. Miron, **C. Giulea**, O. Enciu, Fl. Andrei, F.M. Filipoiu. *Revista Română de Anatomie funcțională și clinică, macro- și microscopică și de Antropologie*, 2015, XIV(2):231-234 (autor corespondent).

B. Lucrări din tema tezei publicate în reviste de rezumate:

1. Postoperative hypoparathyroidism in patients after total thyroidectomy - experience of a tertiary center in Romania. CS Martin, M Andrei, O Parfeni, A Sirbu, C Barbu, **C Giulea**, A Miron, Fl Andrei, S Fica. *Endocrine Abstracts* (2019) 56.
2. Thyroid cancer prevalence and pathological features in thyroidectomy patients - five years experience. O-S Enache, S Martin, O Ion, A Grigore, I Bojoga, O Parfeni, A Sirbu, C Barbu, **C Giulea**, A Miron, Fl Andrei, S Fica. *Endocrine Abstracts* (2018) 56.
3. The role of platelet activation and inflammation in patients with differentiated thyroid cancer. S Martin, O Ion, A Grigore, O Enache, A Sirbu, C Barbu, **C Giulea**, A Miron, Fl Andrei, S Fica. *Endocrine Abstracts* (2018) 56.
4. Advanced medullary thyroid cancer with metastatic disease at diagnostic in young patient negative for RET mutation- to treat or not to treat with tyrosine-kinase inhibitors. M Costache Outas, **C Giulea**. *Endocrine Abstracts* (2018) 56.
5. Is there an impact of the concurrent presence of chronic autoimmune thyroiditis in differentiated thyroid cancer patients? S Martin, O Budianu, O Ion, A Grigore, A Sirbu, C Barbu, **C Giulea**, A Miron, Fl Andrei, S Fica. *Endocrine Abstracts* (2017) 56.
6. Does serum Galectin-3 add value in thyroid cancer diagnosis? R Dobrescu, S Schipor, D Manda, C Picu, **C Giulea**, AM Niculescu, C Badiu, A Caragheorgheopol. *Endocrine Abstracts* (2016) 41.
7. Prevalence of BRAF V600E mutation in Romanian thyroid tumors patients. S Schipor, D Manda, S Vladiu, A Caragheorgheopol, **C Giulea**, DM Ilie, C Badiu. *Endocrine Abstracts* (2016) 40.

C. Lucrări din tema tezei prezentate la congrese și conferințe

1. Thyroid nodules molecular diagnostic. D Manda, S Vlădoiu, S Schipor, C Picu, A Pădure, A Mureșan, Ș Radian, I Baci, **C Giulea**, D Ioachim, D Niculescu, D Terzea, A Caragheorgheopol. Conferinta Nationala a Asociatiei de Medicina de Laborator, Editia a treia, Iași 2019.
2. Rezecție completă de carcinom tiroidian anaplastic voluminos invaziv. **C. Giulea**, T. Birca, Mădălina Tartalea, A. Miron. Congresul Național de chirurgie, Craiova 2019.
3. Asocierea dintre nivelurile serice de MMP-9, polimorfismul MMP-9 -1562 C/T și carcinomul papilar tiroidian. D Manda, R Dobrescu, C Picu, S Schipor, A Pădure, L Pârvu, D Ioachim, **C Giulea**, C Badiu, A Caragheorgheopol. Al XII-lea Congres al Asociației de Endocrinologie Clinică din România 2017.
4. Proteomic Analysis of Plasma Molecular Markers as Predictors of Differentiated Thyroid Cancer. A. E. Baci, V. I. Suica, E. Uyy, R. M. Boteanu, A. I. Popescu, **C. Giulea**, D. Manda, C. Badiu, F. Antohe. 2015 Annual Scientific Conference, University of Bucharest, Faculty of Physics, Bucuresti, 19 iunie 2015.
5. Mutația BRAF și evoluția pe termen scurt în chirurgia pentru cancerul tiroidian. **C Giulea**, D Manda, S Fica, C Badiu, F Andrei, O Enciu, A Miron. Conferința Națională de Chirurgie, Bucuresti 2015.
6. Tuberculul lui Zuckerkandl – Un reper anatomic constant pentru descoperirea nervului laringeu recurent. O Enciu, **C Giulea** Conferința Națională de Chirurgie, Bucuresti 2015.

D. Premii:

1. **Premiul Maria Brisse** pentru lucrarea:

Asocierea dintre nivelurile serice de MMP-9, polimorfismul MMP-9 -1562 C/T și carcinomul papilar tiroidian. D Manda, R Dobrescu, C Picu, S Schipor, A Pădure, L Pârvu, D Ioachim, **C Giulea**, C Badiu, A Caragheorgheopol A. Al XII-lea Congres al Asociației de Endocrinologie Clinică din România 2017.