

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

***METODE DE MONITORIZARE ÎN MANAGEMENTUL  
PACIENȚILOR CU CANCER MEDULAR TIROIDIAN***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. CORIN BADIU**

**Student-doctorand:**

**MARA BĂETU**

## Cuvânt înainte

Cu prilejul finalizării studiilor doctorale, doresc să mulțumesc în mod special coordonatorului meu științific, domnului Acad. Prof. Univ. Dr. Corin Badiu, Șef Secție “Patologie tiroidiană de corelație” din cadrul Institutului Național de Endocrinologie “C.I. Parhon”, pentru formarea mea profesională, pentru oportunitatea de a efectua această cercetare și pentru permanenta sa îndrumare.

În continuare, doresc să îmi exprim recunoștința față de doamna Dr. Cristina Corneci și domnul Dr. Gabriel Moldoveanu din Secția de Anestezie și Terapie Intensivă pentru sprijinul deosebit acordat în realizarea acestei cercetări.

De asemenea, mulțumesc Secției de Chirurgie, Laboratorului de Anatomie Patologică, Laboratorului de Cercetare Științifică și tuturor colegilor medici și asistenți medicali colaboratori pentru ajutorul oferit și pentru colaborarea pe care am avut-o de-a lungul studiilor doctorale.

Îi mulțumesc în mod deosebit lui Alexandru Drăghici pentru tot sprijinul necondiționat acordat în toți acești ani și pentru dezvoltarea aplicației software bazată pe Machine Learning.

Doresc să îi mulțumesc în mod special familiei mele, care mi-a dat încredere și m-a sprijinit necondiționat de-a lungul întregii vieți. Vă prețuiesc!

Închei cu speranța că această teză de doctorat va constitui un punct de reper și va aduce o contribuție în depistarea precoce a carcinomului medular tiroidian și ameliorarea prognosticului acestuia.

## CUPRINSUL TEZEI

Listă lucrări științifice publicate.....	4
Listă de abrevieri și simboluri.....	7
Introducere.....	11
<b>I. PARTEA GENERALĂ.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Carcinomul medular tiroidian – Epidemiologie și oncogenetică.....</b>	<b>17</b>
1.1 Epidemiologie.....	17
1.2 Oncogenetică.....	23
<b>2. Carcinomul medular tiroidian - Diagnostic pozitiv și diferențial.....</b>	<b>24</b>
2.1 Diagnostic biochimic.....	24
2.2 Diagnostic citologic, histopatologic, imunohistochimic și stadializare.....	27
2.2.1 Diagnostic citologic.....	27
2.2.2 Diagnostic histopatologic.....	28
2.2.3 Diagnostic imunohistochimic.....	31
2.2.4 Stadializare.....	33
2.3 Diagnostic imagistic.....	35
2.4 Evaluarea genetică.....	37
<b>3. Carcinomul medular tiroidian – Prognostic, tratament și monitorizare.....</b>	<b>38</b>
3.1 Prognostic.....	38
3.2 Tratament.....	40
3.2.1 Tratament chirurgical.....	40
3.2.2 Chimioterapie – clasică și terapii noi.....	48
3.2.3 Radioterapie.....	63
3.2.4 Substituția cu hormoni tiroidieni.....	68
3.3 Monitorizare.....	73
<b>II. PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE.....</b>	<b>77</b>
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	78
5. Metodologia generală a cercetării.....	79
6. Studiul 1 – Markerii noi de diagnostic, prognostic și monitorizare.....	85
6.1 Markerii serici.....	85
6.2 Markerii genetici.....	86
6.3 Markerii proteomici.....	87

<b>7. Studiul 2 – Teste de stimulare a calcitoninei - Substanțe, protocoale, reacții adverse – review.....</b>	<b>90</b>
7.1 Introducere.....	90
7.2 Obiective.....	91
7.3 Materiale și metode.....	91
7.4 Rezultate.....	93
7.5 Discuții.....	101
7.6 Concluzii.....	106
<b>8. Studiul 3 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie.....</b>	<b>107</b>
8.1 Introducere.....	107
8.2 Obiective.....	108
8.3 Materiale și metode.....	108
8.4 Rezultate.....	111
8.5 Discuții.....	117
8.6 Concluzii.....	121
<b>9. Studiul 4 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie.....</b>	<b>122</b>
9.1 Introducere.....	122
9.2 Obiective.....	123
9.3 Materiale și metode.....	123
9.4 Rezultate.....	126
9.5 Discuții.....	132
9.6 Concluzii.....	134
<b>10. Studiul 5 – Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale.....</b>	<b>135</b>
10.1 Introducere.....	135
10.2 Obiective.....	138
10.3 Materiale și metode.....	138
10.4 Rezultate.....	141
10.5 Discuții.....	144
10.6 Concluzii.....	146
<b>11. Concluzii și contribuții personale.....</b>	<b>147</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>154</b>

<b>Anexe.....</b>	<b>184</b>
<b>Anexa 1 Avizul Comisiei de Etică a Cercetării Științifice.....</b>	<b>184</b>
<b>Anexa 2 Consimțământ informat.....</b>	<b>185</b>
<b>Anexa 3 Manual Cobas E601.....</b>	<b>189</b>
<b>Anexa 4 Manual DiaSorin LiaisonXL.....</b>	<b>193</b>
<b>Anexa 5 Copii ale lucrărilor științifice proprii, dovezi ale participărilor la cursuri și conferințe, diplome și alte distincții.....</b>	<b>202</b>

## Listă lucrări științifice publicate

### A. Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Băetu M**, Dobrescu R. Novel markers for early diagnosis and prognostic classification in medullary thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2017;13:519–522. DOI:10.4183/aeb.2017.519. **(ISI, Factor de impact: 0.411)**.  
<https://acta-endo.ro/Archive/Abstract?doi=2017.519>
2. **Băetu M**, Olariu CA, Moldoveanu G, Corneci C, Badiu C. Calcitonin Stimulation Tests: Rationale, Technical Issues and Side Effects: A Review. *Horm Metab Res*. 2021;53(6):355-363. DOI: 10.1055/a-1487-6449. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34154026. **(ISI, Factor de impact: 2.936)**.  
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1487-6449>
3. **Băetu M**, Drăghici A, Pădure A, Bucur Ș, Caragheorgheopol A, Badiu C. Correction factor between two calcitonin assays: DiaSorin LiaisonXL and Cobas E601. *Rev Romana Med Lab*. 2021;29(3):271-276. DOI: 10.2478/rrlm-2021-0024 **(ISI, Factor de impact: 1.027)**.  
<http://rrml.ro/articole/articol.php?year=2021&vol=3&poz=2>
4. **Băetu M**, Olariu CA, Nițu I, Moldoveanu G, Corneci C, Badiu C. Safety of calcitonin stimulation tests with calcium. *Hormones* 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42000-021-00315-0>. **(ISI, Factor de impact: 2.885)**.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s42000-021-00315-0>
5. **Băetu M**, Olariu CA, Stancu C, Caragheorgheopol A, Ioachim D, Moldoveanu G, Corneci C, Badiu C. Thresholds of basal and calcium stimulated calcitonin for diagnosis of thyroid malignancy. *Horm Metab Res*. 2021 **(ISI, Factor de impact: 2.936)**. **Accepted. Unpublished Yet.**

### B. Cărți

1. Sănătatea femeii și a copilului – Ghid de bună practică medicală, Ed. Curtea Veche, 2019, București. Capitolul 2: Bolile endocrine în sarcină – **Băetu M**.  
Coord: Prof. Dr. Monica Mihaela Cîrstoiu, Prof. Dr. Călin Giurcăneanu, Conf. Maria Magdalena Constantin, Dr. Alin Nicolescu. ISBN 978-606-792-031-4. POCU/91/4/8/109746.

### C. Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale

1. **Băetu M**, Olariu CA, Corneci C, Ioachim D, Caragheorgheopol A, Dobrescu R, Badiu C. Thresholds of basal and calcium stimulated calcitonin for diagnosis of medullary thyroid carcinoma”, poster la 20th European Congress of Endocrinology (ECE 2018), 19-22.05.2018, Barcelona; abstract: Endocrine Abstracts, 2018; 56:509-510. DOI: 10.1530/endoabs.56.P1010.
2. **Băetu M**, Olariu CA, Corneci C, Ioachim D, Caragheorgheopol A, Dobrescu R, Badiu C. „Cut-off-uri ale calcitoninei bazale și stimulate cu calciu pentru diagnosticul carcinomului medular tiroidian”, prezentare orală la Al XXVI-lea Congres Național de Endocrinologie cu participare internațională, 27-30.06.2018, Sibiu; abstract: Acta Endocrinologica, 06.2018; XIV, 64-65.
3. **Băetu M**, Olariu CA, Stancu C, Dobrescu R, Moldoveanu G, Corneci C, Caragheorgheopol A, Ioachim D, Badiu C. Cut-off values for basal and calcium stimulated calcitonin for the diagnosis of precocious medullary thyroid carcinoma”, poster la 21st European Congress of Endocrinology (ECE 2019), 18-21.05.2019, Lyon; abstract: Endocrine Abstracts, 2019; 63:426-427. DOI: 10.1530/endoabs.63.P799.
4. **Băetu M**, Olariu CA, Stancu C, Dobrescu R, Moldoveanu G, Corneci C, Caragheorgheopol A, Ioachim D, Badiu C. “Valori ale calcitoninei stimulate cu calciu pentru diagnosticul precoce al malignității tiroidiene”, prezentare orală la Al XXVII-lea Congres Național de Endocrinologie cu participare internațională, 19-22.06.2019, București; abstract: Acta Endocrinologica, 06.2019; XV, suppl 1, 71-72.
5. **Băetu M**, Olariu CA, Stancu C, Dobrescu R, Moldoveanu G, Corneci C, Caragheorgheopol A, Ioachim D, Badiu C. “Thresholds of calcium stimulated calcitonin for precocious determination of malignancy”, poster la 42<sup>nd</sup> Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA 2019), 7-10.09.2019, Budapesta; abstract: European Thyroid Journal, Vol. 8 (Suppl. 1), 2019; 1-127,101.
6. **Băetu M**, Drăghici A, Pădure A, Caragheorgheopol A, Badiu C. Calcitonina bazală și stimulată: experiență diferită pe analizoarele Liaison și Cobas”, poster la Al XXII-lea Congres Național de Psihoneuroendocrinologie (RPNES), 21-23.11.2019, Timișoara.

7. **Băetu M**, Drăghici A, Pădure A, Caragheorgheopol A, Badiu C. „Basal and stimulated calcitonin: different experience on liaison and cobas assays”, poster la 22nd European Congress of Endocrinology (ECE 2020), 5-9.09.2020, online; abstract: Endocrine Abstracts, 2020; 70:374. DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP925.
8. **Băetu M**, Badiu C. „Medullary thyroid carcinoma: throughout female lifespan”, prezentare orală la 36th Balkan Medical Week, 25-26.09.2020, online; abstract: Book of Abstracts, 2020; 55(1):557.
9. **Băetu M**, Olariu CA, Nițu I, Moldoveanu G, Corneci C, Badiu C. “Side-effects of calcitonin stimulation tests with calcium gluconate”, poster la 23rd European Congress of Endocrinology (ECE 2021), 22-26.05.2021, online; abstract: Endocrine Abstracts, 2021; 73:348. doi: 10.1530/endoabs.73.AEP672.

**Co-autor:**

10. Muresan A, Păun DL, **Băetu M**, Badiu C et al. „Screening for ret gene mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 2a and their relatives”, prezentare orală la „Academician Nicolae Cajal” Symposium of the Romanian Medical Sciences Academy, 22-24.03.2018, București.
11. Păun DL, Muresan A, **Băetu M**, Badiu C et al. “Multiple endocrine neoplasia type 2 - a focus on genetics”, prezentare orală la Al XXVI-lea Congres Național de Endocrinologie cu participare internațională, 27-30.06.2018, Sibiu; abstract: Acta Endocrinologica, 06.2018; XIV,18-19.
12. Dobrescu R, **Băetu M**, Ioachim D, Caragheorgheopol A, Badiu C. „Medullary thyroid carcinoma - a change of paradigm?”, prezentare orală la Al XXVI-lea Congres Național de Endocrinologie cu participare internațională, 27-30.06.2018, Sibiu; abstract: Acta Endocrinologica, 06.2018; XIV, 63-64.
13. Dobrescu R, **Băetu M**, Badiu C et al. “Terapii țintite în cancerul tiroidian diferențiat avansat: eficacitate, calitate a vieții, perspective, prezentare orală la Al XXII-lea Congres Național de Psihoneuroendocrinologie (RPNES), 21-23.11.2019, Timișoara.

## Problema fundamentală

Carcinomul medular tiroidian (CMT) este o formă de cancer tiroidian, distinctă de variantele diferențiate de tumori tiroidiene mai frecvent întâlnite: carcinomul papilar tiroidian (CPT) și carcinomul folicular tiroidian (CFT). CMT este o tumoră neuroendocrină derivată din celulele parafoliculare tiroidiene numite și celule C. Deși acesta reprezintă un procent mic din toate cazurile de cancer tiroidian, cu o frecvență raportată variind de la 1 la 9% în ultimele decenii [1,2], supraviețuirea specifică bolii este semnificativ mai slabă decât în carcinoamele diferențiate [3]. Supraviețuirea globală a pacienților cu CMT este de aproximativ 85% la 5 ani și de aproximativ 65% la 10 ani. Supraviețuirea la 10 ani este de 75-95% la pacienții cu boală locoregională, dar scade mult odată cu afectarea organelor la distanță [4,5]. Supraviețuirea globală pentru CMT asociat cu metastaze la distanță este de doar 26% la 5 ani, respectiv de 14% la 10 ani [4].

Există numeroși factori care pot contribui la riscul de a dezvolta CMT. Aceștia includ: vârsta, sexul, rasa și predispoziția genetică. În plus, vârsta în momentul diagnosticului, caracteristicile clinice asociate și momentul diagnosticului și al intervenției influențează prognosticul pacienților cu CMT.

În timp ce majoritatea pacienților au boli sporadice, aproximativ un sfert dintre pacienții cu CMT nou diagnosticați au o formă moștenită, secundară neoplaziei endocrine multiple (MEN) de tip 2A sau 2B. Faptul că CMT este uneori ereditar are implicații atât pentru pacient, cât și pentru membrii familiei. Activarea mutațiilor proto-oncogenei RET (REarranged during Transfection) inițiază și continuă transformarea oncogenă a celulei C în CMT ereditar [6,7], dar mecanismul specific prin care acest receptor mutant determină transformarea este în mare parte necunoscut. Cert este că o mutație RET a liniei germinale prezice eventuala dezvoltare a CMT, permițând îndepărtarea glandei tiroide în majoritatea cazurilor înainte de apariția metastazelor. Mecanismele independente de RET par să determine majoritatea CMT sporadice. De exemplu, activarea mutațiilor HRAS și KRAS este asociată cu ~15% din CMT sporadice și au existat câteva tumori identificate cu mutații BRAF și rearanjări ale ALK [8,9]. Pentru a determina predispoziția genetică, analiza moleculară a RET nu trebuie efectuată pe țesutul tumoral (RET somatic), ci pe globulele albe din sânge (RET linie germinală). Atât în CMT ereditar, cât și în cel sporadic, există nevoia de a înțelege în continuare mecanismul de acțiune genetic și de a descoperi alți mediatori ai transformării celulelor C și ai progresiei tumorii.

Celulele C parafoliculare secretă în mod normal un peptid numit calcitonină (CT) cu rol în metabolismul fosfo-calcic, rol neelucidat clar încă la om. Însă secreția crescută de CT și a antigenului carcinoembrionar (CEA) din CMT permite ca aceste peptide serice să fie utilizate ca markeri tumorali de diagnostic și prognostic pre- și postoperator, și se corelează cu gradul bolii și al sarcinii tumorale. Acest lucru este în contrast cu CPT și CFT, unde utilizarea tiroglobulinei ca marker al extinderii bolii este mult mai puțin sensibilă și specifică. Măsurarea CT în aspiratul puncției aspirative cu ac fin (FNAB) ca adjuvant la dozarea CT serice poate diferenția pacienții cu CMT de cei cu creșteri fals pozitive ale CT serice, întrucât valorile CT din washout sunt de peste șaptezeci de ori mai mari decât cele serice în CMT [10]. Evaluarea timpilor de dublare a CT serice și a CEA postoperator oferă un instrument valoros pentru evaluarea progresiei și agresivității CMT [11,12]. Nivelurile serice de CT și CEA sunt utile de asemenea pentru a ghida amplexarea intervenției chirurgicale. Din păcate, jumătate dintre pacienți au metastaze ganglionare regionale în momentul prezentării. Mai mult, nivelurile serice preoperatorii scăzute ale CT sunt corelate cu absența metastazelor ganglionare și cu normalizarea nivelurilor postoperatorii ale CT [13]. Având în vedere că diagnosticul precoce și intervenția chirurgicală oferă pacienților cele mai mari șanse de vindecare, screening-ul pentru CMT cu dozarea de rutină a CT serice a fost pus în dezbatere. CMT poate fi diagnosticat precoce ca urmare a screening-ului în cazul sindroamelor ereditare la pacienții cu antecedente familiale sau în timpul screeningului unui nodul tiroidian. Există o asociere clară între detectarea precoce a CMT și prognostic, tumorile mai mici fiind corelate cu o incidență scăzută a metastazelor [14].

Provocările cu privire la implementarea screening-ului de rutină cu dozarea CT serice pentru pacienții cu noduli tiroidieni includ: stabilirea unor valori uniforme de cut-off, cut-off-uri specifice sexului și aplicabilitatea testelor de stimulare. Ghidurile menționează că o CT >100 pg/ml relevă un risc foarte mare de CMT [1]. Cu toate acestea, valorile discret crescute sunt controversate, și s-a demonstrat că administrarea de calciu (Ca) crește sensibilitatea nivelurilor CT [1]. Cu toate acestea, ghidurile actuale ale Asociației Americane de Tiroidă (ATA) pentru CMT nu specifică niciun cut-off pentru CT bazală (bCT) sau cea stimulată (sCT) pentru diagnosticarea CMT sau pentru decizia terapeutică, dar recomandă ca laboratoarele individuale să își stabilească propriile limite de referință [1].

Diagnosticul histopatologic de CMT este extrem de important. Nu numai că prognosticul este diferit, dar considerațiile de management sunt radical diferite de leziunile tiroidiene foliculare. Spectrul morfologic al bolii celulelor C cuprinde hiperplazia de celule

C (HCC), CMT și carcinoamele tiroidiene mixte medular + derivat din epiteliul folicular. Diagnosticul poate fi și ar trebui verificat prin imunohistochimie. Markerii cei mai specifici sunt cromogranina, CT și CEA. Se estimează că până la 15% din cazurile de CMT sunt diagnosticate la examenul anatomopatologic de după rezecția chirurgicală, ceea ce poate duce la omiterea unui diagnostic de feocromocitom și de hiperparatiroidism și a evidențierii riscului de moștenire familială, precum și la o rezecție oncologică inadecvată la unii pacienți [15].

Principalul tratament cu viză curativă al pacienților cu CMT este tiroidectomia totală și disecția ganglionilor limfatici. Nu există o terapie adjuvantă eficientă disponibilă în prezent pentru a vindeca această afecțiune. Pacienții cu o intervenție chirurgicală inițială neadecvată și metastaze ganglionare reziduale ar putea beneficia de o redisecție a ganglionilor limfatici. Având în vedere capacitatea vremurilor actuale de a identifica purtătorii de mutație RET înainte de a dezvolta boala clinic, CMT ereditar a devenit una dintre puținele afecțiuni maligne care pot fi prevenite (prin tiroidectomie profilactică) sau vindecate (prin tiroidectomie timpurie) înainte de a deveni evidentă clinic.

Chimioterapia citotoxică sistemică clasică nu s-a dovedit niciodată eficientă în gestionarea CMT, răspunsurile fiind în general rare și de obicei de scurtă durată [5]. Deoarece CMT nu captează iodul, terapia cu iod radioactiv nu este indicată. CMT exprimă receptori de somatostatină, acest lucru oferind noi abordări diagnostice și potențiale terapii. Din fericire, în ultimele decenii asistăm la o creștere rapidă a înțelegerii evenimentelor moleculare care cauzează transformarea neoplazică în multe malignități [16]. Acest lucru a dus la dezvoltarea unor molecule care întrerup cascadele specifice de semnalizare intracelulară implicate în oncogeneză [17], precum: inhibitori de tirozin-kinază (TKI), inhibitori selectivi RET, inhibitori HRAS, inhibitori mTOR sau imunoterapia. Supraviețuirea generală poate fi extinsă cu oricare dintre medicamentele disponibile în prezent, iar pacienților ar trebui să li se ofere posibilitatea de a explora terapii experimentale din studii clinice care pot oferi rezultate potențial superioare.

Toate aceste caracteristici evidențiază importanța unei conștientizări sporite pentru diagnosticarea precoce și managementul adecvat al CMT. Aceste trăsături biologice unice pot face managementul pacienților cu CMT destul de dificil și necesită expertiza multidisciplinară a endocrinologilor, consilierilor genetici, medicilor oncologi și pediatri, chirurgilor și anatomopatologilor.

Această lucrare abordează aceste probleme prin studierea metodelor de monitorizare în managementul pacienților cu CMT și își propune standardizarea unor astfel de metode pentru populația din România.

Prima parte a acestei teze de doctorat este dedicată prezentării noțiunilor teoretice, necesare pentru înțelegerea CMT în ansamblu și a importanței aprofundării temei alese. Partea specială prezintă studiile efectuate în cadrul cercetării doctorale, cu obiectivele, rezultatele și concluziile specifice.

Rezultatele studiilor din această lucrare vor îmbunătăți metodele de diagnostic a CMT, vor aduce informații importante despre profilul de siguranță a testului de stimulare a CT cu Ca și vor îmbogăți cunoștințele legate de markerii noi aflați în cercetare pentru diagnosticarea precoce și de prognostic în ceea ce privește CMT. Pe termen lung, aceste rezultate vor ajuta la implementarea unui protocol standardizat de diagnostic al CMT pentru populația din România.

## **Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

Prin **Studiul 1 – Markerii noi de diagnostic, prognostic și monitorizare**, ne-am propus realizarea unui review al literaturii în ceea ce privește markerii noi aflați în cercetare pentru diagnosticarea precoce și pentru prognosticul CMT. Acești astfel de markeri sunt foarte importanți pentru ca ratele de supraviețuire să crească, și au fost selectați markeri cu potențial crescut în standardizarea metodelor de monitorizare a CMT [18].

Prin **Studiul 2 – Teste de stimulare a calcitoninei - Substanțe, protocoale, reacții adverse – review**, ne-am propus să scriem o recenzie sistematică a literaturii cu privire la efectele secundare ale testelor de stimulare ale CT utilizate pentru diagnosticarea CMT [19].

Prin **Studiul 3 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie**, ne-am propus să prezentăm propria noastră experiență în ceea ce privește siguranța testelor de stimulare a CT și să raportăm efectele secundare observate în timpul administrării de Ca.

Așa cum ghidurile recomandă, prin **Studiul 4 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie**, ne-am propus să stabilim în laboratoarele noastre cut-off-uri specifice pentru bCT și CT stimulată cu Ca pentru populația feminină din România, cu specificitate și sensibilitate ridicate pentru predicția CMT.

În ultimii ani, cererea de dozare CT a fost pe o tendință ascendentă în Institutul Național de Endocrinologie „C.I. Parhon”. Suntem de acord cu ATA că utilizarea diferitelor teste comerciale pentru determinarea CT poate fi înșelătoare în monitorizarea unui pacient. De aceea, prin **Studiul 5 – Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale** ne-am propus să stabilim factorul de corecție pentru măsurarea CT pe două analizoare de chemiluminescență (CLIA) utilizate frecvent: analizor DiaSorin LiaisonXL (imunochemiluminescență) și analizor Cobas E601 (electro-imunochemiluminescență) [20].

## Metodologia generală a cercetării

**Studiile 1 Markeri noi de diagnostic, prognostic și monitorizare și 2 Teste de stimulare a calcitoninei - Substanțe, protocoale, reacții adverse – review** au fost de tip review. Pentru acestea, o revizuire amănunțită a literaturii a fost făcută pe baza cercetării și a practicilor bazate pe dovezi, folosind PubMed ca motor de căutare. S-au utilizat pentru fiecare în parte cuvinte cheie specifice în engleză pentru căutare. Căutarea a fost efectuată în perioada septembrie - noiembrie 2017 pentru studiul 1, respectiv în perioada februarie - aprilie 2020 pentru studiul 2, și a fost limitată pentru articolele în limba engleză. Nu a fost aplicat niciun filtru pentru data publicării. Au fost evaluate toate tipurile de articole, cum ar fi rapoarte de caz, studii clinice, meta-analize, recenzii, recenzii sistematice.

Procesul de selecție din cadrul studiilor s-a bazat pe lista de verificare a elementelor de raportare preferate pentru recenzii sistematice și meta-analize (PRISMA=Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) din 2009 [21].

În primul rând, am evaluat titlurile și rezumatele articolelor. Articolele irelevante pentru obiectivul studiului și articolele care nu discută rezultatul care prezintă interes pentru această cercetare au fost excluse și au fost selectate lucrările relevante. În al doilea pas, textele lor complete au fost citite și examinate pentru criteriile de includere și excludere, specifice fiecărui studiu.

**Studiile 3 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie și 4 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie** au fost studii analitice prospective longitudinale de cohortă, desfășurate în Institutul Național de Endocrinologie “C.I. Parhon”. **Studiul 5 – Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale** a cuprins un studiu retrospectiv de cohortă, desfășurat de asemenea în cadrul Institutul Național de Endocrinologie “C.I. Parhon”.

Studiile au fost aprobate de Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, nr. 161 / PO-35-F-03 / 14.06.2018 (Anexa 1). Toate procedurile au fost în acord cu declarația de la Helsinki privind principiile etice pentru cercetarea medicală care implică subiecți umani. Consimțământul pacientului a fost obținut prin completarea unui consimțământ informat (Anexa 2).

Pacienții din cele 3 studii au fost înrolați în ceea ce privește atât criteriile de includere, cât și pe cele de excludere specifice fiecărui studiu.

**Studiile 3 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie și 4 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie** au avut drept obiectiv evaluarea profilului de siguranță a testului de stimulare a CT cu Ca, respectiv stabilirea unui cut-off pentru diagnosticul CMT în ceea ce privește bCT și CT stimulată cu Ca. Aceste două studii s-au bazat pe un protocol bine definit.

#### *Protocol test de stimulare a calcitoninei cu calciu*

**a. Pre-test.** Pacienții trebuie să fie informați despre utilitate și posibilele reacții adverse, și vor efectua testul de stimulare doar după completarea unui consimțământ informat. Testul nu trebuie efectuat până nu se face o evaluare clinică și paraclinică a pacientului, cu privire la criteriile de includere și excludere.

#### *Criterii de includere:*

- Pacienți cu istoric de gușă polinodulară sau nodul unic cu valori crescute ale bCT (10-99 pg/ml), pentru a stabili riscul de CMT;
- Pacienți cu CMT operat, cu valori normale sau crescute ale bCT postoperator (10-99 pg/ml), pentru a prezice riscul de recidivă, respectiv agresivitatea/progresia bolii reziduale;
- Pacienți purtători ai mutației RET, cu valori normale sau crescute ale bCT (10-99 pg/ml), pentru a stabili momentul propice pentru tiroidectomie;
- Pacienți cu istoric de gușă polinodulară sau nodul unic cu valori normale ale bCT ce vor suferi intervenția de tiroidectomie pentru alte indicații (conform sistemului Bethesda după FNAB, sau gusa polinodulară voluminoasă sau cu elemente compresive etc) - lotul control pentru stabilirea cut-off-ului bCT și stimulate pentru diagnosticul CMT.

#### *Criterii de excludere*

- Hipercalcemie, hiperfosfatemie, hiper-/hipomagnezemie, hiper-/hipopotasemie;
- Boala cronică de rinichi grad IV-V;
- Hipergastrinemie: gastrita atrofica, gastrinoame;
- Cardiopatii cianogene congenitale, boli cardiace aritmogene, interval QT sau PR prelungit, BAV grad II-III, AV < 40/min sau > 110/min, istoric de infarct miocardic;
- Tumori neuroendocrine, tumori mamare, tumori pulmonare;
- Sindroame mieloproliferative, leucemii;

- Utilizarea prelungită (>2-4 luni) a tratamentului cu medicamente ce pot crește nivelul CT: inhibitori de pompă de protoni, glucocorticoizi, betablocant, analogi GLP1, glucagon;

- Sarcină sau alăptare.

Pentru a stabili dacă pacientul are sau nu criteriile de excludere sunt necesare următoarele în prealabil: ionogramă serică (Ca total, Ca ionic, fosfor, magneziu, potasiu); creatinină serică și uree cu estimarea ratei de filtrare glomerulară utilizând formula MDRD (studiul Modification of Diet in Renal Disease); control cardiologic cu tensiune arterială (TA), alură ventriculară (AV) și electrocardiogramă (ECG) cu 12 derivații.

Se vor monta 2 branule (căi venoase periferice), câte una la nivelul fiecărui antebraț. O branulă va fi pentru recoltarea sângelui în vederea dozării CT și cealaltă pentru administrarea gluconatului de Ca. O probă de CT trebuie recoltată înainte de injectarea Ca.

**b. Test.** Testul trebuie făcut în secția de terapie intensivă, iar Ca trebuie administrat de către medicul anestezist. Protocolul recomandat pentru testul de stimulare a CT constă în administrarea iv (intravenoasă) a 2.47 mg/kgc (kilogram corp) de Ca elementar, calculată în prealabil și ajustată la greutatea ideală a pacientului, pentru a evita supradozajul.

Greutatea ideală se calculează după formula lui Lorentz astfel:

Femei: Greutatea ideală (kg) = Înălțimea (cm) – 100 – [Înălțimea (cm) – 150]/2

Bărbați: Greutatea ideală (kg) = Înălțimea (cm) – 100 – [Înălțimea (cm) – 150]/4

Ca preparat de Ca se folosește gluconatul de Ca soluție injectabilă, deținătorul autorizației de punere pe piață B.Braun Melsungen AG, Carl Braun Strasse 1, 34212 Melsungen, Germania, cu numărul autorizației de punere pe piață 7231/2006/01, cu data primei autorizări sau a reînnoirii autorizației decembrie 2006. Fiecare 10 ml soluție gluconat de Ca conține 93 mg Ca elemental. Cantitatea de gluconat de Ca de administrat în cadrul testului de stimulare se calculează astfel:

Gluconat de calciu de administrat (ml) = Greutatea ideală x 2.47 x 10/93

Timpu total recomandat de injectare este de 3-5 minute, în funcție de toleranța pacientului. Pentru aceasta este obligatoriu un dialog continuu cu pacientul în care acesta descrie senzațiile percepute la administrare. Se vor recolta trei probe de CT la 2, 5 și 10

minute după administrarea de gluconat de Ca. După cum s-a menționat anterior, pacientul trebuie monitorizat cu ECG și TA în timpul testului.

**c. Post-test.** După injectarea lentă de gluconat de Ca, trebuie administrată lent o perfuzie salină de 500 ml (0,9% NaCl), pentru a facilita excreția urinară a Ca. Chiar dacă în principiu evenimentele adverse cardiace se dezvoltă în primele 5 minute de la injectarea Ca, pacientul trebuie monitorizat cu ECG și TA, așa cum s-a menționat anterior, timp de încă 60-180 de minute după terminarea testului, pacientul rămânând în unitatea de terapie intensivă.

Toate cele patru probe de CT recoltate în timpul testului de stimulare cu Ca (înainte și la 2, 5 și 10 minute după administrarea de Ca) trebuie trimise la laborator pentru analiză în timp util, respectând protocolul de prelucrare a probelor de CT. Participarea pacientului este de aproximativ 15 minute, timpul necesar pentru administrarea gluconatului de Ca și recoltarea sângelui, apoi de încă 60-180 minute după terminarea testului pentru monitorizare și perfuzie salină.

În cadrul **Studiilor 2 Teste de stimulare a calcitoninei - Substanțe, protocoale, reacții adverse – review** și **3 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie**, am clasificat efectele secundare raportate după severitate, așa cum a fost definită de Administrația pentru Medicamente și Alimente a Statelor Unite ale Americii (FDA=Food and Drug Administration) prin Codul reglementărilor federale 21 312.32 [22], după cum urmează:

- Eveniment advers (AE) - orice apariție medicală nepotrivită asociată cu utilizarea unui medicament la oameni, indiferent dacă este considerat sau nu legat de medicament;
- Eveniment advers care pune viața în pericol (LTAE) - orice eveniment advers care, în opinia investigatorului, pune pacientul la risc imediat de deces; nu include un eveniment advers care, dacă ar fi avut loc într-o formă mai severă, ar fi putut provoca moartea;
- Eveniment advers grav (SAE) - orice eveniment advers care, din punctul de vedere al investigatorului, duce la oricare dintre următoarele rezultate: deces, un eveniment advers care pune viața în pericol, spitalizarea sau prelungirea spitalizării existente, o incapacitate persistentă sau semnificativă sau întrerupere substanțială a capacității de a desfășura funcții normale de viață, sau a unei anomalii congenitale/malformații congenitale; evenimentele medicale importante care nu pot duce la deces, nu pot pune viața în pericol sau nu necesită spitalizare pot fi considerate grave atunci când, pe baza unei judecăți medicale adecvate,

pot pune în pericol pacientul sau subiectul și pot necesita intervenție medicală sau chirurgicală pentru a preveni unul dintre rezultate enumerate în această definiție [22].

### *Analiza serului*

În cadrul **Studiilor 4 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie** și **5 Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale**, CT a fost măsurată folosind un test de electro-imunochemiluminiscență (Cobas E601) bazat pe principiul sandwich în 2 pași cu anticorpi monoclonali direcționați împotriva CT umane, respectiv de imunochemiluminiscență (DiaSorin LiaisonXL) bazat pe tehnica sandwich într-un singur pas. Aceste metode au fost standardizate conform Standardului Internațional al CT al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS 89/620). Concentrația analitului a fost calculată automat și analizatorul a exprimat rezultatul în pg/ml. Intervalele de referință normale sunt raportate de producător (Anexa 3 Manual Cobas E601 și Anexa 4 Manual DiaSorin LiaisonXL). Ulterior, probele de CT au fost alicotate și depozitate la -20 °C.

### *Analiza histopatologică*

Pentru stabilirea cut-off-urilor din cadrul studiului **4 Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie**, după intervenția chirurgicală de tiroidectomie, probele de țesut au fost încorporate în parafină, iar blocurile au fost prelucrate în secțiuni microscopice subțiri. Lamele au fost analizate de anatomopatologi cu experiență în patologia tiroidiană. Toate rapoartele histopatologice au fost corelate în continuare atât cu valorile bCT, cât și cu cele ale sCT.

### *Analiza statistică*

Analiza statistică a fost efectuată utilizând versiunea 20 IBM SPSS Statistics. Testul Kolmogorov-Smirnov a fost utilizat pentru a stabili distribuția variabilelor. Au fost efectuate teste chi-pătrat de independență pentru a evalua relațiile dintre variabile. Analiza Odds Ratio a fost efectuată pentru a stabili probabilitatea de a dezvolta efecte secundare. Pentru a examina puterea asocierii dintre variabile s-a folosit testul de corelație non-parametric Spearman. S-a aplicat o curbă ROC (Receiver Operator Characteristic) pentru stabilirea cut-off-urilor. Semnificația statistică a fost luată în considerare pentru o valoare  $p < 0.05$ .

În plus, pentru **Studiul 5 – Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale**, am dezvoltat o aplicație informatică bazată pe tehnologia de ultimă oră de Machine Learning (un subdomeniu al Inteligenței Artificiale) și mai specific, pe paradigma Rețelelor Neurale Artificiale (RNA) în forma sa cea mai modernă numită Deep Learning. Într-o descriere foarte scurtă, o RNA este un grafic interconectat de noduri, cu o anumită structură, în care fiecare nod are un comportament simplu care este inspirat de structura și funcția unui neuron biologic. Un nod din RNA (numit și neuron artificial) primește informație de la un anumit set de alte noduri similare și scoate o valoare dacă un prag definit (și reglabil) este depășit de semnalul de intrare combinat [23].

## **Concluzii și contribuții personale**

### **1. Studiul 1 – Markeri noi de diagnostic, prognostic și monitorizare – review**

Acest review indică potențiali markeri pentru un diagnostic precoce al CMT, precum și potențiale ținte pentru agenți terapeutici (vezi Capitolul 6). Studiile recente sunt foarte promițătoare, însă sunt necesare cercetări suplimentare pentru a descoperi markeri și tehnici noi, precum și noi molecule terapeutice, pentru creșterea ratelor de supraviețuire a acestui cancer agresiv.

### **2. Studiul 2 – Teste de stimulare a calcitoninei - Substanțe, protocoale, reacții adverse – review**

Mai multe substanțe au fost folosite de-a lungul timpului pentru stimularea secreției de CT: Pg, Ca, testul combinat cu Pg și Ca, omeprazol, glucagon, TRH, alcool, histamină, lizin-vasopresină, peptone, C8-CCK sau CCK. Diverși autori au raportat potența și eficiența acestor substanțe în stimularea celulelor C parafoliculare, chiar dacă rațiunea din spatele fiecărei substanțe nu este explicită.

Testele de stimulare au fost utilizate și în alte tulburări în afară de CMT. Pg a fost studiată pentru diferite teste ale funcției gastrice [24–26], pentru diagnosticarea sindromului carcinoid [27], pentru diagnosticarea și monitorizarea VIPomului [28] și chiar pentru cercetarea psihofiziologică a anxietății [29]. Testarea cu gluconat de Ca a fost de asemenea luată în considerare pentru diagnosticul sindromului carcinoid [27], în timp ce testul combinat Ca-Pg a fost studiat pentru diagnosticul somatostatinomului [30,31].

Indicația de a efectua teste de stimulare a CT s-a schimbat în ultimii ani. Noile indicații sunt: pentru a ajuta la diferențierea cauzelor tiroidiene ale CT crescute de sursele non-tiroidiene [1,32], pentru a stabili dacă pacienții cu CT bazală ușor crescută ar putea/nu ar putea fi candidați la intervenție chirurgicală [32–34], și pentru a ajuta la indicarea momentului potrivit pentru tiroidectomie profilactică la copiii cu MEN atunci când CT bazală este normală [1,34,35]. Din păcate, testele de stimulare a CT nu au reușit să diferențieze cu exactitate între micro-CMT și HCC [36].

În ceea ce privește testul de stimulare cu Ca, protocoalele au implicat diferite tipuri de Ca (gluconat de Ca, clorură de Ca sau Ca laevulatis), care au fost evaluate după cantitatea de Ca elementar pentru a omogeniza condițiile de testare, cantități diferite de Ca, căi diferite de administrare (iv și oral), cu unele diferențe în ceea ce privește diluarea și timpul de perfuzie. Dintre tipurile de Ca, gluconatul de Ca are cele mai multe studii de

până acum. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cantitățile de Ca elementar injectat sau timpii de perfuzie (vezi Capitolul 7).

În ceea ce privește testul de stimulare cu Pg, protocoalele au implicat aceeași cantitate de Pg (0.5 ug/kgc), aceeași cale de administrare (iv), cu unele diferențe în ceea ce privește diluarea și timpul de perfuzie. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative.

De o mare importanță au fost cele 12 studii care au testat atât Ca și Pg separat la aproximativ același grup de pacienți (9 studii testate în același grup [37–45], în timp ce 3 studii nu au păstrat același număr de pacienți pentru ambele stimulente) [46–48].

Trebuie trasată o diferență clară între efecte secundare și complicațiile severe. Pentru o mai bună încercare de analiză obiectivă, am clasificat efectele secundare raportate de toți autorii în funcție de severitate, așa cum este definită de Codul reglementărilor federale 21 312.32 al FDA [22]. De interes istoric, rezultatele noastre au indicat că reacțiile adverse după testul cu Pg au fost semnificativ mai severe decât cele observate după testul de stimulare cu Ca ( $p < 0.05$ ).

Majoritatea efectelor secundare după administrarea de Ca sunt ușoare și sunt reprezentate în principal de: senzație de căldură, greață, gust alterat și cefalee. SAE precum tahicardie/bradicardie, constricție cervicală/toracică pot apărea cu o frecvență mai mică. În analiza noastră, numai un singur LTAE a fost raportat după testul de stimulare a Ca: asistola [34]. Acest lucru subliniază importanța monitorizării hemodinamice, întotdeauna atât cu TA, cât și cu ECG. Monitorizarea continuă cardiacă în timpul testului trebuie efectuată pentru a garanta intervenția rapidă în cazul apariției unui eveniment cardiovascular advers [34,49].

Majoritatea efectelor secundare după administrarea de Pg sunt ușoare până la moderate și sunt reprezentate în principal de constricție cervicală/toracică și a efectelor secundare gastro-intestinale. În analiza noastră, nu au fost raportate LTAE după testul de stimulare cu Pg. Cu toate acestea, este necesară monitorizarea hemodinamică atât cu TA, cât și cu ECG, deoarece pot apărea aritmii.

Testele de stimulare a CT au o mare valoare, iar autorii actuali ai acestui studiu recomandă efectuarea testului de stimulare a CT cu Ca atunci când este necesar, luând în considerare evaluarea preventivă a unor aspecte clinice, instrumentale și biochimice ale fiecărui pacient. Instrucțiunile precise trebuie urmate înainte de test și, mai departe, monitorizarea cardiacă continuă este esențială în timpul perioadei de testare și post-test pentru a minimiza posibilitatea unui eveniment grav.

### **3. Studiul 3 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: reacții adverse – experiență proprie**

Am prezentat propria noastră experiență cu privire la siguranța testului de stimulare cu Ca. Testul a fost în general bine tolerat. În practica noastră clinică, 167 din 176 pacienți (110 femei, 57 bărbați) au prezentat efecte secundare suprapuse. Nouă pacienți (5 femei, 4 bărbați) nu au avut evenimente adverse (vezi Capitolul 8).

În ceea ce privește diferențele specifice genului, nu a existat nicio diferență semnificativă între bărbați și femei în ceea ce privește dezvoltarea efectelor secundare în general. Însă, în mod interesant, bărbații (11/61, 18.03%) au avut risc mai mare decât femeile (8/115, 6.95%) de a dezvolta efecte adverse cardio-vasculare: bradicardie, tahicardie, extrasistole ventriculare sau atriale, HTA, hipotensiune arterială sau angină pectorală (Pearson Chi Square,  $p=0.024$ ), cu Odds Ratio de 2.94 CI (interval de încredere): 1.11-7.76).

După clasificarea în funcție de severitate a totalului de 17 efecte adverse raportate, conform Codului Reglementărilor Federale 21 312.32 definit de FDA [22] în AE, SAE și LTAE, 8 dintre acestea au fost clasificate ca AE, 8 au fost clasificate ca SAE și doar 1 efect secundar ca LTAE. Din alt punct de vedere, din totalul de 176 de pacienți: 9 pacienți nu au avut deloc efecte adverse așa cum s-a menționat anterior (5.113%), 146 de pacienți au dezvoltat AE (82.95%), 20 de pacienți au prezentat SAE (11.36%) și doar 1 pacient a dezvoltat LTAE (0.568%).

Singurul LTAE raportat a fost o bradicardie severă a unui bărbat de 31 de ani. A durat câteva secunde, a fost rapid reversibilă după atropină și fără a fi nevoie de resuscitare cardiopulmonară. Nu s-au înregistrat alte evenimente ulterioare, TA a fost de 140/80 mmHg și ritmul cardiac de 55 bătăi/minut. Alți zece pacienți au dezvoltat, de asemenea, bradicardie ușoară sau moderată după administrarea de Ca, care s-a remis fie spontan, fie după injectarea de atropină. Patru pacienți au prezentat tahicardie după injectarea de Ca, care s-a remis după administrarea de beta-blocant iv. Doi pacienți au prezentat extrasistole ventriculare rare pe ECG care nu au fost menținute în continuare.

Nu a existat nicio asociere între sexul pacienților, vârsta, greutatea, înălțimea, IMC, bCT sau valoarea maximă a sCT și gradul de severitate (fără efecte adverse, AE, SAE, LTAE) la pacienții testați.

Testul de stimulare cu gluconat de Ca este un test sigur. Trebuie realizată monitorizarea cardiacă continuă în timpul testului pentru a garanta intervenția rapidă în

cazul apariției unui eveniment cardiovascular advers, chiar dacă acestea sunt rare. Este extrem de importantă o evaluare clinică și biochimică pre-test a fiecărui pacient.

#### **4. Studiul 4 – Teste de stimulare a calcitoninei cu gluconat de calciu: cut-off – experiență proprie**

În studiul nostru, bCT a fost cuprinsă între 9.85-98.91 pg/ml în grupul A (grupul cu hipercalcitoninemie bazală), cu o mediană de  $12.56 \pm 21$  pg/ml și între 0.5-9.23 pg/ml în grupul B (grupul control), cu o mediană de  $0.86 \pm 1,96$  pg/ml. Dintre cele 111 explorări studiate, sCT maximă a fost observată la 2 minute după terminarea injectării cu Ca în 88 teste, la 5 minute în 19 teste și la 10 minute în 4 teste. Maximul sCT a fost între 30.6-2812 pg/ml în grupul A, cu o mediană de  $175.85 \pm 407.98$  pg/ml, și între 1.02-167 pg/ml în grupul B, cu o mediană de  $5.82 \pm 37.15$  pg/ml. Nu a existat nicio corelație între valorile bCT sau valorile maxime ale sCT și greutatea, înălțimea, IMC ale pacientului, creatinina, rata de filtrare glomerulară și prezența sau nivelul anticorpilor antitiroidieni (vezi Cap. 9).

Pentru nivelurile bCT cuprinse între 9.82-30 pg/ml, s-a constatat malignitate la 19 din 26 paciente (73.07%): 8 mCMT (CMT <1cm), 3 macroCPT (carcinom tiroidian papilar >1cm) și 8 mCPT (carcinom tiroidian papilar <1cm). Pentru bCT peste 30 pg/ml, malignitatea a fost diagnosticată la 9 din 9 paciente (100%): 7 mCMT și 2 macroCMT (CMT > 1cm). Cel mai mic nivel al sCT corespunzător unui CMT în acest grup a fost de 98.1 pg/ml. Pentru nivelurile sCT cuprinse între 100-300 pg/ml, malignitatea a fost găsită la 8 din 11 paciente (72.73%): 4 mCMT, 3 mCPT și 1 macroCPT. Pentru sCT peste 300 pg/ml, malignitatea a fost diagnosticată la 17 din 21 de paciente (80.95%): 10 mCMT, 2 macroCMT, 3 mCPT și 2 macroCPT.

Cel mai bun cut-off al bCT pentru a distinge pacienții de sex feminin cu CMT sau HCC de alte patologii sau cazuri benigne a fost de: 12.9 pg/ml, cu o sensibilitate de 84.2% și o specificitate de 76.6%, AUC 0.895, CI: 0.816-0.973,  $p < 0.001$ . Cel mai bun cut-off al sCT pentru a distinge pacienții de sex feminin cu CMT sau HCC de alte patologii sau cazuri benigne a fost de: 285.25 pg/ml, cu o sensibilitate de 73.7% și specificitate de 83%, AUC 0.886, CI: 0.804-0.967,  $p < 0.001$ .

Cel mai mic nodul din studiul nostru care s-a dovedit a fi CMT a fost un nodul solid hipoecogen solitar de numai 0.56/0.34/0.44 cm la ecografie, fără alte criterii sonografice suspecte. Pacienta avea 29 de ani, cu o bCT de 29.19 pg/ml care s-a stimulat până la 347.5 pg/ml și s-a dovedit după intervenție chirurgicală că era purtătoare de mutație RET Val804Met. O altă pacientă cu CMT diagnosticat după testul de stimulare a fost

identificată cu mutația genei RET (Val804Leu) și o alta a avut o variantă cu semnificație incertă (Ala639Thr). Ambele au avut noduli care au fost, de asemenea, sub 1 cm la ecografia tiroidiană.

Stabilirea unor cut-off-uri în cadrul testelor de stimulare ar putea fi de asemenea importantă pentru diagnosticarea carcinoamelor tiroidiene diferențiate. În studiul nostru, cut-off-ul bCT rămâne același dacă am dori să distingem pacienții de sex feminin cu CMT, HCC sau macroCPT de alte cazuri, cu o sensibilitate mai mică de 70.4% și o specificitate mai mare de 79.5%, o AUC mai mică 0.79 (CI: 0.674-0.906),  $p < 0.001$ . Cut-off-ul sCT scade la 36.63 pg/ml dacă am dori să distingem pacienții de sex feminin cu CMT, HCC sau macro-CPT, cu o sensibilitate mai mare de 85.2% și o specificitate mai mică de 61.5%, o AUC mai mică 0.772 (CI: 0.651-0.893),  $p < 0.001$ . Faptul că AUC scade sub 0.8 sugerează că acesta ar putea fi un test corect și ar putea avea unele utilizări în diagnosticarea macro-CPT, dar nu foarte fiabil.

De asemenea, variabilitatea testelor trebuie luată în considerare [1,46]. Prin urmare, limitele identificate s-ar putea schimba în funcție de laborator. Mai mult decât atât, pragurile ar putea varia în funcție de populația testată. De aceea, ghidurile actuale recomandă ca laboratoarele individuale să își stabilească propriile limite de referință [1]. Din câte știm, am identificat pentru prima dată pentru persoanele de sex feminin din România că cele mai bune cut-off-uri ale bCT și Ca-sCT capabile să distingă CMT sau HCC de alte cazuri au fost de peste 12.9 pg/ml, respectiv 285.25 pg/ml. Prin urmare, recomandăm o intervenție chirurgicală tiroidiană la toate femeile cu sCT peste 285 pg/ml.

Sunt necesare studii suplimentare pe grupuri mai mari pentru a stabili și confirma cut-off-urile pentru sexul masculin și feminin pentru diagnosticarea precoce a CMT și, în mod interesant, poate și pentru macro-CPT. Administrarea de Ca are efecte secundare minime, dar se recomandă monitorizarea cardiacă continuă. Datele actuale care demonstrează eficiența testului de stimulare cu Ca, împreună cu disponibilitatea și costul redus al Ca, susțin că testul de stimulare a CT cu Ca ar trebui standardizat și aplicat.

## **5. Studiul 5 – Coeficient de corelare a calcitoninei între două analizoare: DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601, și rolul Inteligenței Artificiale**

Este foarte important ca în urmărirea dinamică a unui pacient care suferă de CMT să se determine CT cu aceeași metodă de analiză. În caz contrar, atunci când se utilizează analizoare diferite, este extrem de esențial să se aplice factori de corecție. Din câte știm, acesta este primul studiu din literatură care identifică factorii de corecție pentru

determinarea CT între două teste de chemiluminescență utilizate frecvent: analizorul DiaSorin LiaisonXL (imunochemiluminiscentă) și analizorul Cobas E601 (electroimunochemiluminiscentă) (vezi Capitolul 10).

Cele 89 de probe de CT care au fost analizate inițial pe Cobas E601 au avut valori raportate cuprinse între 0.5 pg/ml și 2812 pg/ml ( $128.5 \pm 513.98$ ). După ce probele de CT au fost analizate pe DiaSorin LiaisonXL, valorile raportate au fost între <1 și 2600 pg/ml. Am găsit un puternic coeficient de corelație Spearman de 0.992 între DiaSorin LiaisonXL și Cobas E601. Între cele două analizoare s-a observat o corelație liniară segmentată. Am identificat următoarea ecuație de regresie liniară generală:  $1.108x + 19.337$  ( $p < 0.05$ ). Când CT pe DiaSorin LiaisonXL crește cu 1 unitate, CT pe Cobas E601 crește cu  $1.108 + 19.337$  unități. Am observat că rata de eroare a crescut la valori ridicate ale CT. Prin urmare, pentru o mai bună precizie am stabilit ecuația de regresie segmentar. O diferență semnificativă statistic ( $p < 0.05$ ), a fost notată pentru valori ale CT între 350-2600 pg/ml ( $n=31$ ) pe DiaSorin LiaisonXL, pentru care ecuația de regresie liniară pentru Cobas E601 devine  $1.009x + 169.796$  ( $p < 0.05$ ).

Propunem următoarea formulă de conversie de la DiaSorin LiaisonXL la Cobas E601:

- pentru conversia valorilor CT pe DiaSorin LiaisonXL  $\geq 350$  pg/ml:

$$\text{Valoarea Cobas E601} = \text{valoarea LiaisonXL} + 170$$

Invers, de la Cobas E601 la DiaSorin LiaisonXL, formula propusă devine:

- pentru conversia valorilor CT pe Cobas E601  $\geq 520$  pg/ml:

$$\text{Valoarea DiaSorin LiaisonXL} = \text{valoarea Cobas} - 170$$

De asemenea, am dezvoltat prima aplicație software bazată pe Machine Learning pentru acești factori de corecție. Într-o eră în care inteligența artificială evoluează, am considerat util pentru practica clinică să dezvoltăm o aplicație software bazată pe învățarea automată (Machine Learning) pentru o mai bună precizie în estimări. Domeniul Inteligenței Artificiale și al Machine Learning-ului are un fundal bogat și diversificat atunci când vine vorba de aplicațiile sale în rezolvarea problemelor din lumea reală și îmbunătățirea experienței vieții de zi cu zi a oamenilor.

Continuarea studiului pe grupuri mai mari de probe proaspete va asigura o precizie crescută a factorilor de corecție și a aplicației software.

## Bibliografie selectivă

- [1] Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2015;25:567–610. doi:10.1089/thy.2014.0335
- [2] Raue F, Frank-Raue K. Epidemiology and clinical presentation of medullary thyroid carcinoma. *Recent Results Cancer Res*. 2015;204:61–90. doi:doi: 10.1007/978-3-319-22542-5\_3.
- [3] Yang L, Shen W, Sakamoto N. Population-based study evaluating and predicting the probability of death resulting from thyroid cancer and other causes among patients with thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:468–474. doi:10.1200/JCO.2012.42.4457
- [4] Roman S, Lin R, Sosa JA. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: Demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer*. 2006;107:2134–2142. doi:10.1002/cncr.22244
- [5] Links TP, Verbeek HHG, Hofstra RMW, et al. Progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: First- And second-line strategies. *Eur J Endocrinol*. 2015;172:R241–R251. doi:10.1530/EJE-14-0726
- [6] Donis-keller H, Dou S, Chi D, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2a and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993;2:851–856. doi:10.1093/hmg/2.7.851
- [7] Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994;367:375–376. doi:10.1038/367375a0
- [8] Ji JH, Oh YL, Hong M, et al. Identification of Driving ALK Fusion Genes and Genomic Landscape of Medullary Thyroid Cancer. *PLoS Genet*. 2015;11(8): e1005467. doi:10.1371/journal.pgen.1005467
- [9] Moura MM, Cavaco BM, Leite V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22:R235–R252. doi:10.1530/ERC-15-0070
- [10] Kudo T, Miyauchi A, Ito Y, et al. Diagnosis of medullary thyroid carcinoma by calcitonin measurement in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Thyroid*. 2007;17:635–638. doi:10.1089/thy.2006.0338
- [11] Barbet J, Champion L, Kraeber-Bodéré F, et al. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6077–6084. doi:10.1210/jc.2005-0044
- [12] Giraudet AL, Al Ghulzan A, Aupérin A, et al. Progression of medullary thyroid carcinoma: Assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:239–246. doi:10.1530/EJE-07-0667
- [13] Yip DT, Hassan M, Pazaitou-Panayiotou K, et al. Preoperative basal calcitonin and tumor stage correlate with postoperative calcitonin normalization in patients undergoing initial surgical management of medullary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2011;150:1168–1177. doi:10.1016/j.surg.2011.09.043
- [14] Machens A, Hinze R, Thomusch O, et al. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World J Surg*. 2002;26(1):22–28. doi:10.1007/s00268-001-0176-3
- [15] Ahmed SR, Ball DW. Incidentally discovered medullary thyroid cancer: Diagnostic strategies and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1237–1245. doi:10.1210/jc.2010-2359
- [16] Gild ML, Tsang VHM, Clifton-Bligh RJ, et al. Multikinase inhibitors in thyroid

- cancer: timing of targeted therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(4):225-234. doi:10.1038/s41574-020-00465-y
- [17] Matrone A, Gambale C, Prete A, et al. Systemic treatment of advanced, metastatic, medullary thyroid carcinoma. *J Cancer Metastasis Treat*. 2021;7:23. doi:10.20517/2394-4722.2021.47
- [18] **Băetu M**, Dobrescu R. Novel markers for early diagnosis and prognostic classification in medullary thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2017;13:519–522. doi:10.4183/aeb.2017.519
- [19] **Băetu M**, Olariu CA, Moldoveanu G, et al. Calcitonin Stimulation Tests: Rationale, Technical Issues and Side Effects: A Review. *Horm Metab Res*. 2021;53(6):355-363. doi:10.1055/a-1487-6449
- [20] **Băetu M**, Draghici A, Padure A, et al. Correction factor between two calcitonin assays : DiaSorin LiaisonXL and Cobas E601. *Rev Romana Med Lab*. 2021;29:271–276. doi:10.2478/rrlm-2021-0024
- [21] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:332–336. doi:10.1136/bmj.b2535
- [22] CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Accessed December 19, 2020. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=312.32>
- [23] Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. Springer; 2013.
- [24] Ewers HR, Brouwers HP, Merguet P, et al. [Side effects after stimulation of gastric secretion with pentagastrin (author’s transl)]. *Med Klin*. 1976;71(1):19-23. PMID: 1250184
- [25] Korkusko OV JD. [The double-pentagastrin test for measuring the gastric secretory capacity in patients of an advanced or great age (author’s transl)]. *Z Alternsforsch*. 1980;35(3):215-219. PMID: 6256983
- [26] Acar O, Schwizer W, Hauri D. Demonstration of acid secretion in the gastric pouch through the pentagastrin stimulation test. *Urol Int*. 2003;70:178–180. doi:10.1159/000068771
- [27] Ahlman H, Dahlström A, Grönstad K, et al. The pentagastrin test in the diagnosis of the carcinoid syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7:S86–S88. doi:10.1097/00005344-198500077-00024
- [28] Brunt LM, Mazoujian G, O’Dorisio TM, et al. Stimulation of vasoactive intestinal peptide and neurotensin secretion by pentagastrin in a patient with VIPoma syndrome. *Surgery*. 1994;115:362–369. PMID: 8128360
- [29] Radu D, Åhlin A, Svanborg P, et al. Pentagastrin test for anxiety - Psychophysiology and personality. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166:139–145. doi:10.1007/s00213-002-1316-7
- [30] Somers G, Pipeleers-Marichal M, Gepts W, et al. A case of duodenal somatostatinoma: diagnostic usefulness of calcium--pentagastrin test. *Gastroenterology*. 1983;85:1192–1198. PMID: 6137434
- [31] Budmiger H, Bühler H, Häcki W, et al. Comparative diagnostic value of the calcium-pentagastrin test versus the tolbutamide test in a patient with a somatostatinoma. *Gastroenterology*. 1987;92:800–804. doi:10.1016/0016-5085(87)90036-9
- [32] Niederle MB, Scheuba C, Riss P, et al. Early Diagnosis of Medullary Thyroid Cancer: Are Calcitonin Stimulation Tests Still Indicated in the Era of Highly Sensitive Calcitonin Immunoassays? *Thyroid*. 2020;30:974–984. doi:10.1089/thy.2019.0785

- [33] Fugazzola L, Di Stefano M, Censi S, et al. Basal and stimulated calcitonin for the diagnosis of medullary thyroid cancer: updated thresholds and safety assessment. *J Endocrinol Invest.* 2020;44:587–597. doi:10.1007/s40618-020-01356-9
- [34] Russo M, Scollo C, Padova G, et al. Cardiac arrest after intravenous calcium administration for calcitonin stimulation test. *Thyroid.* 2014;24:606–607. doi:10.1089/thy.2013.0394
- [35] Niederle B, Sebag F, Brauckhoff M. Timing and extent of thyroid surgery for gene carriers of hereditary C cell disease - A consensus statement of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbeck's Arch Surg.* 2014;399:185–197. doi:10.1007/s00423-013-1139-5
- [36] Niederle MB, Scheuba C, Gessl A, et al. Calcium-stimulated calcitonin - The “new standard” in the diagnosis of thyroid C-cell disease-clinically relevant gender-specific cut-off levels for an “old test”. *Biochem Med.* 2018;28:030710. doi:10.11613/BM.2018.030710
- [37] Ubl P, Gincu T, Keilani M, et al. Comparison of side effects of pentagastrin test and calcium stimulation test in patients with increased basal calcitonin concentration: The gender-specific differences. *Endocrine.* 2014;46:549–553. doi:10.1007/s12020-013-0109-6
- [38] Thiem U, Marculescu R, Cejka D, et al. Low-dose calcium versus pentagastrin for stimulation of calcitonin in chronic hemodialysis patients: A pilot study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:4704–4711. doi:10.1210/jc.2014-1869
- [39] Farndon JR, Lewis KR, Dale JK, et al. Histamine and calcitonin release from medullary thyroid carcinoma. *Cancer.* 1983;51:1221–1225. doi:10.1002/1097-0142(19830401)51:7<1221::AID-CNCR2820510708>3.0.CO;2-1
- [40] Wells SA, Baylin SB, Linehan WM, et al. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg.* 1978;188:139–141. doi:10.1097/00000658-197808000-00002
- [41] Emmertsen K, Nielsen HE, Mosekilde L, et al. Pentagastrin, calcium and whisky stimulated serum calcitonin in medullary carcinoma of the thyroid. *Acta Oncol (Madr).* 1980;19:85–89. doi:10.3109/02841868009130138
- [42] Gharib H, Kao PC, Heath H. Determination of Silica-Purified Plasma Calcitonin for the Detection and Management of Medullary Thyroid Carcinoma: Comparison of Two Provocative Tests. *Mayo Clin Proc.* 1987;62:373–378. doi:10.1016/S0025-6196(12)65441-X
- [43] McLean GW, Rabin D, Moore L, et al. Evaluation of provocative tests in suspected medullary carcinoma of the thyroid: Heterogeneity of calcitonin responses to calcium and pentagastrin. *Metabolism.* 1984;33:790–796. doi:10.1016/0026-0495(84)90104-5
- [44] Hennessy JF, Wells SA, Ontjes DA, et al. A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974;39:487–495. doi:10.1210/jcem-39-3-487
- [45] Graze K, Spiler IJ, Tashjian AH, et al. Natural History of Familial Medullary Thyroid Carcinoma: Effect of a Program for Early Diagnosis. *N Engl J Med.* 1978;299:980–985. doi:10.1056/NEJM197811022991804
- [46] Colombo C, Verga U, Mian C, et al. Comparison of calcium and pentagastrin tests for the diagnosis and follow-up of medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:905–913. doi:10.1210/jc.2011-2033
- [47] Vainas I, Marthopoulos A, Chrisoulidou A, et al. Calcitonin stimulation tests for the early diagnosis and follow-up of patients with C cell disease: A descriptive analysis.

- Hippokratia*. 2013;17:246–251. PMID: 24470736 PMCID: PMC3872462
- [48] Doyle P, Düren C, Nerlich K, et al. Potency and tolerance of calcitonin stimulation with high-dose calcium versus pentagastrin in normal adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:2970–2974. doi:10.1210/jc.2008-2403
- [49] Mian C, Perrino M, Colombo C, et al. Refining calcium test for the diagnosis of medullary thyroid cancer: Cutoffs, procedures, and safety. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:1656–1664. doi:10.1210/jc.2013-4088