

## Rezumatul tezei de doctorat

### Titlul tezei de doctorat:

„Corelații imunologice, histologice și imagistice în microcarcinoame tiroidiene diferențiate”

Doctorand: Liviu Hîțu

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Doina Piciu

### Cuprins:

- A. Stadiul actual al cunoașterii
- B. Contribuția personală

Studiul I: Evaluarea agresivității microcarcinomului tiroidian papilar în funcție de dimensiunea tumorală în stadiul T1a.

- 1. Introducere
- 2. Ipoteza de lucru
- 3. Material și metodă
- 4. Rezultate
- 5. Discuții
- 6. Concluzii

Studiul II: Evoluția clinică și imagistică a pacienților cu microcarcinom tiroidian papilar cu nivelul seric al Tg/ Ac. anti-Tg crescut.

- 1. Introducere
- 2. Ipoteza de lucru
- 3. Material și metodă
- 4. Rezultate
- 5. Discuții
- 6. Concluzii

Studiul III: Evaluarea agresivității tumorale a microcarcinoamelor tiroidiene diferențiate în funcție de profilul molecular.

- 1. Introducere
- 2. Ipoteza de lucru
- 3. Material și metodă
- 4. Rezultate
- 5. Discuții
- 6. Concluzii

### Cuvinte-cheie:

- 1. carcinom tiroidian papilar
- 2. microcarcinoame
- 3. diametru tumoral total
- 4. multifocalitate unilaterala
- 5. 18F-FDG PET/CT
- 6. microARN

### A. Stadiul actual al cunoașterii

Cancerul tiroidian este cea mai întâlnită tumoră endocrină la om care are o creștere continuă a incidentei, mai ales pe seama microcarcinoamelor.

Microcarcinomul tiroidian papilar este o tumoră epitelială malignă cu dovezi de diferențiere foliculară și o serie de caracteristici nucleare specifice, care are dimensiunea maximă a tumorii de 1 cm. Incidența microcarcinomului tiroidian papilar este în creștere

datorită disponibilității la o scară mai largă a metodelor de diagnostic îmbunătățite, cum ar fi ultrasonografia și biopsia aspirativă cu ac fin. Se estimează că microcarcinomul tiroidian papilar reprezintă mai mult de 50% din cazurile noi de cancer tiroidian.

Deși microcarcinomul tiroidian papilar este considerat a fi cea mai indolentă formă de cancer tiroidian, metastazele limfoganglionare și recurența locală sunt frecvent întâlnite. Indiferent de cât de cuprinzător este conținutul ghidurilor actuale pentru managementul cancerului tiroidian, anumite strategii terapeutice rămân discutabile, îngreunând decizia clinicianului.

De exemplu, a 8-a versiunea actualizată AJCC/TNM a sistemului de stadializare pentru cancerul tiroidian diferențiat și anaplastic clasifică tumora primară considerând doar dimensiunea celei mai mari tumori. Ghidul ATA 2015 clasifică toate microcarcinoamele tiroidiene papilare intratiroidiene, fie unifocale sau multifocale, în categoria de risc scăzut. Alte ghiduri de referință cu privire la managementul cancerului tiroidian (NCCN 2018, ETA 2019 și ESMO 2019) nu includ deloc recomandări privind tratamentul microcarcinomului tiroidian papilar.

Ideea de bază a cercetării cuprinse în această teză a urmărit identificarea unor căi de diferențiere între formele agresive și cele indolente ale microcarcinoamelor tiroidiene papilare. Pentru a identifica aceste mijloace și a testa aplicabilitatea lor, am abordat trei direcții care au stat la baza studiilor efectuate: imunologică, histologică și imagistică.

Partea imunologică a constatat în studiul microARN-urilor implicate în patologia carcinomului tiroidian, cu prezentarea interacțiunilor acestora cu proteinele țintă, modul de reglare și efectul lor asupra celulelor din carcinomul tiroidian papilar.

Partea de cercetare referitoare la criteriile histologice a presupus evaluarea implicării în formele metastatice a unor parametri precum diametru tumoral total și multifocalitatea. Alte caracteristici histologice și demografice au fost analizate pentru a găsi posibile corelații cu formele agresive de microcarcinom tiroidian papilar.

Partea imagistică a evaluat rolul 18F-FDG PET/CT în monitorizarea pacienților cu microcarcinom tiroidian papilar, în special pentru formele persistente/recurente, precum și evaluarea metastazelor.

Fiecare parte a tratat detaliat subiectul cercetării pentru a descoperi existența unei corelații statistice semnificative între caracteristicile tumorale evaluate și formele agresive de microcarcinom tiroidian papilar. Caracteristicile cu semnificație statistică au fost apoi grupate pentru crearea unui model de predicție al formelor agresive de microcarcinom tiroidian papilar. Rezultatele acestui studiu ar putea valida încrederea cu care sunt utilizate ghidurile actuale sau ar putea deschide căi perfecționate în utilizarea caracteristicilor tumorale noi ca instrumente decizionale.

## **B. Contribuția personală**

**Studiul I:** Evaluarea agresivității microcarcinomului tiroidian papilar în funcție de dimensiunea tumorală în stadiul T1a.

### **1. Introducere**

Microcarcinomul tiroidian papilar (mCTP) este definit ca o tumoră epitelială malignă cu dovezi de diferențiere foliculară și o serie de caracteristici nucleare specifice, cu dimensiunea maximă a tumorii  $\leq 1$  cm. Incidența mCTP este în creștere din cauza accesului facilitat la metode de diagnostic îmbunătățite, cum ar fi ecografia de rezoluție înaltă sau puncția aspirativă cu ac fin, și se estimează că deja reprezintă mai mult de 50% din cazurile noi de cancer tiroidian. Deși mCTP este considerat a fi cea mai indolentă formă de cancer

tiroidian, metastazele ganglionare și recurența locală sunt relativ frecvent întâlnite. Indiferent de cât de cuprinzător este conținutul ghidurilor actuale, anumite strategii terapeutice rămân discutabile, îngreunând decizia clinicianului. Ghidul ATA din 2015 plasează toate mCTP intratiroidiene, fie ele unifocale sau multifocale, în categoria de risc scăzut. Doar mCTP multifocale cu extensie extratiroidiana (ETE) sunt considerate a fi în grupul de risc intermediar.<sup>14</sup> Alte ghiduri internaționale care au ca subiect managementul cancerului tiroidian nu au deloc recomandări privind tratamentul mCTP.

## 2. Ipoteza de lucru

Studiul de față are ca obiectiv să aducă informații noi privind factorii prognostici ce ar putea determina evoluția în timp a unui mCTP, în ciuda managementului corect conform protocoalelor. Cercetările de la nivel mondial efectuate până în acest moment nu aduc date clare și suficiente privind influența exercitată de unifocalitatea /multifocalitatea și DTT asupra evoluției mCTP.

## 3. Material și metodă

Am efectuat o căutare în baza de date a instituției folosind cuvintele cheie: papilar + tiroidă + microcarcinom + metastaze. După aplicarea criteriilor de selecție, 41 de pacienți cu mCTP metastatic au fost identificați. Folosind datele demografice ale grupului metastatic, am căutat alți 41 de pacienți cu diagnostic de mCTP și date demografice cât mai apropiate de grupul țintă. Pacienții din grupul comparativ au avut diagnosticul de mCTP fără boala metastatică. Datele cu privire la caracteristicile demografice, diagnostic și protocolul terapeutic au fost preluat din fișa medicală a pacienților. Informațiile histopatologice a fost extrase din raportul histopatologic original. CTP care măsoară  $\leq 1$  cm sau mai puțin în diametru au fost definite ca mCTP. Caracteristicile histopatologice examinate au fost metastazele ganglionilor limfatici centrali și laterali, extensia extratiroidiană microscopică și macroscopică (ETE), invazie limfovasculară (LVI), și metastazele la distanță. Pentru leziunile multifocale, a fost folosită suma diametrului maxim al fiecărui focar tumoral pentru a calcula diametrul tumoral total (DTT)

Pentru variabilele nominale a fost folosit testul Chi-pătrat și testul Fisher. Pentru variabile continue, distribuția a fost testată prin testul de normalitate Kolmogorov-Smirnov. Pentru variabilele continue distribuite normal - a fost utilizat testul-t pentru eșantioane independente, iar pentru variabile continue care nu au fost normal distribuite— testul U Mann-Whitney.

## 4. Rezultate

A existat o diferență semnificativă statistic între cele două grupuri în ceea ce privește multifocalitatea și DTT. Proporția pacienților din grupul metastatic cu multifocalitate unilaterală, a fost semnificativ mai mare decât în grupul non-metastatic (26.8% vs. 7.3%,  $p = 0.019$ ). Pe baza DTT, grupul metastatic a avut o dimensiune considerabilă mai mare, comparativ cu grupul non-metastatic (mediana  $\pm$  IQR :  $9.0 \pm 7.2$  vs.  $5.0 \pm 7.0$  mm.,  $p = 0,026$ ). În continuare, a existat o diferență semnificativă între grupul metastatic cu DTT  $> 10$  mm. comparativ cu grupul non-metastatic (mediana  $\pm$  IQR:  $17.0 \pm 12.3$  vs.  $12.0 \pm 3.9$  mm.,  $p = 0.036$ ).

O analiză multivariată a fost utilizată pentru a identifica care dintre caracteristicile semnificative statistic pot fi folosite ca predictorii independenți ai bolii metastatice. Analiza multivariată a arătat un nivel semnificativ al  $p=0.0026$ , un coeficient de determinare  $R^2$  de 0.1663, un  $R^2$  ajustat de 0.1342, și un coeficient de corelație multiplă de 0.4078 (Tab. III).

DTT și multifocalitatea unilaterală (MU) s-au dovedit a fi predictori independenți ai bolii metastatice în mCTP, în timp ce DTT >10 mm nu a fost semnificativ statistic. Pentru cercetări statistice suplimentare, a fost creat modelul de predicție. DTT, MU și modelul de predicție au fost supuse unei analize ROC. Caracteristicile statistice ale DTT și MU au fost folosite pentru a crea un model de predicție cu următoarele valori statistice ( $p < 0.0001$ , Se=60.98%, Sp=75.61%).

## 5. Discuții

DTT/multifocalitatea în mCTP au fost subiectul mai multor lucrări recente. Majoritatea cercetărilor au fost efectuate pe o cohortă mare de pacienți și oferă date foarte utile; cu toate acestea, datele demografice europene sunt rare, majoritatea studiilor concentrându-se pe populațiile asiatice.

În acest studiu a fost observată o diferență semnificativă statistic, între cele două grupuri comparate, pentru multifocalitatea unilaterală (26.8% vs. 7.3%,  $p = 0.019$ ). Multifocalitatea unilaterală s-a dovedit, de asemenea, a fi un predictor independent al bolii metastatice în studiul nostru. Similar cu rezultatele menționate anterior, au fost și rezultatele prezentate de Cai et al. care arată că pacienții cu multifocalitate unilaterală au avut o probabilitate mai mare să dezvolte metastaze limfo-ganglionare decât cei cu multifocalitate bilaterală.

În ceea ce privește DTT, rezultatele cercetării noastre au indicat că grupul metastatic a avut o dimensiune considerabilă mai mare în comparație cu grupul non-metastatic (mediana  $\pm$  IQR: 9.0  $\pm$  7.2 vs. 5.0  $\pm$  7.0 mm,  $p = 0.026$ ). În plus, a existat o diferență semnificativă între grupul metastatic cu DTT > 10 mm. comparativ cu grupul non-metastatic (mediana  $\pm$  IQR: 17.0  $\pm$  12.3 vs. 12.0  $\pm$  3.9 mm.,  $p = 0.036$ ). Descoperiri similare au fost publicate în cercetarea lui Feng et al. Rezultatele studiului său au arătat că mCTP multifocal cu DTT > 10 mm a fost mai agresiv decât mCPT unifocal sau mCTP multifocal cu DTT  $\leq$  10 mm.

Rezultatele studiului de față au arătat că DTT și MU sunt predictori independenți ai bolii metastatice în mCTP. Valoarea de prag a DTT > 4,4 mm prezice independent boala metastatică cu o Se de 78.05% și Sp de 46.34%. Pe de altă parte, prezența MU prezice independent boala metastatică în mCTP (Se=26.83%, Sp= 92,68%). Prin integrarea caracteristicilor statistice oferite de DTT și MU, a fost creat un model de predicție pentru boala metastatică (Se = 60,98%, Sp = 75,61%).

Există mai multe dezavantaje ale acestui studiu. Numărul mic de pacienți incluși în cercetare este una dintre limitări. Acest lucru este consecința faptului că disecția profilactică a ganglionilor limfatici nu se efectuează în mod obișnuit în centrul nostru, deci numărul de pacienți cu un diagnostic histopatologic de mCTP care să include statusul ganglionilor limfatici a fost foarte limitat. În plus, aceasta este o cercetare retrospectivă bazată pe experiența unui singur centru regional. În această perspectivă, sunt necesare studii clinice multicentrice randomizate caz-control.

## 6. Concluzii

Datele noastre arată că diametul tumoral total și multifocalitatea unilaterală pot fi utilizate pentru a prezice boala metastatică în mCTP, ceea ce poate ajuta la o mai bună adaptare a deciziei pentru RIT. Credem că DTT și MU sunt caracteristici tumorale care ar trebui să fie luate în considerare în ghidurile viitoare. De asemenea, credem ca sunt necesare studii cu cohorte mai mari, pe populație europeană, care să evalueze factorii de risc pentru dezvoltarea microcarcinoamelor tiroidiene agresive.

## **Studiul II: Evoluția clinică și imagistică a pacienților cu microcarcinom tiroidian papilar cu nivelul seric al Tg/ Ac. anti-Tg crescut**

### **1. Introducere**

Chiar dacă microcarcinoamele tiroidiene papilare (mCTP) au de obicei un prognostic foarte bun, există situații când poate apărea recurența. Formele agresive de microcarcinoame, care prezintă multifocalitate sau metastaze limfoganglionare, au un risc sporit de recurență. După intervenția chirurgicală, și radioiodoterapie (RIT) acolo unde este necesară, monitorizarea pacienților se face prin ecografia cervicală, evaluarea nivelurilor serice stimulate ale tiroglobulinei (Tg) și anticorpilor anti-tiroglobulină (Ac. anti-Tg), și scanarea de corp întreg post-terapeutică. Nivelurile Tg și Ac. anti-Tg postoperatorii nedetectabile sugerează un succes terapeutic. Atunci când Tg sau Ac. anti-Tg sunt pozitive, adică este prezent un răspuns biochimic incomplet, se poate continua tratamentul cu I-131. În majoritatea cazurilor, scanarea de corp întreg post RIT arată leziuni averse pentru I-131, însă există și situații când aceste leziuni nu sunt vizualizate. Este prezentă dovada biochimică a cancerului tiroidian persistent sau recurent, evidențiată prin nivelurile Tg/Ac. anti-Tg, fără prezența unei leziuni structurale pentru tratamentul cu I-131. Acest scenariu, este denumit sindromul TENIS (thyroglobulin elevated negative iodine scintigraphy).

### **2. Ipoteza de lucru**

Conform ghidului ATA, pentru pacienții cu carcinom tiroidian diferențiat cu risc înalt, care au nivelul Tg serice >10 ng/mL și scanarea de corp întreg post RIT negativă, este luată în considerare examinarea PET/CT. Pentru cazurile de microcarcinom tiroidian papilar cu metastaze limfo-ganglionare, trecerea din categoria de risc moderat în cea de risc înalt, se poate face doar dacă dimensiunea unei metastaze limfo-ganglionare depășește 3 cm sau nivelul seric de Tg postoperator este sugestiv pentru metastaze la distanță. Studiul de față își propune să evalueze metodele clinice și imagistice utilizate în managementul formelor persistente/recurente de microcarcinom tiroidian papilar. Motivația acestui studiu pornește de la premiza cazuisticii foarte rare a formelor recurente de mCTP.

### **3. Material și metodă**

Colectarea datelor a fost efectuată retrospectiv incluzând toți pacienții tratați în centrul oncologic regional între ianuarie 2008 și martie 2021 care au îndeplinit următoarele criterii: pacienți cu tratament chirurgical de primă intenție, tiroidectomie totală asociată cu limfadenectomie selectivă, informații clinicopatologice complete disponibile și diagnosticul patologic final mCTP.

Au fost selectați 88 de pacienți, care au fost tratați în departamentul de Medicină Nucleară și tumori endocrine din cadrul Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță", având diagnosticul de mCTP. Pentru selecționarea pacienților a fost efectuată o căutare în baza de date a instituției folosind cuvintele cheie: papilar + tiroidă + microcarcinom + metastaze. 44 de pacienți cu mCTP metastatic au fost identificați. Folosind datele demografice ale grupului metastatic, am identificat alți 44 de pacienți cu diagnostic de mCTP și date demografice cât mai apropiate de grupul țintă. Pacienții din grupul comparativ au avut diagnosticul de mCTP fără boala metastatică. Datele cu privire la caracteristicile demografice, diagnostic, protocolul terapeutic, urmărire și recurență, au fost preluate din fișa medicală a pacienților. CTP care măsoară  $\leq 1$  cm sau mai puțin în diametru au fost definite ca mCTP.

Pacienții au fost monitorizați la 3-6 luni în primul an și la 6-12 luni, după primul an. Procedurile standard de monitorizare au inclus ecografia cervicală, determinarea nivelurilor serice stimulate pentru TSH, Tg, Ac-anti-Tg. Boala persistentă a fost definită ca fiind răspunsul incomplet la terapia inițială (6-12 luni după tiroidectomia totală cu terapie ulterioară cu iod radioactiv), și a fost cuantificată prin nivelul stimulat al Tg  $\geq 10$  (ng/mL) sau Ac. anti-Tg  $>115$  (UI/mL). Boala recurentă a fost definită ca o creștere a valorilor stimulate de Tg sau Ac. anti-Tg, în dinamică, față de determinările precedente. Pentru pacienții cu persistentă/recurență, pe lângă procedurile standard au fost incluse următoarele examinări: scintigrafie de corp întreg cu I-131, CT cerebral/toracic și 18F-FDG-PET/CT.

#### 4. Rezultate

Dintre acești pacienți 66 (75.0%) erau femei, și 22 (25.0%) erau bărbați. Funcția tiroidiană anterioară tiroidectomiei a fost afectată doar pentru 7 pacienți (8.0%), doi (2.3%) dintre aceștia având hipotiroidism și 5 hipertiroidism (5.7%). Cei mai mulți dintre pacienți au avut ca manifestare de debut gușa nodulară- 65 (73.8%), urmată de deformarea regiunii cervicale anterioare pentru 11 pacienți (12.5%) și adenopatiile cervicale la 10 pacienți (11.3%). Doar 4 (4.5%) pacienți au avut simptome asociate cu dispneea sau tulburări de glutiție, și numai 2 (2.3%) s-au prezentat cu nodul tiroidian palpabil. Puncția biopsie cu ac fin a fost efectuată doar la 9 pacienți (10.2%).

Din totalul pacienților, după analiza histopatologică, majoritatea au avut subtipuri histologice blânde, 55 (62.5%) de pacienți fiind diagnosticați cu mCTP convențional, și 26 (29.5%) cu varianta foliculară. Dintre formele cu evoluție clinică mai agresivă, au fost diagnosticați 4 (4.5%) pacienți cu subtipul oncocitar, și câte un pacient pentru subtipul sclerozant difuz, solid/trabecular și cu celule columnare.

Postoperator, pentru toți pacienții incluși în studiu, au fost determinate nivelurile serice stimulate ale Tg și Ac. anti Tg. Mediana valorii serice de Tg a fost de 4.6 ng/mL, cu o valoare minimă de 0.04 ng/mL și cea maximă de 96.53 ng/mL. Mediana valorii pentru Ac. anti-Tg a fost de 14.0 UI/mL, cu valoarea minimă de 10 UI/mL și cea maximă de 2245 UI/mL. Comparând valorile serice de Tg și Ac. anti-Tg, prezența multifocalității și diametrul tumoral total, între pacienții cu răspuns excelent/nedeterminat și cei cu răspuns incomplet (boală persistentă/recurentă), existat o diferență semnificativă statistic între cele 2 grupuri pentru valorile serice postoperatorii ale Tg și diametrul tumoral total.

Mediana valorii Tg postoperatorii în grupul pacienților cu răspuns excelent/nedeterminat a fost de 3.5 (min 0.04-max 95.3) UI/mL, în timp ce pentru pacienții din grupul cu răspuns incomplet (boală recurentă/persistentă), mediana valorii Tg a fost de 13.6 (min 0.1-max 96.5) UI/mL, existând o diferență semnificativă statistic între cele două grupuri ( $p=0.013$ ). Pe baza DTT, grupul cu răspuns excelent/nedeterminat a avut o dimensiune considerabilă mai mică, comparativ cu grupul cu răspuns incomplet (mediana  $\pm$  IQR :  $7.0 \pm 6.1$  vs.  $13.5 \pm 9.7$  mm.,  $p = 0,001$ ).

Pentru pacienții care au avut rezultatul examinării 18F-FDG PET/CT negativ, au primit încă o doză empirică de  $^{131}\text{I}$ , ori au fost urmăriți fără a primi o doză de completare. Cei cu modificări nespecifice au primit încă o doză empirică, iar în scenariu în care examinarea a avut rezultat pozitiv, s-a optat pentru excizie chirurgicală urmată de radioterapie externă. În 37,% din cazuri, PET/CT a schimbat radical conduita terapeutică, iar în restul cazurilor a avut un rol cel puțin orientativ. Cea mai însemnată utilitate a acestei examinări a fost în cazurile cu evoluție agresivă.

#### 5. Discuții

Comparativ cu datele unui studiu recent, efectuat pe un lot de 517 pacienți cu mCTP, în ceea ce privește răspunsul la tratament, datele din studiul nostru sunt aproape similare. Majoritatea pacienților din studiu nostru, 79.5%, au avut un răspuns excelent sau nedeterminat, și 20,5% au avut un răspuns incomplet, comparativ cu rezultatele din literatură cu 79.3% pentru răspuns excelent și 20.7% pentru răspuns incomplet. Dacă analizăm persistența/recurența, comparativ cu datele din literatură, boala persistentă a fost prezentă la un procentaj de pacienți similar în studiul nostru, respectiv 15.9% vs. 14.3%. Boala recurentă a fost întâlnită la un procentaj relativ similar în studiul de față, respectiv 4.6%, comparativ cu datele din literatura de specialitate 7.9-3.1%.

Rezultatele din studiul nostru arată că a existat o diferență statistic semnificativă între pacienții cu răspuns excelent /nedeterminat și cei cu răspuns incomplet (adică cei cu boală persistentă/recurentă) pentru valoarea Tg postoperatorie (mediana =3.5, min 0.04-max 95.3 vs mediana =13.6 min 0.1-max 96.5 UI/mL,  $p=0.013$ ) și diametrul tumoral total (mediana  $\pm$  IQR :  $7.0 \pm 6.1$  vs.  $13.5 \pm 9.7$  mm.,  $p = 0,001$ ). Deoarece în studiul de față a existat un număr mic de pacienți cu boală persistentă/recurentă ( $n=18$ ) am considerat neoportună continuarea cercetării pentru a evalua dacă valoarea Tg postoperatorie și diametrul tumoral total sunt factori predictivi pentru persistență/recurență. De asemenea considerăm că acest lucru ar putea fi un subiect cel puțin interesant pentru cercetări ulterioare, având în vedere studiile relativ puține, 157 și absenta celor efectuate pe eșantioane de populație europeană, atunci când sunt vizate strict cazurile de mCTP.

Rezultatele acestui studiu arată că examinarea 18F-FDG PET/CT a schimbat radical conduita terapeutică în 37.5% din cazuri, iar atunci când rezultatul a fost negativ sau nespecific, a avut un rol de orientare a conduitei ulterioare. Indispensabilitatea acestei examinări apare în scenariile cu evoluție agresivă.

## 6. Concluzii

Valoarea serică a Tg postoperatorie și diametrul tumoral total ar putea fi factori predictivi pentru boala persistentă/recurentă în microcarcinoamele tiroidiene papilare. Sindromul TENIS apare foarte rar în microcarcinoamele tiroidiene papilare, de aceea este deosebit de important ca instrumentele diagnostice și terapeutice să fie aplicate corect. Metastazele la distanță din microcarcinoamele tiroidiene papilare sunt excepționale, mai ales cele la nivelul musculaturii striate, iar 18F-FDG PET/CT este o examinare cu un rol major în evaluarea bolii metastatice.

**Studiul III:** Evaluarea agresivității tumorale a microcarcinoamelor tiroidiene diferențiate în funcție de profilul molecular.

### 1. Introducere

MicroARN-urile sunt o clasă de molecule endogene de ARN necodificatoare cu lungime de la 18 la 22 de nucleotide. MicroARN-urile constituie doar 3% din genomul uman dar se crede că ele reglează mai mult de jumătate din genele care codifică proteine. MicroARN-ul matur poate promova sau inhiba translația și degradarea acidului ribonucleic mesager (ARNm), prin targetare cu secvențe complementare de precizie în regiunile netraslate 3' (3'UTR). Ele acționează atât ca regulatori post-transcripționali ai expresiei genelor cât și ca mesageri sau semnalizatori intercelulari. MicroARN-urile sunt implicate în procese biologice centrale, inclusiv dezvoltarea, organogeneza, diferențierea tisulară, cicluri

celulare și metabolism. Modificările în expresia microARN contribuie la patogeneza majorității tumorilor maligne umane, inclusiv CTP.

## 2. Ipoteza de lucru

Cea mai frecventă formă de cancer endocrin - carcinomul papilar tiroidian, are o incidență în continuă creștere. Deși această boală are de obicei un comportament indolent, există cazuri când poate evolua mai agresiv. Se știe de ceva vreme că este posibil să se utilizeze microARN pentru diagnosticul, prognosticul și chiar monitorizarea tratamentului cancerului papilar tiroidian. Scopul acestui studiu este de a rezuma cele mai recente informații furnizate de publicațiile referitoare la implicarea microARN-urilor în cancerul papilar tiroidian, subliniind noile perspective clinice oferite de acestea.

## 3. Material și metodă

O analiză a literaturii a fost efectuată folosind PubMed, pentru studiile publicate din 2018 până în iunie 2020. Pentru căutare au fost utilizate următoarele cuvinte cheie: „microARN”+ „papilar”+ „tiroidă” +„carcinom”, care a avut ca rezultat 466 de articole în limba engleză. Toate rezumatele conexe au fost revizuite și au fost selectate studiile relevante, publicate în limba engleză. Am inclus doar documentele care aveau textul disponibil în totalitate și studiile care au descris metoda exactă și rezultatele cu privire la implicarea microARN în mecanism epigenetic al CTP. O selecție de 137 de articole eligibile a fost rezultatul căutării efectuate. Datele despre microARN-uri, sursa probelor, modul de reglare al microARN-urilor, genele/proteinele țintă ale microARN-urilor și efectul lor asupra celulelor CTP din cele 137 de studii au fost selectate și sintetizate în baza de date.

## 4. Rezultate

Din 139 de microARN-uri studiate, 106 sunt subreglate și 33 sunt suprareglate (Tab. VII). Aceasta înseamnă că aproape un sfert dintre microARN-urile descrise au un rol oncogen (oncomiR), iar restul au rol supresor tumoral. Dereglarea microARN-urilor este un eveniment important în timpul dezvoltării carcinomului tiroidian papilar. Supraexpresia anumitor microARN-uri poate avea ca efect reprimarea genelor supresoare tumorale.

Analizând individual, în fiecare studiu, interacțiunea dintre microARN-uri și genele țintite de către acestea, am observat că aceeași genă poate fi țintită de microARN-uri diferite..

Un microARN nu țintește doar unul, ci mai multe ARNm/gene, așa cum s-a afirmat mai înainte. În cercetarea noastră, am identificat mai multe microARN-uri cu țintă asupra mai multor gene simultan. De exemplu, microARN-146b-5p, a redus expresia genei CCDC6 prin legarea la 3'UTR, în studiul lui Jia M et al.,<sup>282</sup> și a promovat expresia genei MALAT1 prin reglarea negativă a DNMT3A, în studiul lui Peng et al.<sup>217</sup> Același microARN-146b, dar cu capătul 3p situat în poziție inversă față de capătul 5p care este prezent în poziția din față (5'-3'), adică microARN-146b-3p, țintește direct gena NF2.286 Din aceeași familie, microARN-146a are ca țintă gena GABPA212 și microARN-146 țintește gena KIT.

## 5. Discuții

Fiecare microARN poate regla sute de ARN-uri mesager (ARNm), dar în același timp, microARN-uri diverse pot controla același ARNm. În plus, multe microARN-uri reglează și sunt reglate de alte specii de ARN-uri necodificatoare, cum ar fi ARN-urile circulare (circARN) și ARN-urile lungi necodificatoare(lncARN). Din acest motiv, este extrem de dificil să prezici, să studiezi și să analizezi rolul precis al unui singur microARN implicat în cancerul uman,



având în vedere complexitatea conexiunilor sale. Concentrarea pe o singură moleculă de microARN reprezintă o abordare limitată. Informații suplimentare ar putea proveni din analiza rețelei, un instrument comun în domeniul biologic, aplicat pentru o mai bună înțelegere interacțiunilor inter-moleculare.

Nivelurile de expresie ale anumitor microARN-uri în țesutul tumoral tiroidian sunt asociate cu anumite caracteristici clinicopatologice, cum ar fi: dimensiunea tumorii, multifocalitatea, invazia capsulară, extensia extratiroidiană, metastazele ganglionare și la distanță. Opțiuni de tratament au fost propuse și implementate pe baza rezultatelor obținute în urma cercetărilor efectuate asupra modificărilor epigenetice. Drept urmare, dezvoltarea de noi strategii terapeutice bazate pe țintirea modificărilor epigenetice, prin restabilirea expresiei microARN-urilor supresoare tumorale sau prin inhibarea microARN-urilor oncogenice supraexprimate, pot oferi un nou peisaj pentru tratamentul formelor agresive de CTP.

Aceste rezultate sugerează că microARN-urile circulante pot fi utile în calitate de biomarkeri moleculari noninvazivi, pentru diagnosticul și prognosticul mCTP,164 selectând acele cazuri care necesită terapii agresive, în ciuda histologiei mCTP. Având în vedere nevoia de mai multe studii în acest domeniu, acest subiect ar putea fi o idee de cercetare pentru viitor, în era medicinei personalizate.

## 6. Concluzii

Cercetările privind microARN-urile în CTP suferă schimbări excepționale, sugerând maturizarea accelerată a acestui domeniu. În această lucrare, am încercat să reprezentăm, cât mai succint, interacțiunile microARN-urilor cu proteinele țintă. Am arătat, de asemenea, modul de reglare al microARN-urilor și efectul acestora asupra celulelor CTP. Rezultatele noastre au arătat că o genă poate ținti mai multe microARN-uri simultan și viceversa. Toate aceste informații pot fi folosite pentru a identifica cele mai eficiente ținte/biomarkeri terapeutici în CTP. Pentru cercetări viitoare, am indicat o posibilă nișă, și anume semnăturile microARN în mCTP

## **PhD Thesis Summary**

### **PhD Thesis title:**

„ Immunological, histological and imaging correlations in differentiated thyroid microcarcinomas”

PhD student: Liviu Hîțu

PhD coordinator: Prof. Dr.Doina Piciu

### **Contents:**

A. Current state of knowledge

B. Personal contribution

Study I: Assessment of papillary thyroid microcarcinoma aggression by tumor size in T1a stage

1. Introduction
2. Working hypothesis
3. Material and method
4. Results
5. Discussions
6. Conclusions

Study II: Clinical and imaging progression of patients with papillary thyroid microcarcinoma with increased serum Tg/TgAb.

1. Introduction
2. Working hypothesis
3. Material and method
4. Results
5. Discussions
6. Conclusions

Study III: Evaluation of tumor aggressiveness of differentiated thyroid microcarcinomas according to molecular profile..

1. Introduction
2. Working hypothesis
3. Material and method
4. Results
5. Discussions
6. Conclusions

### **Keywords:**

1. papillary thyroid carcinoma
2. microcarcinomas
3. total tumor diameter
4. unilateral multifocality
5. 18F-FDG PET / CT
6. Micro RNA

### **A. Current state of knowledge**

Thyroid cancer is the most common endocrine tumor in humans that has a steady increase in incidence, especially due to microcarcinomas.

Papillary thyroid microcarcinoma is a malignant epithelial tumor with evidence of follicular differentiation and a number of specific nuclear features, which has a maximum

tumor size of 1 cm. The incidence of papillary thyroid microcarcinoma is increasing due to the widespread availability of improved diagnostic methods such as ultrasonography and fine needle aspiration biopsy. Papillary thyroid microcarcinoma is estimated to account for more than 50% of new cases of thyroid cancer.

Although papillary thyroid microcarcinoma is considered to be the most indolent form of thyroid cancer, lymph node metastases and local recurrence are common. No matter how comprehensive the content of current guidelines for thyroid cancer management, certain therapeutic strategies remain debatable, making it difficult for the clinician to make a decision.

For example, the 8th updated AJCC / TNM version of the staging system for differentiated and anaplastic thyroid cancer classifies the primary tumor as only the size of the largest tumor. The 2015 ATA Guide classifies all intrathyroid papillary thyroid microcarcinomas, whether unifocal or multifocal, as low risk. Other guidelines on thyroid cancer management (NCCN 2018, ETA 2019 and ESMO 2019) do not include any recommendations for the treatment of papillary thyroid microcarcinoma.

The basic idea of the research included in this thesis was to identify ways to differentiate between aggressive and indolent forms of papillary thyroid microcarcinomas. In order to identify these means and test their applicability, we approached three directions that were the basis of the studies performed: immunological, histological and imaging.

The immunological part consisted of the study of microRNAs involved in the pathology of thyroid carcinoma, with the presentation of their interactions with target proteins, how they regulate and their effect on cells in papillary thyroid carcinoma.

The research part on the histological criteria involved evaluating the involvement in metastatic forms of parameters such as total tumor diameter and multifocality. Other histological and demographic features were analyzed for possible correlations with aggressive forms of papillary thyroid microcarcinoma.

The imaging part evaluated the role of 18F-FDG PET / CT in the monitoring of patients with papillary thyroid microcarcinoma, especially for persistent / recurrent forms, as well as the evaluation of metastases.

Each part treated the research subject in detail to find a statistically significant correlation between the assessed tumor characteristics and the forms of aggressive papillary thyroid microcarcinoma. The statistically significant features were then grouped to create a prediction model of aggressive forms of papillary thyroid microcarcinoma. The results of this study could validate the confidence with which current guidelines are used or open up improved avenues for using new tumor features as decision-makers.

## **B. Personal contribution**

**Study I:** Assessment of papillary thyroid microcarcinoma aggression by tumor size in T1a stage.

### 1. Introduction

Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC) is defined as a malignant epithelial tumor with evidence of follicular differentiation and a number of specific nuclear

features, with a maximum tumor size  $\leq 1$  cm. The incidence of PTMC is increasing due to facilitated access to improved diagnostic methods, such as high-resolution ultrasound or fine-needle aspiration, and is estimated to account for more than 50% of new thyroid cancer cases. Although PTMC is considered to be the most indolent form of thyroid cancer, lymph node metastases and local recurrence are relatively common. No matter how comprehensive the content of the current guidelines, certain therapeutic strategies remain questionable, complicating the clinician's decision. The 2015 ATA Guidelines place all intrathyroid PTMC, whether unifocal or multifocal, in the low-risk category. Only multifocal PTMC with extra-thyroid extension (ETE) is considered to be in the intermediate risk group. Other international guidelines on the management of thyroid cancer have no recommendations on PTMC treatment.

## 2. Working hypothesis

The present study aims to bring new information on the prognostic factors that could determine the evolution over time of an mCTP, despite the correct management according to the protocols. Global research to date does not provide clear and sufficient data on the influence of unifocality / multifocality and DTT on the evolution of mCTP.

## 3. Material and method

We searched the institution's database using the keywords: papillary + thyroid + microcarcinoma + metastases. After applying the selection criteria, 41 patients with metastatic PTMC were identified. Using demographic data from the metastatic group, we looked for another 41 patients diagnosed with PTMC and demographic data as close as possible to the target group. Patients in the comparator group were diagnosed with PTMC without metastatic disease. Data on demographic characteristics, diagnosis and therapeutic protocol were taken from the patients' medical records. The histopathological information was extracted from the original histopathological report. PTCs measuring  $\leq 1$  cm or less in diameter were defined as PTMC. The histopathological features examined were central and lateral lymph node metastases, microscopic and macroscopic extrathyroidal extension (ETE), lymphovascular invasion (LVI), and distant metastases. For multifocal lesions, the sum of the maximum diameter of each tumor focus was used to calculate the total tumor diameter (TTD).

The Chi-square test and the Fisher test were used for the nominal variables. For continuous variables, the distribution was tested by the Kolmogorov – Smirnov normality test. For normally distributed continuous variables — the t-test was used for independent samples, and for continuous variables that were not normally distributed — the U Mann – Whitney test.

## 4. Results

There was a statistically significant difference between the two groups in terms of multifocality and TTD. The proportion of patients in the metastatic group with unilateral multifocality was significantly higher than in the non-metastatic group (26.8% vs. 7.3%,  $p = 0.019$ ). Based on TTD, the metastatic group had a considerably larger size compared to the non-metastatic group (median  $\pm$  IQR:  $9.0 \pm 7.2$  vs.  $5.0 \pm 7.0$  mm.,  $P = 0.026$ ). Furthermore, there was a significant difference between the metastatic group with TTD >

10 mm. compared to the non-metastatic group (median  $\pm$  IQR: 17.0  $\pm$  12.3 vs. 12.0  $\pm$  3.9 mm.,  $p = 0.036$ ).

A multivariate analysis was used to identify which statistically significant features could be used as independent predictors of metastatic disease. Multivariate analysis showed a significant level of  $p = 0.0026$ , an  $R^2$  coefficient of determination of 0.1663, an adjusted  $R^2$  of 0.1342, and a multiple correlation coefficient of 0.4078. TTD and unilateral multifocality (UM) proved to be independent predictors of metastatic disease in PTMC, while TTD > 10 mm was not statistically significant. For further statistical research, the prediction model was created. TTD, UM and the prediction model were subjected to ROC analysis. The statistical characteristics of TTD and UM were used to create a prediction model with the following statistical values ( $p < 0.0001$ ,  $Se = 60.98\%$ ,  $Sp = 75.61\%$ ).

## 5. Discussions

TTD / multifocality in PTMC has been the subject of several recent papers. Most research has been conducted on a large cohort of patients and provides very useful data; however, European demographics are scarce, with most studies focusing on Asian populations.

In this study, a statistically significant difference was observed between the two groups compared for unilateral multifocality (26.8% vs. 7.3%,  $p = 0.019$ ). Unilateral multifocality has also been shown to be an independent predictor of metastatic disease in our study. Similar to the results mentioned above, were the results presented by Cai et al. showing that patients with unilateral multifocality were more likely to develop lymph node metastases than those with bilateral multifocality.

Regarding TTD, the results of our research indicated that the metastatic group had a considerably larger size compared to the non-metastatic group (median  $\pm$  IQR: 9.0  $\pm$  7.2 vs. 5.0  $\pm$  7.0 mm,  $p = 0.026$ ). In addition, there was a significant difference between the metastatic group with TTD > 10 mm. compared to the non-metastatic group (median  $\pm$  IQR: 17.0  $\pm$  12.3 vs. 12.0  $\pm$  3.9 mm.,  $p = 0.036$ ). Similar findings have been published in the research of Feng et al. The results of his study showed that multifocal PTMC with TTD > 10 mm was more aggressive than unifocal PTMC or multifocal PTMC with TTD  $\leq$  10 mm.

The results of the present study showed that TTD and UM are independent predictors of metastatic disease in PTMC. The threshold value of TTD > 4.4 mm independently predicts metastatic disease with an  $Se$  of 78.05% and  $Sp$  of 46.34%. On the other hand, the presence of UM independently predicts metastatic disease in PTMC ( $Se = 26.83\%$ ,  $Sp = 92.68\%$ ). By integrating the statistical characteristics provided by TTD and UM, a prediction model for metastatic disease was created ( $Se = 60.98\%$ ,  $Sp = 75.61\%$ ).

There are several disadvantages to this study. The small number of patients included in the research is one of the limitations. This is due to the fact that prophylactic dissection of the lymph nodes is not usually performed in our center, so the number of patients with a histopathological diagnosis of PTMC including lymph node status was very limited. In addition, this is a retrospective research based on the experience of a single regional center. In this perspective, randomized case-control multicenter clinical trials are needed.

## 6. Conclusions

Our data show that total tumor diameter and unilateral multifocality can be used to predict metastatic disease in PTMC, which may help to better adapt the decision for RIT. We believe that DTT and MU are tumor features that should be considered in future guidelines. We also believe that studies with larger cohorts on the European population are needed to assess the risk factors for the development of aggressive thyroid microcarcinomas.

**Study II:** Clinical and imaging evolution of patients with papillary thyroid microcarcinoma with serum Tg / Ac. increased anti-Tg.

### 1. Introduction

Although papillary thyroid microcarcinomas (PTMC) usually have a very good prognosis, there are situations when recurrence may occur. Aggressive forms of microcarcinoma, which have multifocality or lymph node metastases, have an increased risk of recurrence. After surgery, and radioiodine therapy (RIT) where necessary, monitoring of patients is done by cervical ultrasound, assessment of stimulated serum levels of thyroglobulin (Tg) and anti-thyroglobulin antibodies (TgAb), and post -therapeutic whole body scan. Undetectable postoperative Tg and TgAb suggests therapeutic success. When Tg or TgAb are positive, ie an incomplete biochemical response is present, treatment with I-131 can be continued. In most cases, post-iodine full-body scans show avid lesions for I-131, but there are also situations when these lesions are not visualized. Biochemical evidence of persistent or recurrent thyroid cancer is present, as evidenced by Tg / TgAb levels, without the presence of a structural lesion for treatment with I-131. This scenario is called TENIS syndrome (thyroglobulin elevated negative iodine scintigraphy).

### 2. Working hypothesis

According to the ATA guideline, for patients with high-risk differentiated thyroid carcinoma who have serum Tg levels > 10 ng / mL and whole body scan after negative RIT, PET / CT examination is considered. For cases of papillary thyroid microcarcinoma with lymph node metastases, switching from moderate risk to high risk can only be done if the size of a lymph node metastasis exceeds 3 cm or the serum level of postoperative Tg is suggestive of distant metastases. The present study aims to evaluate the clinical and imaging methods used in the management of persistent / recurrent forms of papillary thyroid microcarcinoma. The motivation of this study starts from the premise of the very rare casuistry of recurrent forms of mCTP.

### 3. Material and method

Data collection was performed retrospectively including all patients treated at the regional cancer center between January 2008 and March 2021 who met the following criteria: patients with first-line surgical treatment, total thyroidectomy associated with selective lymphadenectomy, complete clinicopathological information available, and final pathological diagnosis of PTMC.

88 patients were selected, who were treated in the department of Nuclear Medicine and endocrine tumors within the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță", having the diagnosis of PTMC. For the selection of patients, a search was performed in the institution's database using the keywords: papillary + thyroid + microcarcinoma + metastases. 44 patients with metastatic PTMC were identified. Using demographic data from the metastatic group, we identified another 44 patients diagnosed with PTMC and demographic data as close as possible to the target group. Patients in the comparator group were diagnosed with PTMC without metastatic disease. Data on demographic characteristics, diagnosis, therapeutic protocol, follow-up and recurrence were taken from the patients' medical records. PTCs measuring  $\leq 1$  cm or less in diameter were defined as PTMCs.

Patients were monitored at 3-6 months in the first year and at 6-12 months after the first year. Standard monitoring procedures included cervical ultrasound, determination of stimulated serum levels for TSH, Tg, TgAb. Persistent disease was defined as an incomplete response to initial therapy (6-12 months after total thyroidectomy with subsequent radioactive iodine therapy), and was quantified by stimulated Tg  $\geq 10$  (ng / mL) or TgAb  $> 115$  (IU / mL). Recurrent disease was defined as an increase in Tg or TgAb stimulated values in dynamics, compared to previous determinations. For patients with persistence / recurrence, in addition to standard procedures, the following examinations were included: whole-body scintigraphy with I-131, brain / chest CT and 18F-FDG-PET / CT

#### 4. Results

Of these patients, 66 (75.0%) were female, and 22 (25.0%) were male. Thyroid function prior to thyroidectomy was affected in only 7 patients (8.0%), two (2.3%) of whom had hypothyroidism and 5 hyperthyroidism (5.7%). Most of the patients had as a manifestation of onset nodular goiter - 65 (73.8%), followed by deformity of the anterior cervical region for 11 patients (12.5%) and cervical lymphadenopathy in 10 patients (11.3%). Only 4 (4.5%) patients had symptoms associated with dyspnoea or swallowing disorders, and only 2 (2.3%) presented with a palpable thyroid nodule. Fine needle biopsy was performed in only 9 patients (10.2%).

Out of the total number of patients, according to the histopathological analysis, most had mild histological subtypes, 55 (62.5%) of patients being diagnosed with conventional mCTP, and 26 (29.5%) with follicular variant. Among the forms with more aggressive clinical evolution, 4 (4.5%) patients with oncocytic subtype were diagnosed, and one patient for the diffuse, solid / trabecular sclerosing subtype and with columnar cells.

Postoperatively, for all patients included in the study, serum levels of Tg and TgAb were determined. The median serum Tg value was 4.6 ng / mL, with a minimum value of 0.04 ng / mL and a maximum of 96.53 ng / mL. The median value for TgAb was 14.0 IU / mL, with a minimum value of 10 IU / mL and a maximum of 2245 IU / mL. Comparing serum Tg and TgAb values, the presence of multifocality and total tumor diameter, between patients with excellent / undetermined response and those with incomplete response (persistent / recurrent disease), there was a statistically significant difference between the 2 groups for postoperative serum Tg values and total tumor diameter.

The median postoperative Tg value in the group of patients with excellent / undetermined response was 3.5 (min 0.04-max 95.3) IU / mL, while for patients in the group with incomplete response (recurrent / persistent disease), the median Tg value was 13.6 (min 0.1-max 96.5) IU / mL, with a statistically significant difference between the two groups ( $p = 0.013$ ). Based on TTD, the group with excellent / undetermined response had a considerably smaller size compared to the group with incomplete response (median  $\pm$  IQR:  $7.0 \pm 6.1$  vs.  $13.5 \pm 9.7$  mm.,  $P = 0.001$ ).

For patients who had a negative 18F-FDG PET/CT test result, they received another empirical dose of 131I, or were followed up without receiving a supplemental dose. Those with nonspecific changes received another empirical dose, and in the scenario in which the examination had a positive result, they opted for surgical excision followed by external radiotherapy. In 37% of cases, PET/CT radically changed the therapeutic behavior, and in the rest of the cases it had at least an indicative role. The most important utility of this examination was in cases with aggressive evolution

## 5. Discussions

Compared to data from a recent study of 517 patients with PTMC in terms of response to treatment, the data in our study are almost similar. The majority of patients in our study, 79.5%, had an excellent or indeterminate response, and 20.5% had an incomplete response, compared with the results in the literature with 79.3% for an excellent response and 20.7% for an incomplete response. If we analyze the persistence / recurrence, compared to the data in the literature, the persistent disease was present in a similar percentage of patients in our study, respectively 15.9% vs. 14.3%. The recurrent disease was found at a relatively similar percentage in the present study, respectively 4.6%, compared to the data in the literature 7.9-3.1%.

The results of our study show that there was a statistically significant difference between patients with excellent / undetermined response and those with incomplete response (ie those with persistent / recurrent disease) for postoperative Tg value (median = 3.5, min 0.04-max 95.3 vs. median = 13.6 min 0.1-max 96.5 IU / mL,  $p = 0.013$ ) and total tumor diameter (median  $\pm$  IQR:  $7.0 \pm 6.1$  vs.  $13.5 \pm 9.7$  mm.,  $P = 0.001$ ). Because in the present study there were a small number of patients with persistent / recurrent disease ( $n = 18$ ) we considered it inappropriate to continue the research to assess whether the postoperative Tg value and total tumor diameter are predictive factors for persistence / recurrence. We also consider that this could be at least an interesting topic for further research, given the relatively few studies, and the absence of those conducted on European population samples, when mCTP cases are strictly targeted.

The results of this study show that 18F-FDG PET / CT examination radically changed treatment in 37.5% of cases, and when the result was negative or nonspecific, it had a role in guiding follow-up. The indispensability of this examination appears in the scenarios with aggressive evolution.

## 6. Conclusions

Serum postoperative Tg value and total tumor diameter could be predictive factors for persistent / recurrent disease in papillary thyroid microcarcinomas. TENIS syndrome rarely occurs in papillary thyroid microcarcinomas, so it is especially important that the diagnostic and therapeutic tools are applied correctly. Remote



metastases from papillary thyroid microcarcinomas are exceptional, especially in striated muscles, and 18F-FDG PET / CT is an examination with a major role in the evaluation of metastatic disease.

**Study III:** Evaluation of tumor aggressiveness of thyroid microcarcinomas differentiated according to molecular profile.

## 1. Introduction

MicroRNAs are a class of non-coding endogenous RNA molecules 18 to 22 nucleotides in length. MicroRNAs make up only 3% of the human genome but are thought to regulate more than half of the genes that encode proteins. Mature microRNA can promote or inhibit the translation and degradation of messenger ribonucleic acid (mRNA) by targeting with complementary precision sequences in the 3' untranslated regions (3'UTR). They act both as post-transcriptional regulators of gene expression and as intercellular messengers or signalers. MicroRNAs are involved in central biological processes, including development, organogenesis, tissue differentiation, cell cycles, and metabolism. Changes in microRNA expression contribute to the pathogenesis of most human malignancies, including PTC.

## 2. Working hypothesis

The most common form of endocrine cancer - thyroid papillary carcinoma, has a growing incidence. Although this disease usually has an indolent behavior, there are cases when it can evolve more aggressively. It has been known for some time that it is possible to use microRNAs for the diagnosis, prognosis and even monitoring of the treatment of thyroid papillary cancer. The aim of this study is to summarize the latest information provided by publications on the involvement of microRNAs in thyroid papillary cancer, highlighting the new clinical perspectives they offer.

## 3. Material and method

A literature review was performed using PubMed, for studies published from 2018 to June 2020. The following keywords were used for the search: "microRNA" + "papillary" + "thyroid" + "carcinoma", which resulted in 466 articles in English. All related abstracts were reviewed and the relevant studies, published in English, were selected. We included only the documents that had the full text available and the studies that described the exact method and results regarding the involvement of microRNA in the epigenetic mechanism of CTP. A selection of 137 eligible items was the result of a search. Data on microRNAs, source of samples, microRNA regulation, microRNA target genes / proteins, and their effect on CTP cells from the 137 studies were selected and synthesized in the database.

## 4. Results

Of the 139 microRNAs studied, 106 are underregulated and 33 are overregulated. This means that almost a quarter of the described microRNAs have an oncogenic role (oncomiR) and the rest have a tumor suppressor role. Disorder of microRNAs is an important event during the development of papillary thyroid carcinoma. Overexpression of certain microRNAs may have the effect of suppressing tumor suppressor genes.

Analyzing individually, in each study, the interaction between microRNAs and the genes they target, we found that the same gene can be targeted by different microRNAs.

A microRNA targets not just one, but several mRNAs / genes, as stated earlier. In our research, we identified several microRNAs targeting multiple genes simultaneously. For example, microRNA-146b-5p, reduced the expression of the CCDC6 gene by binding to 3'UTR, in the study of Jia M et al., and promoted the expression of the MALAT1 gene by negative regulation of DNMT3A, in the study of Peng et al. The same microRNA-146b, but with the 3p end in the opposite position to the 5p end which is present in the forward position (5'-3'), i.e. microRNA-146b-3p, directly targets the NF2. gene of the same family, microRNA-146a targets the GABPA gene and microRNA-146 targets the KIT gene.

## 5. Discussions

Each microRNA can regulate hundreds of messenger RNAs (mRNAs), but at the same time, different microRNAs can control the same mRNA. In addition, many microRNAs regulate and are regulated by other non-coding RNA species, such as circular RNAs (circRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs). For this reason, it is extremely difficult to predict, study and analyze the precise role of a single microRNA involved in human cancer, given the complexity of its connections. Focusing on a single microRNA molecule is a limited approach. Additional information could come from the analysis of the network, a common tool in the biological field, applied for a better understanding of inter-molecular interactions.

The expression levels of certain microRNAs in thyroid tumor tissue are associated with certain clinicopathological features, such as: tumor size, multifocality, capsular invasion, extrathyroidal extension, lymph node and distant metastases. Treatment options have been proposed and implemented based on the results of research on epigenetic changes. As a result, the development of new therapeutic strategies based on targeting epigenetic changes, by restoring the expression of tumor suppressor microRNAs or by inhibiting overexpressed oncogenic microRNAs, may provide a new landscape for the treatment of aggressive forms of CTP.

These results suggest that circulating microRNAs may be useful as noninvasive molecular biomarkers for the diagnosis and prognosis of mCTP, selecting those cases that require aggressive therapies, despite mCTP histology. Given the need for more studies in this field, this topic could be a research idea for the future in the age of personalized medicine.

## 6. Conclusions

Research on microRNAs in PTC is undergoing exceptional changes, suggesting the accelerated maturation of this field. In this paper, we tried to represent, as succinctly as possible, the interactions of microRNAs with target proteins. We also showed how microRNAs regulate and their effect on PTC cells. Our results showed that a gene can target multiple microRNAs simultaneously and vice versa. All this information can be used to identify the most effective therapeutic targets / biomarkers in PTC. For future research, we have indicated a possible niche, namely microRNA signatures in PTMC.

