

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

TEZĂ DE DOCTORAT

Studiul factorilor genetici implicați în susceptibilitatea, prognosticul și tratamentul leucemiei acute mieloide

Doctorand **Florin Tripon**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Claudia Bănescu**

TÂRGU MUREȘ 2022



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ,
FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE”
DIN TÂRGU MUREȘ

Introducere

Leucemia acută mieloidă (LAM) este o afecțiune hematologică malignă. Din punct de vedere clinic, fenotipic și genetic LAM este o afecțiune foarte heterogenă. Progresul în ceea ce privește înțelegerea patogenezei, a metodelor de diagnostic, de stratificare a riscului, de predicție a prognosticului și mai ales de terapie țintită este continuu și nu va înceta, mai ales din punct de vedere genetic. Din păcate, la modul general, prognosticul pacienților cu LAM în continuare este unul rezervat, rata de supraviețuire fiind scăzută. Aceste lucruri demonstrează necesitatea continuării studiilor din domeniu în vederea identificării unor factori implicați în susceptibilitatea, prognosticul și tratamentul LAM.

Obiective

Obiectivele studiilor efectuate au fost de a identifica existența unor asocieri dintre anumite polimorfisme mononucleotidice (SNP-uri) și susceptibilitatea, prognosticul, tratamentul pacienților cu LAM. De asemenea, ne-am propus să identificăm existența unor asocieri dintre SNP-urile investigate, alte anomalii genetice și parametri cu semnificație clinică în LAM. Un alt obiectiv a fost de a evalua utilitatea multiplelor tehnici de investigare genetică și de a contura un protocol de testare genetică adaptat în funcție de infrastructura existentă în laboratoarele din România.

Studiul 1. Asocierea polimorfismului *XPC Val499Ala* cu susceptibilitatea pentru LAM

În acest studiu am inclus 140 persoane în grupul control și 149 pacienți. Pentru genotipare am utilizat reacția de polimerizare în lanț bazată pe tehnica polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (PCR-RFLP). Am identificat o asociere dintre genotipurile cu alela variantă, susceptibilitatea pentru LAM și statusul de fumător. Nu s-au identificat asocieri cu alte variabile clinice, cu rata de supraviețuire a pacienților sau cu mutațiile somatice analizate.

Studiul 2. Evaluarea efectelor unor polimorfisme ale genei *MCM7*, a mutațiilor somatice și a unor parametrii clinici în susceptibilitatea și prognosticul LAM

În acest studiu am inclus 405 persoane în grupul control și 281 pacienți. Pentru genotipare am utilizat tehnica real-time PCR. Varianta alelică a rs2070215 și haplotipul CAT (alelele SNP-urilor *MCM7* rs2070215, rs1527423 și rs1534309), au fost asociate cu susceptibilitatea pentru LAM. Mutațiile somatice investigate [*FLT3*-ITD și D835, *DNMT3A* R882 și *NPM1* (mutațiile de tip A-D)] au fost asociate cu un nivel crescut al Lactat dehidrogenazei (LDH), cu un procent mare al blastilor și cu un număr mare de leucocite. Dintre caracteristicile clinice și biologice ale pacienților [vârsta la diagnostic peste 65 de ani, scor de risc nefavorabil și intermediar European LeukemiaNet (ELN), prezența mutațiilor *FLT3*, *DNMT3A*, scorul de performanță al Grupului Estic de Cooperare Oncologică (ECOG) ≥ 2 , numărul leucocitelor ≥ 10000 celule/mm³, nivelul LDH ≥ 600 UI/L, toate asociate cu rata de supraviețuire scăzută] doar nivelul LDH ≥ 600 UI/L a fost asociat cu un risc crescut de deces iar această asociere a rămas semnificativă indiferent de prezența sau absența mutațiilor genei *FLT3* (ITD, D835).

Studiul 3. Asocierea polimorfismului *TERT rs2853669* cu rata de supraviețuire a pacienților cu LAM

În acest studiu am inclus 363 persoane în grupul control și 146 pacienți. Pentru genotipare am utilizat tehnica real-time PCR. Polimorfismele *TERT* rs2853669 și rs2736100 nu sunt factori de risc pentru dezvoltarea LAM. Prezența genotipurilor cu varianta alelică *TERT* rs2853669 au un efect negativ asupra ratei de supraviețuire a pacienților cu LAM în prezența altor factori de prognostic cunoscuți.

Studiul 4. Analiza asocierilor dintre polimorfismelor genice *TP53 rs1042522*, *MDM2 rs2279744*, *rs3730485*, *MDM4 rs4245739* și susceptibilitatea pentru LAM, scorurile de stratificare a riscului și aspectele clinice ale pacienților

În acest studiu am inclus 406 persoane în grupul control și 403 pacienți. Pentru genotipare am utilizat tehnica real-time PCR și tehnica bazată pe amplificarea refractară (ARMS-PCR). Polimorfismele *TP53* rs1042522 și *MDM4* rs4245739 sunt asociate cu susceptibilitatea pentru LAM. Polimorfismele *MDM2* rs2279744 și *TP53* rs1042522 interacționează și cresc riscul pentru LAM. Genotipurile cu varianta alelică a *TP53* rs1042522 au fost asociate cu scorul de risc molecular și citogenetic nefavorabil și cu prezența mutației *NPM1* (tip A-D).

Studiul 5. Rolul polimorfismelor rs361525, rs1800750, rs1800629, rs1800896, rs1800872, rs1800795, rs1800470 și rs2430561 în LAM

În acest studiu am inclus 406 persoane în grupul control și 226 pacienți. Pentru genotipare am utilizat tehnica real-time PCR și ARMS-PCR. Am identificat faptul că genotipurile cu varianta alelică a *TGF-β1* rs1800470 și *IFN-γ* rs2430561 sunt asociate cu susceptibilitatea pentru LAM. Vârsta pacienților la diagnostic peste 65 de ani, numărul de trombocite, genotipul variant al *TNF-α* rs1800750, procentul de blasti din măduva osoasă > 70%, nivelul crescut de LDH (≥ 600 UI / L) și scorul de risc citogenetic nefavorabil pot fi să fie utilizați ca factori de risc independenți pentru evaluarea mortalității la pacienții cu LAM.

Conturarea un protocol de testare genetică adaptat în funcție de infrastructura laboratoarelor din România.

Analiza citogenetică rămâne de primă intenție iar hibridizarea genomică comparativă prin tehnica microrețelelor (arrayCGH) dacă este disponibilă este recomandată a se efectua. În lipsa arrayCGH, tehnica Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) are utilitate în cazul LAM, în studiile noastre identificând modificări genetice la 31,8% dintre pacienți. Reacția de polimerizare în lanț cu revers transcriere dependentă de ligare (LD-RT-PCR) a identificat fuziuni genice la 25% dintre pacienți. Tehnica MLPA și LD-RT-PCR implică costuri reduse și timp de execuție de aproximativ 24-48 ore. Analiza de secvențiere de nouă generație (NGS) efectuată la pacienții incluși în studiile noastre a identificat în medie 22 de variante genice/caz, costurile rămân ridicate iar interpretarea rezultatelor necesită mult timp. Toate aceste tehnici sunt utile pentru pacienți, fiecare tehnică depășește limitele alteia, însă pentru tehnica NGS ar fi nevoie de strategii naționale precum alegerea unui singur laborator național.

Concluzii (generale)

Dintre cele 18 SNP-uri investigate am obținut asocieri dintre susceptibilitatea pentru LAM și: polimorfismul *XPC* Ala499Val, riscul fiind mai mare la pacienții fumători; *TP53* rs1042522, riscul fiind de 5,64 ori mai mare la pacienții care au avut genotipuri homozigot cu alela variantă pentru *TP53* rs1042522 și *MDM2* rs2279744; *MDM4* rs4245739; *TGF-β1* rs1800470; *IFN-γ* rs2430561 și haplotipul cu alelele CAT al *MCM7* rs2070215, rs1527423 și rs1534309. Asocieri dintre polimorfismele investigate și factorii clinici/paraclinici am obținut pentru: *TERT* rs2853669 asociat cu rata de supraviețuire, fiind un predictor negativ în prezența altor factori de prognostic cunoscuți; *TP53* rs1042522, *IL-10* rs1800896 și *TNF-α* rs1800629 asociate cu scorul de risc ELN 2017 și cu cel citogenetic nefavorabil. Referitor la rata de supraviețuire a pacienților, vârsta la diagnostic mai mare de 65 de ani, numărul mare de leucocite ≥ 10000 celule / mm³, numărul mic de trombocite <40000 celule/mm³, nivelul ridicat de LDH ≥ 600 UI/L, procentul mare de blasti în măduva osoasă sau sânge periferic > 70%, scorul de performanță ECOG ≥ 2 în momentul diagnosticului, scorul de risc citogenetic și ELN 2017 intermediar și nefavorabil, prezența mutației *FLT3* ITD, prezența simultană a mutațiilor *FLT3* ITD/D835 și a mutațiilor *FLT3/DNMT3A*, terapia în doză mică și genotipurile cu alela variantă a *TNF-α* rs1800750 și *TERT* rs2853669 sunt asociate cu rata de supraviețuire scăzută, unii și cu riscul pentru deces, putând fi considerați predictorii ai mortalității.

Originalitatea tezei

Considerăm că următoarele contribuie la originalitatea tezei: studiile publicate de către echipa noastră de cercetare sunt printre extrem de puținele studii din literatură care au reușit să includă peste 400 de pacienți cu LAM, constant creștem numărul de persoane incluse; din cunoștințele noastre nici unul din studiile publicate în literatură nu au investigat simultan polimorfismele menționate, de asemenea nu le-au analizat ținând cont de mutațiile somatice investigate în studiile noastre; pacienții incluși au beneficiat de analize genetice complexe ale căror rezultate au fost interpretate în funcție de datele clinice și paraclinice, scoruri de prognostic, date despre supraviețuire, evoluție, tratament etc., toate aceste informații au fost analizate din punct de vedere statistic, prin metode univariate, analize multivariate, regresii, analize de haplotip, de interacțiuni genice, etc.; metodologia statistică oferă un plus de valoare și originalitate prin faptul că multe din rezultatele studiilor noastre au fost primele publicate în literatură, la nivel internațional, la pacienții cu LAM. O idee inovativă a cercetării efectuate în cadrul tezei constă în adaptarea protocoalelor de testare la infrastructura și finanțarea disponibilă astfel încât pacienții cu LAM investigați să poată fi cât mai corect clasificați și încadrați în clasele de stratificare ale riscului și prognosticului.