
TEZĂ DE DOCTORAT

Studii și cercetări privind factorii
de risc în gușa nodulară și cancerul
tiroidian

Doctorand **Andra Piciu**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Alexandru Irimie**

Studii și cercetări privind factorii de risc în gușa nodulară și cancerul tiroidian

Doctorand: Andra Piciu

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Alexandru Irimie

Cuprins

Partea generală	2
Studiul 1 - Studiu epidemiologic și statistic al gușii nodulare și al cancerului tiroidian în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca și în Spitalul Universitar "Archbishop Makarios III", din Cipru	4
Studiul 2 - Studiul relației dintre expunerea la Bisfenol A și derivații clorinați ai acestuia și funcția tiroidiană	5
Studiul 3 - Evaluarea riscului cardiovascular la pacienții cu cancer tiroidian tratați radical	7
Concluzii generale	8

Cuvinte cheie

- Cancer tiroidian
- Gușă nodulară
- Disruptori endocrini
- Bisfenol A
- Bisfenol F
- Derivați clorinați ai bisfenolului A
- Risc cardiovascular
- Proteina C reactivă înalt sensibilă

Partea generală

Gușa nodulară este mărirea în volum a glandei tiroide datorată dezvoltării de noduli, cu frecvența cea mai crescută în rândul tuturor cauzelor de creștere în dimensiune ale acestui organ. Gușa nodulară apare în formă endemică în regiunile în care există deficit de iod în sol și în alimentație, cu precădere în apa de consum. Regiunea endemică a României, pentru gușa nodulară, este zona Munților Apuseni.

Cancerul tiroidian este cea mai frecventă tumoră endocrină; deși este o patologie malignă inclusă în rândul cancerelor rare, cu o incidență de maxim 6 cazuri la 100 000 locuitori, incidența sa este în continuă creștere în ultimele două decenii.

Aproximativ 5% dintre femei și 1% dintre bărbații normotiroidieni din regiunile non-endemice (unde nu se identifică deficit de iod în apă, alimentație și în sol), prezintă la palpare noduli tiroidieni. Dintre nodulii tiroidieni identificați în populația generală, 5-15% pot fi reprezentați de cancerul tiroidian, în corelație anamnetică cu antecedentele heredocolaterale, personale patologice și expunerea la toxice. Comparativ cu tumorile benigne ale glandei tiroide, cancerul tiroidian (CT) se diferențiază prin capacitatea tumorii de a invada țesuturile învecinate și capacitatea lor de metastazare la distanță. Din anul 2004, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a introdus împărțirea CT în funcție de tipul histologic în cancer tiroidian diferențiat (CTD), cancer tiroidian medular (CTM) și cancer tiroidian anaplastic (CTA). Din totalul cancerelor tiroidiene, peste 80% sunt reprezentate de carcinoamele tiroidiene diferențiate, 5-10% sunt carcinoamele anaplastice, iar 5-10% cele medulare.

În literatura de specialitate cele mai frecvent citate cauze de apariție a gușii nodulare și a cancerului tiroidian sunt: stimularea cronică prin hormonul tireotrop (thyroid stimulating hormone, TSH), radiațiile ionizante, factorii de mediu, factorii imunologici (prin asocierea cu tiroiditele autoimune) și factorii genetici.

Disruptorii endocrini reprezintă substanțe chimice artificiale, care la anumite doze au capacitatea de a interfera cu axul hormonal al organismului și de a produce efecte asupra dezvoltării, asupra reproducerii, asupra sistemului imun și a celui neurologic. Cel mai răspândit disruptor endocrin din mediul ambiant este Bisfenolul A (BPA). Acesta este un monomer de sinteză care stă la baza obținerii policarbonatului (PC) și a rășinilor epoxy, care face parte din grupa derivaților de difenilmetan și a bisfenolilor, fiind incolor, solid, solubil în solvenți organici și puțin solubil în apă. Eliberarea BPA din materialele plastice și integrarea sa în organismul uman se realizează prin expunerea policarbonatului la modificările de temperatură și condițiile meteo.

În absența unei patologii tiroidiene de tip autoimun, identificarea BPA în urină se asociază cu anomalii ale hormonului de stimulare tiroidiană (TSH) și ale tiroxinei libere (FT4), fie în sensul unei hiperfuncții, fie în sensul unei hipofuncții. Această interferență a BPA cu funcția tiroidiană ar putea duce la apariția nodulilor tiroidieni, considerându-se astfel că disruptorii endocrini ambiantali ar putea reprezenta factori de risc pentru apariția acestei patologii.

Etapele de diagnostic ale patologiei nodulare tiroidiene presupun inițial realizarea unei anamneze amănunțite, care să cuprindă și expunerea la factorii

de risc pentru gușa nodulară sau cancerul tiroidian și antecedentele familiale în contextul posibilității existenței unei forme de agregare familială. Ulterior, se realizează examenul clinic al regiunii cervicale și examinările paraclinice care vor duce la confirmarea diagnosticului. În etapa următoare a diagnosticului, examinarea clinică este completată de examinările paraclinice. Este importantă determinarea funcției glandei tiroide prin determinări serologice de laborator. Acestea se realizează prin recoltare de sânge venos și dozarea valorii TSH-ului, având intervalul de referință între 0,27 și 4 mUI/L și a T4 liber (FT4) al cărui interval de referință este între 12-22 pmol/L, T3 liber (FT3), cu valori normale 3,4-6,8 pmol/L, precum și a anticorpilor antitiroidperoxidază (Anti-TPO), cu valori normale <34 UI/mL și anticorpilor anti-tiroglobulina (anti-Tg), cu valori normale <115 UI/mL. În spectrul examinărilor serologice, trebuie menționată și existența unor markeri specifici pentru tumorile tiroidiene, Tiroglobulina (Tg) singurul marker tiroidian unanim acceptat pentru cancerul tiroidian diferențiat și calcitonina pentru forma medulară, cu valoarea normală <13 pmol/mL. Următoarea examinare în etapa diagnostică, de altfel esențială, presupune vizualizarea tiroidei și a posibililor noduli, prin ecografie tiroidiană. Această examinare permite identificarea unor particularități imagistice care ar putea diferenția sau cel puțin ar putea ridica suspiciunea, asupra unei tumori maligne la nivelul glandei. Examinarea ultrasonografică permite identificarea și descrierea adenopatiilor la nivel cervical conform regiunilor anatomice descrise anterior. În situația identificării la ecografia tiroidiană a unui nodul solid, hipoecogen, în general cu dimensiuni mai mari de 1 cm, în cazuri particulare subcentimetric, se indică efectuarea unei puncții biopsii aspirative cu ac fin (FNAB) care permite identificarea naturii histologice a nodului, având o sensibilitate de 83% și o specificitate de până la 100%. Adăugarea markerilor imunohistochimici (RAS, RET/PTC, BRAF) pe piesa de biopsie obținută va crește acuratețea diagnosticului.

Tratamentul cancerului tiroidian diferențiat este multidisciplinar și se realizează în funcție de stadiul bolii. Această stadializare în funcție de vârstă permite aplicarea unei terapii de eficiență maximă și agresivitate cât mai redusă. Ablația chirurgicală este tratamentul de primă intenție în CTD, putându-se opta pentru tiroidectomie totală sau lobectomie tiroidiană. Radioiodoterapia este metodă terapeutică ce presupune iradierea selectivă a țesuturilor captante de iod din organism cu ajutorul I-131, radionuclid care se administrează per os. Administrarea hormonoterapiei care va substitui funcția tiroidiană este esențială în managementul CTD. Se vor administra doze de Levotiroxină (LT4), între 2-2,5 μg/kg corp, care vor menține TSH-ul în supresie, la o valoare de sub 0,1 mUI/L, evitându-se astfel stimularea țesutului tumoral posibil restant postterapeutic.

În urma administrării tratamentului CTD, urmărirea pacientului oncologic este necesară pe toată durata vieții. Astfel controlul oncologic se efectuează la fiecare 6-12 luni și presupune dozarea Tg, a anti-Tg, valoarea TSH-ului și o ecografie tiroidiană. Statusul oncologic se evaluează prin detectarea oricărui rest de țesut tiroidian prin valoarea Tg, în urma stimulării prin defrenarea TSH-ului. Defrenarea se poate realiza fie prin întreruperea administrării terapiei hormonale substitutive pe o perioadă de 2-4 săptămâni sau prin administrarea de TSH recombinant (rhTSH), două zile consecutiv 0,9 ml în injecție intramusculară. O defrenare eficientă este atunci când TSH-ul atinge valori de cel puțin 40mUI/L sau va realiza o creștere de 100 de ori față de valoarea

identificată sub tratament hormonal. La aceste valori ale TSH-ului, sensibilitatea Tg este mai crescută.

În cazul cancerului tiroidian diferențiat, a cărui supraviețuire depășește 90% la 20 de ani, urmărirea pe parcursul întregii vieți presupune inducerea unei perioade de hipotiroidism. În consecință, acestor pacienți li se pot induce dezechilibre metabolice de intensități variate, cel mai frecvent ale metabolismului lipic, date de întreruperile repetate ale terapiei hormonale substitutive. S-a demonstrat faptul că pacienții cu CTD sunt mai predispuși riscului de a dezvolta boală cardiovasculară față de populația generală, pornindu-se de la premisa că hipotiroidismul duce la apariția hipercolesterolemiei, la creșterea low-density lipoprotein colesterolului (LDL-C) prin scăderea clearance-ului său hepatic la scăderea activității lipoprotein lipazei, creșterea valorilor trigliceridelor și la apariția obezității.

Boala cardiovasculară cuprinde o varietate mare de boli cu impact major asupra inimii, precum aritmiile, defectele cardiace congenitale, infecțiile cardiace, dar și afecțiuni ale vaselor de sânge, cum ar fi ateroscleroza și hipertensiunea. Riscul de apariție a bolii cardiovasculare se analizează prin calcularea scorurilor prognostice bazate pe evaluarea pentru fiecare pacient a factorilor de risc cardiovasculari.

Asocierea procesului inflamator de aterogeneză, cu riscul de dezvoltare a unui eveniment cardiovascular acut, se poate realiza prin dozarea markerului biochimic proteina C-reativă înalt sensibilă (hsCRP). În funcție de valoarea hsCRP obținută pacienții sunt împărțiți în 3 grupe de risc: risc cardiovascular scăzut, când hsCRP este <1mg/L, risc cardiovascular intermediar, la o valoare a hsCRP între 1-3 mg/L și risc cardiovascular înalt, în cazul în care hsCRP este >3 mg/L, însă <10mg/L. Dacă valoarea hsCRP depășește 10mg/L se recomandă investigarea unei surse de infecție sau inflamație în organism, care interferează cu valoarea predictivă a hsCRP.

Studiul 1

Studiu epidemiologic și statistic al gușii nodulare și al cancerului tiroidian în Institutul Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca și în Spitalul Universitar “Archbishop Makarios III”, din Cipru

La baza realizării acestui studiu între cele două populații, din Cipru și din România asupra cancerului tiroidian, a tiroiditei și a nodulilor tiroidieni a stat observația cu privire la diferența extrem de mare între incidența cancerului tiroidian raportată de către Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului în 2012 în populația de sex feminin din Cipru față de cea din România. Incidența estimată este de 16,7 la 100 000 de femei în Cipru, comparativ cu 5,3 la 100 000 de femei în România, iar în Cipru cancerul tiroidian este ca și incidență în populația de sex feminin pe locul 3 în rândul tuturor localizărilor, după cancerul de sân și cel de colon, iar în România, cancerul tiroidian este pe locul 12.

Studiul de față și-a derulat activitatea în direcția identificării punctuale a factorilor de risc cunoscuți deja pentru boala tiroidiană în populația de sex feminin din România și cea din Cipru și identificarea unor alte elemente ce țin de mediu, de obiceiurile alimentare sau de rutina zilnică în cele două populații.

La finalul perioadei de recrutare cele două echipe de cercetare au reușit să creeze o bază de date alcătuită din câte 2 cohorte, una cu pacientele caz, cu noduli tiroidieni identificați ecografic și una control, cuprinzând paciente fără patologie nodulară tiroidiană. Astfel, din România au fost recrutate 51 cazuri și 41 de controale, iar din Cipru au fost recrutate 57 de cazuri și 65 de controale. După completarea bazei de date cu toți parametrii de investigat, de către ambele echipe, aceasta a fost supusă analizei statistice.

În urma rezultatelor studiului din cadrul cooperării bilaterale România-Cipru, s-a concluzionat că incidența cancerului tiroidian în populația de sex feminin din Cipru a fost superioară față de cea din România.

Am observat că populația de sex feminin din România care suferă de gușă nodulară are media indicelui de masă corporală mai mare decât populația de sex feminin cu formațiuni nodulare tiroidiene, din Cipru. Această observație este importantă, pentru a lua în considerare, un posibil tratament personalizat pentru pacientele cu IMC crescut din populația României, acestea având un factor de risc crescut pentru boala cardiovasculară.

Din analiza valorilor hormonilor tiroidieni, am concluzionat că funcția tiroidiană la pacientele cu noduli tiroidieni identificați prin ultrasonografie, a fost mai scăzută în cohorta din Cipru față de cea din România.

O ultimă observație cu foarte mare relevanță clinică este faptul că peste 50% din populația feminină atât din Cipru, cât și din România, a prezentat noduli tiroidieni cu localizare multiplă, în ambii lobi tiroidieni. Această concluzie este de o deosebită importanță pentru posibilitatea dezvoltării ulterioare din acești noduli a unor cancere tiroidiene multiloculare, care ar putea schimba complet evaluarea bolii oncologice și abordarea terapeutică.

În lipsa unor concluzii certe și susținute de dovezi științifice cu privire la factorii de risc din mediu care ar putea fi cauza unei incidențe mai crescute a cancerului tiroidian în Cipru față de România este necesară realizarea unor cercetări suplimentare în această direcție. Un astfel de element din mediu ar putea fi un disruptor endocrin, precum Bisfenolul A, a cărui interferență cu axul hormonal tiroidian este cunoscută și care ar putea duce la apariția nodulilor tiroidieni, iar prin expunere cronică chiar la malignizarea acestora.

Studiul 2

Studiul relației dintre expunerea la Bisfenol A și derivații clorinați ai acestuia și funcția tiroidiană

Studiul de față este un studiu pilot, de tip caz-martor, bicentric prin care s-a studiat asocierea între nivelurile urinare ale BPA, BPF și derivații clorinați ai BPA, ClxBPA și prezența nodulilor tiroidieni sau a modificărilor valorilor hormonilor tiroidieni, TSH și FT4 la populația adultă de sex feminin din Cipru și din România.

Au fost înrolate în studiu un număr de 212 femei, 122 din Cipru și 90 din România. Dintre acestea, 106 au fost controale, iar celelalte 106 au fost cazuri martor. Folosind datele colectate din ambele populații, în urma analizei statistice s-a observat că grupul femeilor din grupul de cazuri martor a fost mai tânăr decât grupul de cazuri, cu o medie de 42 ani, compartaiv cu 52 de ani, iar IMC al

acestui grup a fost mai mic comparativ cu cel al cazurilor, cu o medie de 25 kg/m² comparativ cu 27 kg/m².

Din analizele statistice realizate pe datele culese de la pacientele recrutate în studiu, am observat că expunerea la BPA a fost asociată cu modificări ale valorilor TSH-ului circulant în sânge în populația feminină din ambele regiuni geografice participante la studiu. Am sesizat așadar o corelație pozitivă, semnificativă statistic între valoarea BPA urinar și a TSH seric, corelație care s-a menținut chiar și după prelucrarea statistică a datelor în funcție de posibili cofactori, precum valoarea iodului din urina spot, statusul bolii tumorale tiroidiene, IMC, vârstă. Nu am observat aceleași corelații pentru expunerea la BPF sau la ClxBPA.

În studiul desfășurat de către echipa din România și cea din Cipru, este posibil ca valorile crescute ale BPA urinar din grupul de control să se datoreze anumitor obiceiuri alimentare sau expunerii la anumite surse de BPA. După ajustarea rezultatelor și interpretarea lor în funcție de valoarea creatininei urinare, a locului de desfășurare a studiului, statusul bolii, vârstă și IMC, am constatat că un consum zilnic de apă din bidoanele de 20L și frecvența utilizării produselor de îngrijire personală au reprezentat variabile predictive semnificative pentru valorile BPA urinar. Reinterpretarea analizei valorilor BPA urinar în funcție de statusul bolii a dus la concluzia că frecvența utilizării produselor de îngrijire personală și consumul de apă din sticle de 20L rămân variabile predictive semnificative pentru nivelul de BPA în urină, însă numai în grupul cazurilor, al pacientelor cu noduli tiroidieni detectați ecografic, dar nu și în grupul de control.

Nu am observat o asociere între expunerea la compoziția BPA și incidența nodulilor tiroidieni, dar nu există date în literatură care să facă referire la studiul acestei asocieri. În mod surprinzător, am observat faptul că pacientele cu noduli tiroidieni au avut niveluri mai scăzute ale BPA urinar în comparație cu femeile sănătoase incluse în studiu, observație valabilă pentru ambele locații ale studiului, totuși analiza statistică a odds ratio per unitate logaritmică a valorilor crescute ale BPA în urină nu au atins pragul de semnificație statistică.

Per total, în studiul desfășurat expunerea la BPA a fost mai mare decât valorile prezentate în literatură. Mediana valorilor BPA urinare în populația recrutată în studiu, atât în Cipru, cât și în România a fost 1,5μg/L (2,1μg/g) respectiv 3,8μg/L (4,7μg/g). Într-un studiu desfășurat anterior în Cipru pe o populație de 244 adulți, valorile BPA urinare au corespuns cu cele obținute în studiul prezent, fiind de 2,1μg/g. Urina recoltată din populația din România inclusă în studiu a fost analizată prima dată în laboratorul din Limasol, iar valorile mediane obținute au fost mai mari decât cele mediane raportate în alte țări.

Mediana valorilor urinare ale BPA a fost aproximativ de două ori mai mare în România comparativ cu Cipru. Valorile urinare ale BPF au fost mai crescute atât în populația din România, cât și din Cipru, comparativ cu valorile citate în literatură. Am constatat o asociere pozitivă semnificativă statistică între BPA și TSH, însă aceasta nu este valabilă și pentru BPF sau ClxBPA și TSH. Totuși, corelația între expunerea la BPA și modificările valorilor serice ale TSH nu au fost stabilite cu exactitate și necesită cercetări suplimentare pe loturi mai mari de pacienți. Posibilitatea existenței unei asocieri între BPA și dereglările funcției

tioridene, mai exact apariția hipotiroidismului, prin valori scăzute ale FT4 sau crescute ale TSH ar putea avea un impact major în politica de sănătate publică.

Studiul 3

Evaluarea riscului cardiovascular la pacienții cu cancer tiroidian tratați radical

În studiul de față s-a pornit de la ipoteza că urmărirea acestei malignități, presupune inducerea iatrogenă a hipotiroidismului pe o perioadă de aproximativ 2 luni pe an, timp de foarte mulți ani, frecvent zeci de ani. Expunerea la hipotiroidism o perioadă atât de îndelungată conduce la apariția efectelor secundare, apariția modificărilor metabolismului lipidic și obezitatea. Ambele efecte produse reprezintă un factor de risc pentru boala cardiovasculară, aterogenetică. Astfel, pacienții cu cancer tiroidian ar putea dezvolta un risc crescut pentru boala cardiovasculară

Studiul a fost desfășurat în Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca, România, centru terțiar de referință, iar pacienții care au fost recrutați în protocolul de cercetare au fost selectați din secția de Medicină Nucleară a Institutului. După semnarea consimțământului informat și acceptul pacienților de a participa la studiu, am selectat un număr 35 de femei și 17 bărbați cu vârsta medie +/- SD de $45,6 \pm 14$ ani 52 cu diagnosticul de cancer tiroidian diferențiat, la care ulterior s-a aplicat tratamentul radical prin tiroidectomie totală sau aproape totală, cu sau fără limfadenectomie, urmată de ablația țesutului restant cu iod radioactiv (I-131) și terapie substitutivă cu hormoni tiroidieni în doze variabil supresive de 2-2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ corp, pe viață cu obiectivul de a menține valoarea TSH < 0,1mUI/L.

După efectuarea tratamentului radical, la 6 săptămâni de la ablația cu radioiod, toți pacienții au efectuat un control post-terapeutic, în cadrul căruia au fost examinați clinic, s-au evaluat valorile TSH și FT4, sub tratamentul cu LT4, în vederea stabilirii dozei supresive a TSH-ului.

Monitorizarea bolii a presupus efectuarea controalelor oncologice, primul control fiind realizat la 6 luni de la tratamentul curativ. Tratamentului hormonal a fost întrerupt 2 săptămâni înaintea consultului oncologic. Am dozat valoarea TSH-ului sanguin înainte de întreruperea LT4. În cadrul primului control s-a efectuat examenul clinic, s-a realizat o ecografie tiroidiană și s-au dozat valorile sanguine ale TSH, ale Tg și ale Anti-Tg.

În cadrul consultațiilor oncologice s-au efectuat investigații de laborator care au constat din evaluarea valorii următorilor parametri: TSH, Tg, Anti-Tg, hsCRP, colesterolul total, LDL - Colesterol, very low density lipoprotein (VLDL) – Colesterol, high density lipoprotein (HDL) – Colesterol, trigliceride.

Concluziile ce reies din studiul desfășurat susțin faptul că există pacienți care au dezvoltat un risc cardiovascular în urma intervențiilor de tratament și urmărirea a CTD. Concluzionăm din analizele multivariate că femeile sunt de 3 ori mai predispuse de a dezvolta un risc cardiovascular în urma pauzelor terapeutice din protocolul de urmărire a CTD decât bărbații, rezultat confirmat de încadrarea semnificativă statistic în intervalul de încredere de 95%. Din cauza trecerii bruște a pacienților studiați de la un status de eutiroidie la un status de hipotiroidism, rezultatele obținute nu sunt surprinzătoare, însă în contextul

lipsei datelor de această natură în literatura de specialitate, acestea sunt extrem de valoroase. Astfel, întreruperea tratamentului hormonal la pacienții cu CTD tratați radical este în general asociată cu o creștere semnificativă statistică a valorii hsCRP, biomarker al inflamației corelat cu apariția riscului de boală cardiovasculară. Valori crescute semnificativ statistic ale acestui marker inflamator sunt observate în special în populația de sex feminin cu CTD tratat radical. Existența unui număr crescut de întreruperi ale tratamentului hormonal, care fac parte din protocolul de urmărire al pacienților cu CTD este asociat cu o creștere statistic semnificativă a valorii hsCRP. Creșterea hsCRP după o singură întrerupere a tratamentului hormonal poate reprezenta un criteriu de selecție a pacienților cu CTD care necesită o abordare conservativă a procedurii de urmărire a bolii, prin administrarea de rhTSH.

Concluzii generale

Cancerul tiroidian a cunoscut o creștere importantă a incidenței la nivel mondial, inclusiv în IOCN, fapt demonstrat și de prezentul studiu. În IOCN numărul anual de cazuri noi a crescut dramatic în ultimii ani, astfel în 2012 s-au înregistrat 553 cazuri noi, comparativ cu 2 cazuri în 1970, iar în 2015 s-au înregistrat un număr de 745 de noi cazuri, această creștere fiind în special datorată microcarcinoamelor.

Studiile efectuate au condus la demonstrarea creșterii incidenței cancerului tiroidian și la copii, unde este relevată o triplare a numărului de cancere tiroidiene la 10-15 ani post-Chernobyl, urmată de un interval de stagnare a acestei creșteri.

În urma rezultatelor studiului din cadrul cooperării bilaterale România-Cipru, s-a concluzionat că incidența cancerului tiroidian în populația de sex feminin din Cipru a fost superioară față de cea din România.

Am observat că valoarea medie a IMC în populația de sex feminin din România, care suferă de gușă nodulară, este mai mare decât la populația de sex feminin cu formațiuni nodulare tiroidiene din Cipru. Această observație este importantă pentru a lua în considerare un posibil tratament personalizat, pentru pacientele cu IMC crescut din populația României, acestea având un factor de risc pentru boala cardiovasculară. Funcția tiroidiană la pacientele cu noduli tiroidieni din Cipru a fost mai scăzută, față de pacientele din România. Peste 50% din populația feminină atât din Cipru, cât și din România, a prezentat noduli tiroidieni cu localizare multiplă, în ambii lobi tiroidieni. Această concluzie este deosebită relevantă pentru posibilitatea dezvoltării ulterioare din acești noduli, ai unor cancere tiroidiene multiloculare, care ar putea schimba complet evaluarea bolii oncologice și abordul terapeutic.

În studiul efectuat în cadrul acestei teze, privind disruptorii endocrieni, am observat că la 100% dintre pacientele examinate, toți derivații BPA au fost detectați în urină, la o valoare mai mare decât limita de cuantificare (LOQ). Mediana valorilor urinare ale BPA a fost aproximativ de două ori mai mare în România comparativ cu Cipru. Valorile urinare ale BPF au fost mai crescute atât în populația din România, cât și din Cipru, comparativ cu valorile citate în literatură. Am constatat o asociere pozitivă semnificativă statistică între BPA și TSH, însă aceasta nu a fost valabilă și pentru BPF sau ClxBPA și TSH.

Din studiul efectuat pe lotul de pacienți din IOCN întreruperea tratamentului hormonal la pacienții cu CTD tratați radical este în general, asociată cu o creștere importantă, semnificativ statistică a valorii hsCRP, biomarker al inflamației corelat cu apariția riscului de boală cardiovasculară. Valori crescute semnificativ statistic ale acestui marker inflamator sunt observate în special în populația de sex feminin cu CTD tratat radical.

Existența unui număr crescut de întreruperi ale tratamentului hormonal, care fac parte din protocolul de urmărire al pacienților cu CTD, este asociat cu o creștere statistic semnificativă a valorii hsCRP

Creșterea hsCRP, după o singură întrerupere a tratamentului hormonal, poate reprezenta un criteriu de selecție al pacienților cu CTD, care necesită o abordare personalizată a urmăririi bolii, prin controale ajustate sau prin stimularea TSH prin administrarea de rhTSH.

PHD THESIS

Studies and researches regarding
risk factors for nodular goitre and
thyroid cancer

PhD Student **Andra Piciu**

PhD Coordinator Prof. Dr. **Alexandru Irimie**

Studies and researches regarding risk factors for nodular goitre and thyroid cancer

PhD Student: Andra Piciu

PhD Coordinator: Prof. Dr. Alexandru Irimie

Index

General part	2
Study 1 – Epidemiological and statistical study of nodular goitre and thyroid cancer in the “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Institute of Oncology Cluj-Napoca and the “Archbishop Makarios III” University Hospital in Cyprus	4
Study 2 – Study of the relationship between the exposure to Bisphenol A and its chlorinated derivates and the thyroid function	5
Study 3 – Evaluation of the cardiovascular risk in thyroid cancer patients who underwent radical treatment	7
General conclusions	8

Key words

- Thyroid cancer
- Nodular goitre
- Endocrine disruptors
- Bisphenol A
- Bisphenol F
- Chlorinated derivates of the bisphenol A
- Cardiovascular risk
- Highly sensitive C reactive protein

General part

The nodular goitre represents the enlargement of the thyroid gland due to the development of nodules, the most frequent cause of thyroid gland volume augmentation. The endemic form of the nodular goitre appears in the geographical regions where there is a iodine deficiency in the soil and in the alimentation, mostly in the water. Romania's endemic region for the nodular goitre is the region of the Apuseni Mountains.

Thyroid cancer is the most frequent endocrine tumour. Although it is considered to be a rare cancer, with an incidence of maximum 6 cases in 100 000 inhabitants, its incidence is continuously increasing.

About 5% of women and 1% of men having a normal range of the thyroid function, living in non-endemic regions (where there is no lack of iodine in the soil and in the alimentation) were found with neck thyroid nodules in the clinical examination. Among the thyroid nodules identified in the general population, 5-15% can be represented by thyroid cancer, in correlation with personal and familiar history and with the exposure to toxics. Comparing to the benign tumours of the thyroid gland, thyroid cancer differentiates itself by the capacity of the tumour to invade the surrounding tissues and to give metastases. From 2004, the World Health Organisation differentiated thyroid cancer by its histology in differentiated thyroid cancer, medullary thyroid cancer and anaplastic thyroid cancer. From the total of thyroid cancers, more than 80% is represented by the differentiated thyroid cancer, 5-10% is represented by the anaplastic form and another 5-10% by the medullary form.

The most frequent causes of nodular goitre and thyroid cancer are quoted to be the chronic stimulation of the thyroid stimulating hormone (TSH), ionising radiations, environmental factors, immunologic factors (in association with the autoimmune thyroiditis) and genetic factors.

The endocrine disruptors are artificial chemicals, which in certain doses are able to interfere with the hormonal axis of the organism and to induce negative effects on its development, on the reproduction and on the immune and neurological systems. The most frequent endocrine disruptor in the environment is Biphenol A (BPA). BPA is a synthetic monomer from the group of the diphenylmethane and bisphenols derivatives group used in the production of polycarbonate (PC) and of epoxy resins, inodorous, colourless, solid and soluble in organic solvents, but very little soluble in water. Releasing BPA from plastic materials and integrating it in the human body is possible only when the polycarbonate suffers temperature modifications.

In the absence of any autoimmune thyroid pathology, identifying BPA in human urine is associated with alterations of the levels of TSH and of the Free Thyroxin (FT4), either inducing a hyperfunction, or a hypofunction. This possible interference of the BPA with the thyroid function may lead to the development of thyroid nodules, indicating the fact that the ambiental endocrine disrupting chemicals may represent a risk factor for this pathology.

The first step in the diagnosis of the thyroid nodular disease is taking a very detailed history of the patient regarding the exposure to the risk factors for

the nodular goitre or thyroid cancer and regarding any family history for this disease in the context of a familial segregation. Furthermore, the clinical examination of the cervical region must be performed, followed by the paraclinical examination, which will lead to the final diagnosis. The thyroid function is determined using serological examination from the venous sample, consisting in the examination of the TSH, with normal range of 0,27 - 4 mUI/L and of the Free T4 (FT4) with normal range of 12-22 pmol/L, Free T3 (FT3) with normal range of 4-6,8 pmol/L and of the Antithyroidperoxydase Antibodies (Anti-TPO) normal range <34 UI/mL and Anti-thyroglobuline antibodies (anti-Tg) normal range <115 UI/mL. As a serological examination there are also two markers used in the clinical practice, the Thyroglobuline (Tg), marker for the differentiated thyroid cancer and the calcitonin, for the medullary thyroid carcinoma, with a normal range <13 pmol/mL. The next sequence of diagnosis consists in visualising the thyroid gland and the possible thyroid nodules present at this level. The ultrasound of the gland permits the examiner to visualize and describe the lymph nodes in the cervical region. In case of a thyroid nodule identified by ultrasonography, solid, hypoechogenic, bigger than 1cm, a fine needle aspiration (FNAB) is required. This examination permits a histological description of the nodule, with a sensibility of 83% and 100% sensitivity. Adding the immunohistochemical markers (RAS, RET/PTC, BRAF) to the pathology examination of the biopsy will increase the accuracy of the diagnosis.

The treatment of the differentiated thyroid carcinoma is multidisciplinary and is made according to the stage of the disease. The staging, made according to the age of the patient permits a very effective therapy with the least aggressivity. The first intention procedure in the treatment of thyroid cancer is the surgical removal either of the entire gland, by thyroidectomy or of only a lobe, by lobectomy. Radioiodine therapy is the procedure used for the irradiation of the remnant iodine avid tissue using I-131, administered per os. The substitutive hormone therapy for the thyroid function is an essential step in the treatment of the pathology. TSH suppressing doses (<0,1mUI/L) of Levotiroxine (LT4), between 2-2,5 µg/kg body, will be administered, avoiding thus the stimulation of a possible remnant malignant tissue.

The follow-up of the differentiated thyroid cancer patient needs to be performed during the entire life. Therefore, the oncological examination is made every 6-12 months and consists of the serological determination of the value of the Tg, the anti-Tg, the TSH and a thyroid ultrasound. The oncological status is evaluated by detecting any thyroid tissues remnants by the value of the Tg, after stimulating the TSH. TSH stimulation can be made either by suppressing the hormone therapy for 2-4 weeks or by administering recombinant TSH (rhTSH), two days consecutively in an intramuscular injection of 0,9 ml. An efficient TSH stimulation is made when the hormone reaches values of at least 40mUI/L or an increase of 100 times the value identified under hormonal treatment. At these levels of the TSH, the sensibility of the Tg is much higher.

In the case of the differentiated thyroid cancer, which survival overpasses 90% in 20 years, the follow-up consists in inducing a hypothyroidism period. In consequence, these patients may experience metabolic unbalances of various intensities, most frequently of the lipid metabolism, induced by the repetitive cut-offs of the substitute hormone therapy. It is shown that the differentiated thyroid cancer patients are more likely to develop cardiovascular disease

comparing to the general population, due to the hypercholesterolemia, increase of the LDL-Cholesterol, decrease of its hepatic clearance, decrease of the lipoprotein lipase activity, increase of the triglycerides and obesity induced by the hypothyroidism.

Cardiovascular disease consists in a variety of diseases with a high impact on the heart, such as the arrhythmias, the congenital defects, the cardiac infections, but also the vascular defects, like atherosclerosis and hypertension. The risk of developing a cardiovascular disease is calculated using the prognosis score based on the individual cardiovascular risks.

The association between the inflammatory processes of the atherogenesis with the development of an acute cardiovascular event can be investigated by analysing the biochemical marker, the highly sensitive C reactive protein (hsCRP). According to the value of the hsCRP, the patients are separated in three categories of cardiovascular risk: low cardiovascular risk when hsCRP is $<1\text{mg/L}$, intermediate cardiovascular risk, at a hsCRP level between $1\text{-}3\text{ mg/L}$ and high cardiovascular risk, when hsCRP is $>3\text{ mg/L}$, but $<10\text{mg/L}$. In case the value of the hsCRP is higher than 10mg/L a possible source of infection or inflammation must be searched, since it may interfere with the predictive value of the hsCRP.

Study 1

Epidemiological and statistical study of the nodular goitre and thyroid cancer in the “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Institute of Oncology Cluj-Napoca and the “Archbishop Makarios III” University Hospital from Cyprus

This study of the two populations from Cyprus and Romania regarding thyroid cancer, thyroiditis and thyroid nodules is based on the observation made on the extreme difference of incidence reported by the International Agency of Cancer Research in 2012 between the female population in the two geographical areas. The estimated incidence for thyroid cancer is of 16,7 in 100 000 females in Cyprus compared to 5,3 in 100 000 females in Romania. This pathology is on the 3rd position in Cyprus, whereas in Romania is on the 12th.

The present study has been focusing on establishing the exact common risk factors for thyroid disease in Cyprus and in Romania and identifying other new influential elements related to the alimentary habits or to the daily routine.

At the end of the recruiting process the two research teams managed to create a database composed of two cohorts, one including the cases, meaning the patients with thyroid nodular pathology and the other comprising the control group, the females with no disease. Thus, in Romania there were 51 cases and 41 controls recruited and in Cyprus 57 cases and 65 controls. The database was statistically analysed after it has been completed with all the studied parameters.

The results of the study have concluded that the thyroid cancer incidence in the female population in Cyprus is higher than the female population in Romania.

We have observed that the female population in Romania suffering of thyroid goitre has a higher body mass index comparing to the homologous population in Cyprus. This observation becomes relevant when selecting the

patients who will need a personalised treatment of the thyroid cancer because of their superior cardiovascular risk.

From the analysis of the thyroid hormones, we have concluded that the thyroid function at the female patients with thyroid nodules identified by ultrasound has been lower in the Cyprus cohort compared to the Romanian one.

A fact with a very important clinical relevance is that over 50% of the female population recruited both in Cyprus and in Romania presented multifocal thyroid nodules, in both lobes of the gland. The clinical effect of this observation is that these nodules may represent the base of the development of a multilocular thyroid cancer, fact that may change the evolution and the therapeutical protocol of the disease.

Lacking any specific conclusions and scientific proofs regarding the risk factors from the environment which may lead to a higher incidence of the thyroid cancer in Cyprus compared to Romania, more researches are required in this direction. Such an environmental element might be an endocrine disrupting chemical, Bisphenol A, whose interference with the thyroid hormone axis is already known and might lead to the development of thyroid nodules and by chronic exposure even to their malignant transformation.

Study 2

Study of the relation between the Bisphenol A exposure and its chlorinated derivates and the thyroid function

The current study is a pilot bicentric case-control study, by which we have investigated the association between the urinary levels of the BPA, BPF and the chlorinated derivate of the BPA, ClxBPA and the development of thyroid nodules and the changes of thyroid hormone levels, the TSH and the FT4 in the adult female population in Cyprus and Romania.

212 women have been enrolled in the study, 122 from Cyprus and 90 from Romania. Half of them (106) have been controls and the other 106 have been cases, meaning they had thyroid nodules detected by ultrasound. After the statistical analysis of the data collected from both populations, we have observed that the female control group was younger than the female case group, with a mean age of 42 years old compared to 52 years old, and the BMI of this group was lower than cases group, with a mean value of 25 kg/m² compared to 27 kg/m².

We have observed that the exposure to BPA was associated with changes of the TSH values in the female population recruited in both sites of the study. Thus, a positive statistically significant correlation was observed between the urinary BPA value and the serological TSH value. This correlation maintained even after the data was statistically interpreted by the possible cofactors, such as the ioduria, thyroid tumour status, BMI or age. No correlation between the exposure to BPF or ClxBPA and the TSH value was observed.

Both in Romania and in Cyprus the high values of the urinary BPA might be caused by certain alimentary habits or by an exposure to a BPA source. After we have adjusted the results by the creatinine levels, by the study site, disease status and BMI, we have observed that a daily use of water from 20L bottles and the frequent use of personal care products represent a predictive variable for the urinary BPA levels. Therefore, after reinterpreting the BPA values obtained, we

have concluded that the frequent use of personal care products and the daily use of water from the 20L bottles represent significant predictive values for the level of urinary BPA only in the case female group.

We did not observe any association between the exposure to BPA compounds and the incidence of the thyroid nodules, but there is no study available in the literature that refers to such an association. Surprisingly, we have seen that the females with thyroid nodules had urinary BPA levels lower than the healthy females included in the study, fact that was valid for the population in both the locations of the study. Still, the statistical analysis of the odds ratio per logarithmical unit for the high values of the BPA did not reach the statistical significance.

Generally, in this study, the exposure to BPA was higher than the values presented in the literature. The median of the BPA values from the recruited population, both in Cyprus and Romania was 1,5 μ g/L (2,1 μ g/g) respectively 3,8 μ g/L (4,7 μ g/g). In a previous study made in Cyprus on a 244 adult population the BPA values from the urine have corresponds to the ones in our study, 2,1 μ g/g. The urine collected in Romania, was analysed in the laboratory from Limassol and the median values obtained were higher than the ones reported in other countries.

The median of the urinary levels of the BPA was about two times higher in Romania compared to Cyprus. BPF urinary levels were higher in both Cyprus and Romania, compared to the levels cited in the literature. We have observed a statistically significant correlation between the BPA and the TSH, correlation not valid for the BPF or ClxBPA and the TSH. Still the correlation between the BPA exposure and the changes of the serological values of the BPA are not established with accuracy and future researches are needed on bigger patient lots. A possible association between the BPA and thyroid function interference, more precisely the development of the hypothyroidism by high levels of the TSH and low levels of the FT4 might have a major impact over the public health policy.

Study 3

Cardiovascular risk evaluation in radically treated thyroid cancer patients

This study started from the follow-up protocol of the thyroid malignancy, which consists in inducing a iatrogenic hypothyroidism for an approximate period of 2 months per year, for tens of years. Inducing such a long period of hypothyroidism leads to the development of secondary effects, mostly metabolism changes and obesity. Both these effects represent a risk factor for the iatrogenic cardiovascular disease. Thus, thyroid cancer patients might develop an increased risk of cardiovascular disease.

The study took place in the „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Institute of Oncology, Cluj-Napoca, Romania and the patients recruited in the research protocol have been selected from the Department of Nuclear Medicine of the Institute. After signing the informed consent and having the acceptance of the patient to be enrolled in the study, we have selected 35 females and 17 males with the mean age of +/- SD 45,6 \pm 14 years old. All 52 patients were diagnosed with differentiated thyroid carcinoma, for which the radical treatment has been applied, by total thyroidectomy or almost total, with or without

lymphadenectomy, followed by the radioiodine therapy with I-131 for the remnant thyroid tissue and substitutive thyroid hormone treatment using suppressive doses of 2-2,5 µg/kg reaching a value of the TSH < 0,1mUI/L

6 weeks after the radical treatment and the radioiodine ablation, all patients underwent a post-therapy control, during which they were clinically examined, the TSH and FT4 values under LT4 treatment were investigated.

The follow-up of the disease consisted in oncology check-ups, first at 6 months after the curative treatment. 2 weeks prior to the presentation the thyroid hormone therapy was interrupted. The TSH value was evaluated before this interruption. During this first consultation the clinical examination and a thyroid ultrasound was performed and the serological values of the TSH, Tg and Anti-Tg were investigated. Other laboratory parameters investigated were: hsCRP, total cholesterol, LDL - Cholesterol, VLDL - Cholesterol, HDL - Cholesterol, triglycerides.

After interpreting the results obtained, we have observed that some patients have developed cardiovascular risk after the DTC treatment and follow-up protocol. From the multivariate analysis we conclude that the females are 3 times more at risk to develop a cardiovascular event after multiple therapeutical pauses according to the DTC follow-up protocol comparing to males, confirmed by the presence of the statistical value in the 95% CI. Due to the passage from a euthyroid state to a hypothyroid state in a very short time, the results we have obtained are surprising, but because of a lack in the literature of any data they are very valuable. Thus, the interruption of the thyroid hormone therapy is statistically significant associated with an increase of the serological value of the hsCRP, inflammatory biomarker correlated with the apparition of the cardiovascular disease risk. Increased hsCRP values have been observed in the female population with DTC radically treated. A higher number of hormone interruptions is statistically significant correlated with an increase of the value of the hsCRP. The increase of the value of the hsCRP after a single thyroid hormone interruption might represent a criterion for selecting the DTC patients that will benefit of a conservative approach of the follow-up of the disease, by administering rhTSH.

General conclusions

Thyroid cancer incidence experienced an important increase of the global incidence, including the IOCN, fact that has been proved in the present thesis. In the IOCN the annual number of new cases has dramatically increased from 2 new cases per year in 1970 to 745 in 2015, mostly because of microcarcinomas.

The studies performed proved that thyroid cancer in children has increased three times 10-15 years after the Chernobyl nuclear explosion, followed by a stagnation in the following years.

The results of the bilateral Cyprus-Romania cooperation concluded that the thyroid cancer incidence in the Cyprus female population is higher compared to the Romanian population.

The mean value of the BMI in the Romanian female population diagnosed with thyroid nodules is higher than the same female group from Cyprus. The importance of this observation consists in the fact that these women might

benefit of a personalized treatment and follow-up protocol in order to prevent the exposure to an even higher cardiovascular risk. The thyroid function of female patients with thyroid nodules from Cyprus was lower than of their Romanian homologues. Over 50% of the female population in Cyprus and Romania had multiloculated thyroid nodules, indicating that a possible malignant transformation of these nodules will determine a multilocular thyroid cancer, which will need a completely different approach of the treatment and of the follow-up.

Regarding the endocrine disrupting chemicals, this study revealed that in 100% of the examined patients, all the BPA derivatives were found in their urine samples at a higher value than the LOQ. The median of the urinary values of the BPA was about two times higher in the Romanian population compared to the Cypriot population. The BPF urinary values were higher in both the Romanian and the Cypriot population compared to the data quoted in the literature. We have noticed that there was a statistically significant positive association between the BPA and the TSH values, but this association was not valid for the BPF or the ClxBPA and the TSH.

The results obtained from the study made on the patients recruited from the IOCN, the thyroid hormone withdrawal at DTC patients radically treated is associated with an important, statistically significant increase of the hsCRP value, inflammation biomarker correlated with the risk of a cardiovascular disease. Statistically significant increased values of the inflammatory marker have been observed especially in the female DTC population radically treated.

The higher the number of thyroid hormone withdrawal, part of the DTC follow-up protocol, the higher the value of the hsCRP.

The increase of the hsCRP after a thyroid hormone withdrawal might represent a selection criteria for the patients with DTC that will need a personalized approach of the oncology consultations, by administering rhTSH instead of the hormone withholdings.