

Academia Română
Școala de Studii Avansate a Academiei Române

**FACTORI DE RISC CU RELEVANȚĂ REDUSĂ ÎN FORMELE
SPORADICE DE CANCER DE SÂN**

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Acad. Prof. Univ. Dr. Victor VOICU

DOCTORAND

Medic Remus Iulian NICA

BUCUREȘTI

2021

CUPRINS

I. CANCER DE SÂN - CARACTERIZARE GENERALĂ

Incidență și clasificare

Predispoziția pentru formele sporadice de cancer de sân

II. CERCETARE PROPRIE

II.1. FORME MORFOLOGICE DE CANCER DE SÂN IDENTIFICATE MAI FRECVENT LA PACIENTELE DIN ROMÂNIA

Scop

Materiale și metode

Rezultate

Discuții

Concluzie

II.2. INVESTIGAREA PREDISPOZIȚIEI PENTRU FORMELE SPORADICE DE CARCINOM DUCTAL DIN ROMÂNIA

Scop

Materiale și metode

Rezultate

Discuții

Concluzii

II.3. ANALIZA FACTORILOR CARE POT INFLUENȚA REACTIVITATEA GENOMULUI MURIN LA ACȚIUNEA UNOR DOZE REDUSE DE DOXORUBICINĂ.

Scop

Materiale și metode

Rezultate

Discuții

Concluzii

III. CONCLUZIILE TEZEI

IV. REFERINȚE

FACTORI DE RISC CU RELEVANȚĂ REDUSĂ ÎN FORMELE SPORADICE DE CANCER DE SÂN

I. CANCER DE SÂN - CARACTERIZARE GENERALĂ

Cancerul de sân a devenit una dintre cele mai frecvente boli maligne care apar la femei (Edwards *et al.*, 2005), (Siegel, Miller and Jemal, 2018), (Howlander *et al.*, 2019). Predispoziția pentru această boală este influențată de către diferiți factori genetici și nongenetici (Kadouri *et al.*, 2007), (Parkin *et al.*, 2010), (Desantis, Siegel and Jemal, 2015). Se estimează că 25% din numărul total de cazuri de cancer nou identificate la femeile din România sunt localizate la nivelul sânelor. O parte semnificativă dintre pacientele cu cancer de sân sunt diagnosticate în stadii avansate ale bolii atunci când speranța de viață este scăzută semnificativ iar costurile necesare pentru tratarea ei sunt ridicate.

II. CERCETARE PROPRIE

Cercetarea proprie a fost organizată în următoarele studii principale:

- *I. Forme morfologice de cancer de sân identificate mai frecvent la pacientele din România*

Variabilitatea formelor de cancer mamar a fost puțin investigată în populația din România. În consecință realizarea studiului 1 a fost necesară pentru a obține datele necesare pentru proiectarea și organizarea cercetării (studiului 2) privind predispoziția pentru boală.

- *II. Testarea predispoziției pentru formele sporadice de carcinom ductal invaziv.*

Acest studiu urmărește identificarea factorilor de risc și protectivi asociați cu formele sporadice de carcinom ductal invaziv și stabilirea impactului pe care îl au asocierile acestor factori asupra riscului de boală.

- *III. Analiza factorilor care pot influența reactivitatea genomului murin la acțiunea unor doze reduse de Doxorubicină.*

Unul dintre citostaticele utilizate în terapia cancerului de sân este Doxorubicina. O parte dintre efectele sale citotoxice, genotoxice și pro-apoptotice îi limitează utilizarea în practica medicală. În consecință se încearcă identificarea unor substanțe sau diete care să crească eficiența și să protejeze celulele normale de efectele secundare ale tratamentelor cu citostatice. În acest context studiul 3 a vizat testarea capacității dozelor reduse de Doxorubicină de a induce modificări citogenetice care se pot fixa în celulele care supraviețuiesc expunerii.

II.1. FORME MORFOLOGICE DE CANCER DE SÂN IDENTIFICATE MAI FRECVENT LA PACIENTELE DIN ROMÂNIA

Incidența cancerului de sân prezintă diferențe interpopulaționale și interetnice semnificative (Armstrong and Doll, 1975),(Rivenbark, O'Connor and Coleman, 2013),(Majeed *et al.*, 2014),(Eliassen *et al.*, 2010),(Friebel, Domchek and Rebbeck, 2014). În prezent există puține date referitoare la distribuția principalelor subtipurilor de tumori localizate la nivelul glandei mamare la femeile din țara noastră.

➤ SCOP

Estimarea celor mai frecvente tipuri de proliferări tumorale localizate la nivelul glandei mamare identificate la pacientele din România.

➤ MATERIALE ȘI METODE

Pentru această activitate am revizuit experiența personală și date disponibile în arhivele spitalelor din București (672 cazuri de cancer mamar).

➤ REZULTATE

În acest studiu au fost investigate datele de la 672 cazuri de cancer de sân. Gruparea cazurilor de cancer de sân a indicat că 469 (~ 70%) paciente au avut carcinom ductal invaziv.

➤ DISCUȚII

Analizând experiența personală de 26 ani constat o creștere constantă a numărului de cazuri de cancer de sân / an. Acest aspect este superpozabil pe incidența cazurilor de cancer de sân raportată la nivel național și internațional.

Carcinom ductal invaziv este cel mai frecvent tip de carcinom mamar. Se estimează că acesta reprezintă 47-75% din numărul total de cazuri de cancer mamar.

Studiul realizat a vizat identificarea factorilor care pot influența predispoziția pentru carcinomul ductal invaziv. Din păcate, această analiză a evidențiat că o parte dintre cazurile cu neoplazii mamare se prezintă în stadii avansate, unele dintre ele fiind depășite din punct de vedere oncologic.

➤ **CONCLUZII**

✓ Atât din experiența personală cât și din analiza a 672 cazuri de cancer de sân identificate în arhivele consultate a reieșit că cel mai frecvent tip de cancer mamar este carcinomul ductal invaziv (~70%). În clasamentul frecvenței, pe locul secund, la mare distanță, s-a poziționat carcinomul mixt, ductal și invaziv (~11%).

II.2. INVESTIGAREA PREDISPOZIȚIEI PENTRU FORMELE SPORADICE DE CARCINOM DUCTAL DIN ROMÂNIA

Factorii de risc sau protectivi au în general penetranță redusă în apariția carcinomului ductal invaziv (Momenimovahed and Salehiniya, 2019), (Akram *et al.*, 2017), (Malvia *et al.*, 2017), (Maas *et al.*, 2016). Interacțiunile biologice și statistice dintre acești factori pot ajuta la înțelegerea mai bună a riscului statistic de apariție a bolii sau la identificarea unor subtipuri de boală (endofenotipuri) (Gray *et al.*, 2017),(Ahern *et al.*, 2017),(Frank *et al.*, 2017).

➤ SCOP

În acest studiu s-a investigat predispoziția (componenta genetică și nongenetică) pentru formele sporadice de carcinom ductal invaziv în populația din România.

Obiectivele subordonate acestui scop sunt:

- identificarea factorilor genetici și nongenetici care pot modifica riscul apariției carcinomului ductal invaziv;
- descrierea factorilor sau combinațiilor de factori care pot influența vârsta la care a fost diagnosticată boala;
- identificarea unui model care descrie prezența unor forme sporadice de carcinom ductal invaziv și caracterizarea relațiilor de epistazie statistică dintre factorii care intră în componența sa.

➤ MATERIALE ȘI METODE

În acest studiu de tip caz-control au fost analizate 158 femei cu carcinom ductal invaziv (vârsta medie 60,12±3,05 ani) și 200 femei considerate clinic și paraclinic sănătoase (vârsta medie 59,27±3,82 ani) recrutate din spitale din România. Intervalul de timp cuprins între diagnosticul cancerului de sân și includerea în studiu a fost de 1,92 ani (0-7 ani). Subiecții au fost selectați din regiunea de Sud a României, care este considerată omogenă din punct de vedere: istoric, geografic, lingvistic și genetic (Nica *et al.*, 2020).

Teste de biologie moleculară au vizat genotiparea polimorfismelor ACE ID (rs4646994), AGTR1 A1166C (rs5186), eNOS 4a/b, TGFb C-509T (rs1800469), IL6 G-174C (rs1800795), L-SELL P213S alias C/T (rs2229569) și MTHFR C677T (rs1801133) prin metode bazate pe PCR și RFLP (polimorfismul de lungime al fragmentelor de restricție).

Probele au fost testate pentru a verifica prezența/ absența mutațiilor BRCA1 185delAG, BRCA1 5382insC și BRCA2 6174delT care au penetranță crescută în cancerul de sân. Subiecții pozitivi pentru aceste mutații au fost excluși din studiu.

Identificarea materialului genetic specific virusurilor Torque teno a fost realizată prin hemi-nested PCR.

Prelucrarea statistică a datelor. Testele Chi² și Fisher, testul U al lui Mann Whitney, testul Kruskal-Wallis. ANOVA (ANalysis Of VAriance) și. Analiza post-hoc Tukey HSD (HSD -honestly significant difference) au fost utilizate pentru a compara variabilele de interes din acest studiu. Metoda reducerii dimensiunilor multiple (MDR- multifactor-dimensionality reduction) - a fost utilizată pentru a identifica principalii factori individuali și principalele modele predictive pentru carcinomul ductal invaziv (Moore and Williams, 2002), (Ritchie, Hahn and Moore, 2003), (Uppu, Krishna and Gopalan, 2015), (Milne *et al.*, 2008). Modelele MDR selectate au fost comparate pentru a identifica combinații potențiale de atribute care descriu cel mai bine un fenotip particular de carcinom ductal invaziv (endofenotip).

Diferențele dintre variabile au fost considerate semnificative statistic dacă p a fost <0,05 sau dacă valoarea corectată (metoda Bonferroni) a fost <0,0014.

➤ **REZULTATE**

1. Predispoziția pentru carcinomul ductal invaziv

Investigarea predispoziției pentru carcinomul ductal a presupus parcurgerea a două etape principale: testarea individuală a fiecărui factor de interes și estimarea impactului pe care îl are asocierea acestor factori.

a) *Sarcinile duse la termen* au reprezentat un caracter protectiv important pentru carcinomul ductal invaziv (O.R.= 0,41). Prima sarcină produsă înaintea vârstei de 30 ani a reprezentat un factor protectiv comparativ cu sarcina produsă după această vârstă sau cu absența sa (O.R.=0,20).

b) *Virusurile Torque Teno* - Virusurile TTV (O.R.=3,14) și TTMDV (O.R.=2,64) și coinfectia cu TTV și TTMDV (O.R.=2,73) au fost identificate mai frecvent în lotul de paciente, reprezentând un factor de risc. Datele parțiale obținute (Spandole-Dinu *et al.*, 2018),(BERCA *et al.*, 2021) și ce cele integrale au indicat procentele mai reduse de probe pozitive pentru TTV în lotul de femei sănătoase (51%) comparativ cu valorile prezentate în literatura de specialitate. Cercetările pe care le-am realizate în paralel cu acest studiu nu mi-au permis să stabilesc dacă aceste viruri se pot transmite prin alimente (SPANDOLE-DINU *et al.*, 2020).

c) *Perioada de lactație* - Asocierea dintre carcinomul ductal invaziv și lactație este similară cu cea dintre boală și paritate (O.R.= 0,41). În mod similar pacientele care nu au avut perioadă de lactație (56,33% vs. 34,5%) au avut un risc de boală similar cu cel al nuliparelor (O.R.=2,45). Pentru a se discrimina efectul acestor factori s-a estimat și efectul perioadei totale de lactație. Ea a fost cu ~ 6,59 luni mai redusă la paciente comparativ cu femeile control, diferență care este înalt semnificativă din punct de vedere statistic (13,52 luni vs. 20,11 luni). Procentul pacientelor care au avut mai mult de 12 luni de lactație a fost semnificativ mai redus comparativ cu valorile estimate pentru lotul control (38,20% vs. 58,68%, O.R.=0,27).

d) *Perioada de lactație și virusurile Torque Teno*. Procentul pacientelor care nu au avut lactație și care au fost pozitive pentru virusurile Torque Teno sau coinfecția cu TTV și TTMDV a fost cel puțin dublu comparativ cu cel estimat pentru lotul control ($p < 0,001$).

e) *Polimorfismele genetice*. Distribuția genotipurilor testate în ambele loturi este în concordanță cu condiția de echilibru Hardy-Weinberg.

Analiza combinațiilor de polimorfisme genetice a evidențiat că IL6 GG -TGFB CC (O.R.=34,69) este asociat foarte puternic cu carcinomul ductal invaziv. Tendințe de asociere cu efect opus au fost identificate pentru IL6-174C -TGFB-509T (O.R.=2,48) și ACE D-TGFB TT (O.R. =0,14). Datele pe care le-am obținut (NICA *et al.*, 2019) și unele date din literatură susțin existența unei relații între IL6, TGFB și parodontopatie și pot explica prezența lor în modelele MDR care descriu carcinomul ductal invaziv.

Prezența genotipului eNOS bb și a TTV (O.R.=2,7) sau a IL6 GG și a TTV (O.R.= 2,44) sau TTMDV (O.R.= 2,46) au fost identificate mult mai frecvent în lotul de paciente (O.R.= 2,7). Asocieri cu semnificație statistică mai redusă au fost calculate și pentru combinațiile alcătuite din L-SELL CC și TTMDV (O.R.= 2,09) sau MTHFR T și TTV (O.R.=2,04) sau TTMDV (O.R.=2,1).

f) *Utilizarea anticoncepționalelor orale* de către indivizii purtători de genotip AGTR1 AA (O.R.=0,15, $p=0,0008$) sau IL6 (GG O.R.= 0,22) reprezintă caractere protective pentru carcinomul ductal invaziv.

g) *IMC (indicele de masă corporală) și prima sarcină*. Prima sarcină înainte de 30 ani exercită un efect protectiv important la persoanele supraponderale (O.R.=0,22). Nuliparitatea (O.R.=4,11) în raport cu sarcinile multiple și prima sarcină după vârsta de 30 ani în raport cu cea produsă înainte de 30 de ani (O.R.=5,19) reprezintă factori de risc importanți pentru boală.

În subplotul de femei normoponderale prima sarcină înainte de 30 de ani a fost un important factor protectiv (O.R.=0,19). Nuliparitatea în raport cu prima sarcină dusă la termen după vârsta de 30 de ani (O.R.=5,45) sau prima sarcină după vârsta de 30 de ani în raport cu

cea produsă înainte de 30 de ani (O.R.=4,78) reprezintă factori de risc importanți pentru boală la persoanele normoponderale.

h) *IMC și virusurile Torque Teno*. Pacientele *supraponderale* au fost mai frecvent purtătoare de *TTV* (O.R.=4,89) și *TTMDV* (O.R.=3,04) comparativ cu femeile din sublotul control corespunzător.

i) *Expunerea (activă sau pasivă) la fum de țigară și prima sarcină*. Pacientele au început să fumeze la vârste mai reduse (18,11 an vs. 23,77 ani) și au fumat activ cu ~ 10 ani mai mult (38,52 ani vs. 28,69 ani) comparativ cu femeile control.

De ~4 ori mai multe paciente au început să fumeze înainte de prima sarcină comparativ cu femeile sănătoase (40,58% vs. 9,92%, O.R.= 6,19).

2. Interacțiuni MDR

Analiza întregului lot de subiecți a indicat că modelul MDR care a avut cea mai mare capacitate de predicție a carcinomului ductal invaziv este *TGFb-IL6,sarcina_30 ani, parodontopatie* (O.R.=10,02). În acest model cea mai importantă contribuție individuală a fost atribuită atributului complex IL6-TGFb (12,74%).

Subiecții au fost stratificați utilizând diferite criterii (ex. parodontopatie, status de fumător, paritate, vârsta la care se produce prima sarcină dusă la termen, IMC, utilizarea anticoncepționalelor orale). Rezultatele obținute la analiza acestor subloturi prin metoda MDR au reconfirmat rolul interacțiunii dintre IL6 și TGFb în predicția carcinomului ductal invaziv. În sublotul de subiecți care *nu au avut parodontopatie* cel mai bun model MDR a fost *TGFb_IL-6, sarcină_30_ani_AGTR1, TTV*.

Rezultatele obținute în această activitate sugerează următoarele:

a) analiza MDR poate identifica atribute care sunt utile pentru a discrimina stările identificate în lotul studiat (bolnav vs. sănătos), chiar dacă factorii testați au avut o contribuție statistică redusă la riscul total de boală (ex. modelul MDR *IL6,fumat_pasiv,consum_alcool* identificat la analiza femeilor care au avut *prima sarcină înainte de 30 ani*).

b) modelul MDR *TGFb-IL6,sarcină_30 ani,parodontopatie* are cea mai bună capacitate de identificare a carcinomului ductal invaziv în lotul integral de subiecți.

c) un model MDR particular a fost identificat în cazul persoanelor care au avut *prima sarcină înainte de 30 ani* (modelul *IL6,fumat_pasiv,consum_alcool*). Dacă aceste persoane au fost excluse din analiză, modelul MDR obținut (*alcool,parodontopatie,TGFb_IL6*) a avut o asociere mai puternică comparativ cu cel identificat pentru lotul inițial de subiecți.

d) *modelele MDR care au fost asociate cel mai puternic* cu carcinomul ductal invaziv au fost identificate în subloturile de femei supraponderale (*sarcină_30 ani_TTV, TGFb-IL6, anticoncepționale-eNOS*) sau normoponderale (*TGFb-IL6, sarcină_30 ani, parodontopatia*).

e) datele obținute sugerează că în loturile analizate pot exista unele fenotipuri particulare de carcinom ductal invaziv în care contribuția factorilor de risc și protectivi prezintă unele particularități (ex. IMC, vârsta la care se produce prima sarcină).

3. Factori care pot influența vârsta la care a fost diagnosticat cancerul de sân

a) *Paritatea și vârsta la care s-a produs prima sarcină.* Vârsta la care a fost diagnosticată boala în subloturile de pacientele nulipare (58,29 ani) sau care au avut prima sarcină înainte de 30 ani (58,00 ani) sau după această vârstă (58,14 ani) nu a prezentat diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p > 0,05$).

Vârsta la care a fost diagnosticată boala la femeile nulipare (58,29 ani), unipare, cu sarcină apărută înainte (58,64 ani) sau după (57,84 ani) vârsta de 30 ani, multipare, cu prima sarcină apărută înainte (57,30 ani) sau după (57,56 ani) vârsta de 30 de ani, nu a prezentat diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p > 0,05$).

Intervalul de timp cuprins între vârsta la care s-a produs prima sarcină (unipare: 30,26 ani, multipare: 28,15 ani) și vârsta la care s-a diagnosticat cancerul de sân a fost cu $\sim 2,11$ ani mai redus la pacientele unipare comparativ cu cele multipare (27,79 ani vs. 30,0 ani, $p = 0,02$). Vârsta la care a fost diagnosticat cancerul de sân la unipare cât și la multipare a fost similară (~ 58 ani). Având în vedere aceste rezultate se poate concluziona că intervalul de timp cuprins între prima sarcină și diagnosticul bolii reflectă de fapt vârsta la care a avut loc prima sarcină dusă la termen la cele două categorii de paciente.

b) *Expunerea la fum de țigară în mod activ, pasiv sau mixt (activ și pasiv).*

- Fumatul activ. Compararea datelor înregistrate la fumătorii activi și la nefumători a evidențiat unele diferențe între pacientele analizate. S-a observat că vârsta la care a fost diagnosticată boala tinde să scadă pe măsură ce crește numărul de țigări fumate / zi (ex. paciente fumătoare ≥ 20 țigări/zi vs restul pacientelor: $55,55 \pm 2,13$ vs $58,63 \pm 2,77$ ani).

- Expunerea pasivă, în absența expunerii active la fum de țigară. În sublotul de paciente care nu au fumat activ, expunerea pasivă la fum de țigară a fost asociată cu o reducere cu 2,46 ani a vârstei la care a fost diagnosticat carcinomul ductal invaziv (57,42 ani vs. 59,88 ani). În sublotul de paciente nulipare, care nu au consumat alcool, care au efectuat activități

fizice ocazionale sau regulate și au fost expuse doar pasiv la fum de țigară boala a fost diagnosticată la vârste semnificativ mai reduse.

- Expunerea la fum de țigară (activ sau pasiv). Diferența dintre vârsta la care a fost diagnosticat carcinomul ductal invaziv la pacientele care au fost expuse (activ sau pasiv) comparativ cu cele care nu au fost expuse la fum de țigară a fost de 2,29 ani (57,59 vs. 59,88 ani). Diferențe ceva mai mari între persoanele expuse și cele care nu au fost expuse activ sau pasiv la fum de țigară au fost calculate pentru subloturile de femei nulipare (2,65 ani), care nu consumă alcool (2,34 ani) sau care au desfășurat exerciții fizice ocazionale sau regulate (~3 ani). Aceste rezultate reflectă cel mai probabil impactul stilului de viață asupra vârstei la care este diagnosticată boala.

- Expunerea la fum de țigară activ și pasiv. A fost identificată o diferență de 2,74 ani între vârsta la care a fost diagnosticat cancerul de sân la pacientele expuse atât activ cât și pasiv la fum de țigară și cele care nu au fost expuse (activ sau pasiv) la fum de țigară (57,14 ani vs. 59,88 ani, $p < 0,00001$). Diferența de vârstă a fost asociată cu nuliparitatea (2,97 ani) și cu absența consumului de alcool (2,11 ani).

➤ CONCLUZII

Rezultatele obținute în acest studiu au permis formularea următoarelor concluzii:

a) Principalii factori protectivi pentru carcinomul ductal invaziv identificați au fost:

- ✓ sarcină înainte de 30 ani, la femei sedentare (O.R.=0,14) sau normoponderale (O.R.=0,19);
- ✓ perioada de lactație mai mare de 12 luni (O.R.=0,27);
- ✓ genotipurile AGTR1 AA (O.R.=0,15) sau IL6 GG (O.R.= 0,22) în asociere cu anticoncepționalele orale.

b) Principalii factori de risc pentru carcinomul ductal invaziv au fost:

- ✓ prezența TTV, la persoane nulipare (O.R.=3,44) sau supraponderale (O.R.=4,89);
- ✓ nuliparitatea, la persoane normoponderale (O.R.=5,45) sau supraponderale (O.R.=4,11);
- ✓ prima sarcină dusă la termen după vârsta de 30 ani, la persoane supraponderale (O.R.=5,19) sau care au avut coinfecție cu TTV și TTMDV (O.R.=7,87);

- ✓ persoane sedentare, cu lactație <12 luni (O.R.= 4,67);
- ✓ fumatul activ înainte de prima sarcină (O.R.= 6,19);
- ✓ prezența simultană a genotipurilor IL6 GG și TGFb CC (O.R.=34,69).

c) Modele MDR și starea clinică a subiecților

✓ *TGFb-IL6,sarcină_30ani,parodontopatie* a avut cea mai bună capacitate de discriminare a subiecților din lotul integral de subiecți (O.R.= 10,02);

✓ *modelele MDR care au fost asociate cel mai puternic cu boala au fost identificate în subloturile de femei stratificate în funcție de IMC (supraponderale - sarcină_30 ani_TTV,TGFb-IL6,anticoncepționale-eNOS, O.R.= 17,18; normoponderale - TGFb-IL6,sarcină_30 ani,parodontopatia, O.R.=16,74);*

Aceste date sugerează că în loturile analizate pot exista unele fenotipuri particulare (ex. diferențiate pe baza IMC, vârsta la care se produce prima sarcină, consum alcool, parodontopatie) care au unele particularități la nivel de predispoziție.

d) Vârsta la care a fost diagnosticat cancerul de sân pare să fie asociată cu particularitățile expunerii la fum de țigară. Diminuarea vârstei a fost asociată cu:

- ✓ numărul de țigări fumate (2,25 ani pentru ≥ 15 țigări/zi; 3,08 ani pentru ≥ 20 țigări/zi);
- ✓ expunerea activă **sau** pasivă la fum de țigară (2,29 ani);
- ✓ expunerea activă **și** pasivă (2,74 ani).

II.3. ANALIZA FACTORILOR CARE POT INFLUENȚA REACTIVITATEA GENOMULUI MURIN LA ACȚIUNEA UNOR DOZE REDUSE DE DOXORUBICINĂ.

Doxorubicina (DOX) este unul dintre citostaticele utilizate în terapia cancerului de sân. Efectele citotoxice, aneugene și clastogene (Anderson, Yu and Browne, 1997)(Anderson, Yu and Browne, 1997)(Anderson, Yu and Browne, 1997)(Anderson, Yu and Browne, 1997)(Anderson, Yu and Browne, 1997)(Anderson, Yu and Browne, 1997),(Jain *et al.*, 2005),(Gruber *et al.*, 2005) ale Doxorubicinei și metaboliților săi au fost evidențiate în diferite sisteme de testare sub forma rupturilor ADN (mono- sau dublu-catenare), anomalii cromozomale (numerice sau structurale) (Huynh, Chow and Soo, 2007),(Quiles *et al.*, 2002), (Ashikawa *et al.*, 2004). După oprirea expunerii la citostatic o parte dintre aceste celule pot să supraviețuiască, leziunile ADN pot persista sau se pot amplifica și astfel pot permite recidiva sau evoluția bolii. În consecință efectele pe care le are Doxorubicina asupra celulelor care supraviețuiesc tratamentului sunt de un real interes pentru evoluția clinică ulterioară a pacienților.

➤ SCOP

În acest studiu s-a testat capacitatea unor doze reduse de Doxorubicină de a induce modificări citogenetice.

➤ MATERIALE ȘI METODE

Loturi de animale, condiții de găzduire și hrănire - În acest studiu au fost testate patru grupuri de șoareci BALBc, notate NFI (dietă normală I), NFII (dietă normală II), PGI (dietă hiperlipidică I), PGII (dietă hiperlipidică II). Șoarecii de sex masculin, aveau 6-8 săptămâni în momentul includerii în studiu și greutatea de 21,33 g (16,6- 28,41 g).

Perioada de pre-administrare (zilele 1-7). În prima zi de experiment s-a inițiat dieta specifică pentru fiecare grup de șoareci; aceasta nu s-a modificat în timpul experimentului.

Tratamentul - a fost administrat intraperitoneal (i.p.) la începutul celei de-a 8-a zi din experiment. Administrarea a fost în doză unică și a fost reprezentată de Doxorubicină (1,7 - 7,7 mg / kg corp) sau de soluție salină izotonică (pentru animalele din lotul control).

Urmărirea post-administrare a fost de maxim 7 zile.

Preparatele citogenetice - au fost realizate conform protocolului clasic. Aberațiile cromozomale cuantificate au fost de tip numeric (poliploidia) sau structural (ex. Gap, deleții, translocări, fragmente acentrice, lacune și cromozomi lipicioși).

Analiza statistică a datelor- s-a realizat cu testele Fisher, Chi², Mann-Whitney U Test, ANOVA și analiza post-hoc Tukey. Diferențele au fost considerate semnificative dacă $p < 0,05$.

➤ **REZULTATE**

a) *Modificarea ponderală*

La începutul experimentului greutatea animalelor din cele patru grupuri a fost similară (21,33 g, $p > 0,05$).

În perioada de pre-administrare creșterea ponderală a fost cu aproximativ 50 % mai redusă la șorceii care au primit dietă alternativă (hiperlipidică) ($p < 0,00001$). Diferențe importante au fost observate și în intervalul de timp cuprins între zilele 8-10 ($p < 0,0009$).

Procentul de pierdere în greutate în primele trei zile după administrarea DOX a fost influențat de doza de citostatic și de tipul dietei (grupurile NFI, NFII vs PGI, PGII, $p = 0,003$).

Modificările ponderale înregistrate între zilele 10-14 nu au fost corelate cu doza de citostatic administrată.

b) *Aportul alimentar*

Primele 7 zile de la inițierea experimentului - animalele expuse la o dietă bogată în lipide au avut un consum de alimente cu aproximativ 50% mai mic, comparativ cu animalele care au avut o dietă normală. În cazul animalelor din loturile control, aportul alimentar nu s-a modificat semnificativ, după injectarea serului fiziologic.

În primele 24 ore după administrarea i.p. a tratamentului consumul de alimente a scăzut indiferent dacă șoarecii au avut o dietă normală (cu 75,35%) sau hiperlipidică (cu 64%) comparativ cu ziua precedentă.

În zilele 9 -14 - consumul mediu de alimente/zi înregistrat pentru animalele care au primit hrană normală (NFI, NFII) a crescut semnificativ. O tendință similară a fost observată și în cazul animalelor care au avut dietă hiperlipidică. Aceste rezultate arată că animalele au un comportament alimentar relativ similar după administrarea Doxorubicinei.

c) *Aportul de apă*

Volumul de apă consumat de în primele 7 zile de către animale care au avut o dietă normală și de către cele care au primit o dietă bogată în lipide a fost similar.

În primele 24 ore după administrarea i.p. a tratamentului consumul de apă s-a diminuat cu în cazul șoarecilor care au avut o dietă normală și al celor care au avut o dietă hiperlipemică.

În zilele 9 -14 - consumul de apă a fost asociat cu tipul de dietă și a rămas mai redus comparativ cu perioada preadministrare.

d) *Modificări citogenetice induse de Doxorubicină*

Modificările citogenetice identificate în celulele din măduva osoasă a șoricelilor *BALBc* au fost: delețiile, fragmentele acentrice, translocațiile (Robertsoniene, telomer la telomer, telomer la centromer, interschimburi complexe), tendințe de atracție și rozetare, double minutes, lacune (cromozomale și cromatidiene) și efilările.

S-a observat o corelație lineară negativă între modificarea ponderală și numărul total de aberații citogenetice sau numărul de deleții identificate la trei și la șapte zile după administrarea citostaticului.

Frecvența aberațiilor citogenetice poate să fie influențată de dozele de Doxorubicină utilizate și de interacțiunea lor cu tipul de dietă sau cu perioada de urmărire post-administrare.

Toate dozele de Doxorubicină testate au crescut frecvența poliploidiiilor, delețiilor cromatidiene, fragmentelor acentrice și translocațiilor Robertsoniene, comparativ cu valorile acestor aberații observate în lotul control.

Numărul total de aberații citogenetice, poliploidii și deleții prezintă diferențe semnificative între animalele care au fost tratate cu diferite doze de citostatic.

➤ **CONCLUZII**

Rezultatele obținute în acest studiu au indicat că dozele reduse de Doxorubicină:

- ✓ au un efect mutagen, care pare să nu fie influențat semnificativ de dietă;
- ✓ la 3 și la 7 zile după administrare, frecvența aberațiilor cromozomale crește de câteva ori. Dintre aberațiile citogenetice identificate, frecvența poliploidiiilor și delețiilor a crescut semnificativ. Poliploidizarea identificată postadministrare poate să fie importantă pentru apariția celulelor stem maligne și pentru repopularea cu celule tumorale după tratamentul cu citostatice.

- ✓ frecvența unor aberații citogenetice (ex. fragmentele acentrice, interschimburi complexe) nu a fost corelată cu doza de citostatic;

- ✓ având în vedere rezultatele obținute se poate specula că utilizarea unor doze subclinice de DOX poate să crească frecvența apariției unor aberații cromozomale și heterogenitatea tumorii.

III. CONCLUZIILE TEZEI

Principalele rezultate obținute în cadrul celor trei studii realizate în cadrul acestei lucrări au permis formularea următoarelor concluzii.

➤ **STUDIUL I.** Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu au indicat că cel mai frecvent tip de cancer mamar identificat la pacientele din România carcinomul ductal invaziv.

➤ **STUDIUL II.** *Principali factori protectivi pentru carcinomul ductal invaziv* identificați au fost reprezentați de: o sarcină înaintea vârstei de 30 ani la femei sedentare sau normoponderale, de o perioadă de lactație mai mare de 12 luni sau de utilizarea anticoncepționalelor orale de către femei care sunt purtătoare ale genotipurilor AGTR1 AA sau IL6 GG.

Principali factori de risc pentru carcinomul ductal invaziv au fost reprezentați de: prezența TTV la persoane nulipare sau supraponderale; de nuliparitate (indiferent de IMC), prima sarcină dusă la termen după vârsta de 30 la persoane supraponderale sau care au avut coinfectie cu TTV și TTMDV; de fumatul activ înainte de prima sarcină și de prezența simultană a genotipurilor IL6 GG și TGFb CC.

Modelul MDR - TGFb-IL6,sarcină_30ani,parodontopatie -a avut cea mai bună capacitate de discriminare a subiecților; identificarea unor *modele MDR care au fost asociate mai puternic* cu boala în unele subloturi de paciente sugerează că în cazul carcinomului ductal invaziv pot exista unele subtipuri de boală care au unele particularități la nivel de predispoziție.

Vârsta la care a fost diagnosticat cancerul de sân pare să fie asociată cu particularitățile expunerii active sau pasive la fum de țigară.

Un aspect original identificat în acest studiu se referă la impactul semnificativ pe care îl are coinfectia cu TTV și TTMDV asupra riscului de boală. Designul acestui studiu (caz-control) lasă deschisă întrebarea dacă virusurile Torque Teno au un caracter oportunist sau au un anumit rol în fiziopatologia carcinomului ductal invaziv.

➤ **STUDIUL III** a evidențiat capacitatea unor doze reduse de Doxorubicină de a induce aberații citogenetice în celule din măduva osoasă a șoarecilor BALBc.

Dintre aberațiile citogenetice identificate frecvența poliploidiilor și delețiilor a crescut semnificativ. Aceste aberații pot să crească suplimentar heterogenitatea genetică a celulelor tumorale care supraviețuiesc tratamentului cu citostatice.

În consecință, administrarea unor doze subclinice de Doxorubicină pot permite unor celule cu mutații să supraviețuiască.

IV. REFERINȚE

1. Ahern, T. P. *et al.* (2017) 'Family history of breast cancer, breast density, and breast cancer risk in a U.S. breast cancer screening population', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0801.
2. Akram, M. *et al.* (2017) 'Awareness and current knowledge of breast cancer', *Biological Research*. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
3. Anderson, D., Yu, T. W. and Browne, M. A. (1997) 'The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays', *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. doi: 10.1016/S0165-1218(96)00167-X.
4. Armstrong, B. and Doll, R. (1975) 'Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices', *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.2910150411.
5. Ashikawa, K. *et al.* (2004) 'Evidence that activation of nuclear factor- κ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues', *Biochemical Pharmacology*. doi: 10.1016/j.bcp.2003.08.039.
6. BERCA, L.-M. *et al.* (2021) 'Study on VDR Polymorphism Influence in Associating with Diabetes Mellitus', *Romanian Biotechnological Letters*, 26(1), pp. 2249–2254. doi: 10.25083/rbl/26.1/2249.2254.
7. Desantis, C., Siegel, R. and Jemal, A. (2015) 'Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016', *Surveillance and Health Services Research Program*. doi: 10.1016/B978-1-4377-1757-0.00028-7.
8. Edwards, B. K. *et al.* (2005) 'Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/dji289.
9. Eliassen, A. H. *et al.* (2010) 'Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women', *Archives of Internal Medicine*. doi: 10.1001/archinternmed.2010.363.
10. Frank, C. *et al.* (2017) 'Concordant and discordant familial cancer: Familial risks, proportions and population impact', *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.30583.
11. Friebel, T. M., Domchek, S. M. and Rebbeck, T. R. (2014) 'Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Systematic review and meta-analysis', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/dju091.

12. Gray, J. M. *et al.* (2017) 'State of the evidence 2017: An update on the connection between breast cancer and the environment', *Environmental Health: A Global Access Science Source*. doi: 10.1186/s12940-017-0287-4.
13. Gruber, B. M. *et al.* (2005) 'Relationship between topoisomerase II-DNA cleavable complexes, apoptosis and cytotoxic activity of anthracyclines in human cervix carcinoma cells', *Anticancer Research*.
14. Howlander, N. *et al.* (2019) 'SEER Cancer Statistics Review 1975-2016', *National Cancer Institute*.
15. Huynh, H., Chow, P. K. H. and Soo, K. C. (2007) 'AZD6244 and doxorubicin induce growth suppression and apoptosis in mouse models of hepatocellular carcinoma', *Molecular Cancer Therapeutics*. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0162.
16. Jain, M. *et al.* (2005) 'Restrained molecular dynamics studies on complex of adriamycin with DNA hexamer sequence d-CGATCG', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. doi: 10.1016/j.abb.2005.05.009.
17. Kadouri, L. *et al.* (2007) 'A novel BRCA-1 mutation in Arab kindred from east Jerusalem with breast and ovarian cancer', *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-7-14.
18. Maas, P. *et al.* (2016) 'Breast Cancer Risk From Modifiable and Nonmodifiable Risk Factors Among White Women in the United States', *JAMA oncology*. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1025.
19. Majeed, W. *et al.* (2014) 'Breast cancer: Major risk factors and recent developments in treatment', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.8.3353.
20. Malvia, S. *et al.* (2017) 'Epidemiology of breast cancer in Indian women', *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1111/ajco.12661.
21. Milne, R. I. *et al.* (2008) 'The importance of replication in gene-gene interaction studies: multifactor dimensionality reduction applied to a two-stage breast cancer case-control study', *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgn120.
22. Momenimovahed, Z. and Salehiniya, H. (2019) 'Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world', *Breast Cancer: Targets and Therapy*. doi: 10.2147/BCTT.S176070.
23. Moore, J. H. and Williams, S. M. (2002) 'New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension', *Annals of Medicine*. doi: 10.1080/07853890252953473.
24. Nica, R. *et al.* (2020) 'Distribution of eleven markers in South Romanian (Walachia region) population', *Romania. All rights reserved Rom Biotechnol Lett*, 25(2), pp. 1424–1431. doi: 10.25083/rbl/25.2/1424.1431.

25. NICA, R. *et al.* (2019) ‘Single Nucleotide Polymorphisms in Two Inflammation-Related Genes and Chronic Periodontitis risk in Romanian Adults’, *Romanian Biotechnological Letters*, 24(2), pp. 374–380. doi: 10.25083/rbl/24.2/374.380.
26. Parkin, D. M. *et al.* (2010) ‘Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX’, *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.25517.
27. Quiles, J. L. *et al.* (2002) ‘Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity’, *Toxicology*. doi: 10.1016/S0300-483X(02)00383-9.
28. Ritchie, M. D., Hahn, L. W. and Moore, J. H. (2003) ‘Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity’, *Genetic Epidemiology*. doi: 10.1002/gepi.10218.
29. Rivenbark, A. G., O’Connor, S. M. and Coleman, W. B. (2013) ‘Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine’, *American Journal of Pathology*. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.002.
30. Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2018) ‘Cancer statistics, 2018’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. doi: 10.3322/caac.21442.
31. Spandole-Dinu, S. *et al.* (2018) ‘Prevalence of human anelloviruses in Romanian healthy subjects and patients with common pathologies’, *BMC Infectious Diseases*, 18(1), p. 334. doi: 10.1186/s12879-018-3248-9.
32. SPANDOLE-DINU, S. *et al.* (2020) ‘Torque teno virus was misidentified in meat products from Romania by different methods of detection’, *Romanian Biotechnological Letters*, 25(3), pp. 1581–1586. doi: 10.25083/rbl/25.3/1581.1586.
33. Uppu, S., Krishna, A. and Gopalan, R. P. (2015) ‘A multifactor dimensionality reduction based associative classification for detecting SNP interactions’, in *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*. doi: 10.1007/978-3-319-26532-2_36.