

**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI  
FACULTATEA DE BIOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**STUDIUL UNOR ANOMALII MOLECULARE ȘI  
CITOGENETICE ÎN MIELOMUL MULTIPLU**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Dr. Habil. Dragoș Lucian GORGAN**

**Student-doctorand:**

**Mihaiela Loredana HANGAN (Căs. DRAGOȘ)**

**IAȘI  
2022**



**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI  
FACULTATEA DE BIOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**STUDIUL UNOR ANOMALII MOLECULARE ȘI  
CITOGENETICE ÎN MIELOMUL MULTIPLU**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Dr. Habil. Dragoș Lucian GORGAN**

**Student-doctorand:**

**Mihaiela Loredana HANGAN (Căs. DRAGOȘ)**

**IAȘI  
2022**

## MULȚUMIRI

La finalizarea acestei teze de doctorat a contribuit o echipă de oameni deosebiți care m-au sprijinit moral și profesional și cărora doresc să le mulțumesc și să le aduc recunoștința mea.

În primul rând doresc să-i mulțumesc conducătorului științific al tezei de doctorat, Profesor universitar abilitat Lucian Gorgan care cu multă răbdare m-a coordonat și susținut, în procesul de elaborare și finalizarea a acestei teze.

Mulțumesc membrilor Comisiei de Îndrumare: Prof. univ. dr. habil. Lucian Hrițcu, Șef lucr. dr. Mirela-Mihaela Cîmpeanu și Șef lucr. univ. dr. Cristian Tudose pentru disponibilitate și sugestiile oferite pe parcursul studiilor doctorale.

De asemenea, doresc să adresez respectuoase mulțumiri membrilor comisiei de Referenți pentru amabilitatea de a analiza această lucrare.

Mulțumiri sunt adresate și colectivului Laboratoarelor de Analiza medicale al Institutului Regional de Oncologie care m-a ajutat, susținut și îndrumat pe întreg parcursul doctoratului. În special menționez colectivul departamentelor de Diagnostic molecular, Citogenetică și Imunofenotipare cărora le mulțumesc pentru înțelegere și răbdare.

Totodată, adresez mulțumiri medicilor departamentului de Hematologie al Institutului Regional de oncologie, Iași care m-au sprijinit cu datele clinice care au stat la baza acestui studiu.

Și nu în ultimul rând mulțumesc familiei mele care m-a susținut mereu și mi-a fost alături cu răbdare și dragoste necondiționată pe tot parcursul scolii doctorale motiv pentru care le dedic această lucrare.

## CUPRINSUL TEZEI

LISTĂ DE ABREVIERI

INTRODUCERE

MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Capitolul 1. MIELOMUL MULTIPLU

1.1. Definiție, clasificare și prevalență

1.2 Etiologia mielomului multiplu

1.3. Mecanisme celulare și moleculare în Mielomul Multiplu

1.4 Evaluarea imunofenotipică a plasmocitelor

1.5. Tratamentul Mielomului Multiplu

Capitolul 2: MATERIAL ȘI METODE

2.1 Lotul de studiu

2.1.1 Lot de studiu- IMUNOFENOTIPARE

2.1.2 Lot de studiu- MLPA

2.1.3 Lot de studiu- SNParray

2.1.4 Lot de studiu- CARIOTIP și FISH

2.2 Metode

2.2.1 Imunofenotipare prin citometrie în flux

2.2.2 Sortarea plasmocitelor prin flowcitometrie

2.2.3 Sortarea plasmocitelor cu bile magnetice

2.2.4 Extracția și cuantificarea acizilor nucleici

2.2.5 Tehnica MLPA -kitul P0425-B2 pentru Mielom Multiplu

2.2.6 Analiza SNP-array în Mielomul Multiplu

2.2.7 Analiza cromozomială standard Cariotip și tehnica FISH

2.2.8 Analiza statistică

## Capitolul 3: REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 3.1 Rezultate și discuții – IMUNOFENOTIPARE

### 3.2 Rezultate și discuții- MLPA

### 3.3 Corelarea rezultatelor obținute în urma analizelor: MLPA și imunofenotipare

### 3.4 Rezultate și discuții - SNParray

### 3.5 Rezultate și discuții - CARIOTIP și FISH

## CONCLUZII

## BIBLIOGRAFIE

### ANEXA 1

### ANEXA 2

### ANEXA 3

## LISTA DE ABREVIERI

Abreviere	Semnificație
<b>MM</b>	<i>Multiple myeloma</i> -Mielom Multiplu
<b>NGS</b>	<i>Next generation sequencing</i> -Secvențiere de ultimă generație
<b>SNParray</b>	<i>Single nucleotid polymorphism array</i> – Microrețea cu sonde polimorfice de tip SNP
<b>aCGH</b>	<i>Comparative genomic hybridization array</i> - Hibridizare genomică comparativă cu sonde nonpolimorfice
<b>ISH</b>	<i>In situ hybridization</i> -Hibridizare in situ
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> - Hibridizare in situ cu sonde fluorescente
<b>BM</b>	<i>Bone marrow</i> -Măduvă osoasă
<b>BMSC</b>	<i>Bone marrow-derived stem/stromal cells</i> - Celulele stem ale măduvei hematopoietice
<b>ADN</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Acid dezoxiribonucleic
<b>ARN</b>	<i>Ribonucleic acid</i> -Acid ribonucleic
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> - Celule stem hematopoietice
<b>NK</b>	<i>Natural Killer Cell</i> - Celule NK
<b>SMM</b>	<i>Smoldering Multiple Myeloma</i> - Mielom Multiplu indolent/asimptomatic
<b>MGUS</b>	<i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> - Gamopatie de origine necunoscută
<b>BAC</b>	<i>Bacterial artificial chromosome</i> - Cromozom artificial bacterian
<b>B2-mg</b>	<i>Beta 2 Microglobulin</i> - B2-microglobulina
<b>CSR</b>	<i>Class-Switch Recombination</i> - Rearanjări genice cu comutare aberantă de clasă
<b>CRAB</b>	<i>C- hypercalcemia</i> - hipercalcemie, <i>R- renal failure</i> - afectare renală, <i>A- anemia</i> - anemie, <i>B- bone disease</i> - leziuni osoase
<b>EPO</b>	Eritropoietina
<b>g</b>	Grame
<b>HRD</b>	<i>Hyperdiploid</i> - Hiperdiploid

<b>Ig</b>	Imunoglobulină
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like growth factor I</i> -Factorul 1 de inhibiție a creșterii asociat insulinei
<b>IGH</b>	<i>Immunoglobulin heavy chain</i> -Lanț greu de imunoglobulină
<b>IL-..</b>	Interleukina ...
<b>IL-3</b>	Interleuchina 3
<b>IL-5</b>	Interleuchina 5
<b>Mg</b>	Miligrame
<b>TPO</b>	Trombopoietina
<b>IMWG</b>	International Myeloma Working Group
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> - Amplificarea multiplă a sondelor ligaturate
<b>PCL</b>	<i>Plasma cell leukemia</i> - Leucemie cu plasmocite
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reacția de polimerizare în lanț
<b>RT</b>	<i>Reverse transcription</i> - Revers transcripție
<b>R-ISS</b>	<i>Revised International Staging System</i>
<b>TGFB-1</b>	<i>Transforming growth factor beta 1</i> - Factor de creștere și transformare beta-1
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> - receptorul pentru factorul de necroză tunorală
<b>VEGFA</b>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> - Factorul de creștere endotelial vascular
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>FLC</b>	<i>Free light chain</i> - Lanțuri ușoare libere
<b>CNV</b>	<i>Copy number variation</i> -Variație a numărului de copii ADN pentru o anumită regiune cromozomială
<b>CNA</b>	<i>Copy number alteration</i> - Anomalie a numarului de copii ADN
<b>Chr</b>	<i>Chromosom</i> - Cromozom

## INTRODUCERE

Evoluția geneticii și în special a citogeneticii a avut un impact major asupra înțelegerii bolilor hematologice. Începând cu descoperirea cromozomilor plantelor în 1875 și continuând cu descoperirea cromozomilor umani în 1879 (Arsham et al., 2017) care au deschis ușile spre noi orizonturi și până la tehnicile de ultimă generație precum NGS și SNP-array au dus la conturarea tot mai exactă a tabloului evoluției celulare și respectiv a afecțiunilor hematologice.

Mielomul multiplu (MM) a fost cunoscut încă din antichitate, dar, abia la începutul secolului al XIX-lea, apar rapoarte de caz despre „mollii ossium” care pun accentul asupra leziunilor osoase caracteristice pentru ceea ce ulterior a devenit cunoscut ca MM. Cel mai bine documentat caz este acela al lui Thomas Alexander McBean, un comerciant foarte respectabil din Londra (1845), în cazul căruia, patologul Henry Bence Jones și consultantul clinic William Macintyre au descris o formă nouă de proteinurie asociată cu fragmente osoase și fracturi patologice. Această proteinurie a devenit cunoscută sub numele de proteina Bence Jones. Pacienții cu „mollii ossium” și proteinurie Bence Jones au murit în doar câțiva ani de la diagnosticare, adesea după tratamente inutile cu remedii nespecifice cum ar fi chinina, rubarba, coaja de portocală, și sărurile de fier (Kyle et al., 2011, Steensma et al., 2018).

În 1939 Longsworth și colaboratorii au introdus în studiul MM electroforeza proteinelor și au demonstrat că astfel se poate pune în evidență, la nivel seric, excesul de imunoglobuline monoclonale (Ribatti, 2018).

În ultimele decenii, citogenetica moleculară a realizat un mare salt tehnologic oferind cercetătorilor posibilitatea de a vizualiza concomitent pierderea sau câștigul de material genetic în întreg genomul, la o rezoluție fără precedent. Astfel, în 1990 sunt implementate microrețele CGH (hibridizarea genomică comparativă) cu sonde non-polimorfice (aCGH) urmată de microrețele SNP („single nucleotide polimorfism”) cu sonde polimorfice (SNParray) (Sherry et al., 2001, Ylstra et al., 2006, Smetana et al., 2011, Lockwood et al., 2006).



## SCOPUL STUDIULUI

**Scopul** tezei este identificarea unor markeri moleculari și citogenetici utili în diagnosticarea timpurie a pacienților cu MM și optimizarea monitorizării cazurilor aflate sub tratament, prin selectarea testelor moleculare și citogenetice adecvate diferitelor etape de tratament.

### Capitolul 1. MIELOMUL MULTIPLU

#### 1.1. Definiție, clasificare și prevalență

MM (boala lui Kahler), o neoplazie a limfocitelor B, ce rezultă din proliferarea accelerată a plasmocitelor atipice care se acumulează la nivelul măduvei osoase (Danaila et al., 2011, Firth, 2019). Aceste celule atipice produc/secretă imunoglobuline (Ig) sau o subunitate polipeptidică a Ig, de un singur tip ce este determinată ulterior sub forma unei proteine monoclonale (proteina-M) în ser sau urină (Remily-Wood et al., 2014, Tathineni et al., 2020).

Principalele elemente care alcătuiesc tabloul clinic al pacientului cu MM sunt: hipercalcemia (C), afectarea renală (R), anemia (A), boala osoasă (B) -pe scurt CRAB (Padala et al., 2021). La care se adaugă afectarea neurologică (Egan et al., 2020, Smith et al., 2019), infecții bacteriene recurente și persistente și hipervâscozitate (Blimark et al., 2015).

Etapele progresiei MM sunt: gamopatia cu semnificație necunoscută (MGUS), mielomul multiplu indolent/asimptomatic (SMM), mielomul multiplu (MM) propriu-zis și ultima fază și cea mai gravă este leucemia cu plasmocite (Maura et al., 2020).

MM este pe locul doi în ceea ce privește incidența afecțiunilor hematologice maligne (Kazandjian, 2016). Conform datelor publicate de NIH (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>, 2022) MM reprezintă 1,8% din totalitatea cancerelor (Padala et al., 2021). Anual sunt diagnosticate aproximativ 34 470 de cazuri noi iar mortalitatea la 5 ani este de 57%. Incidența este mai mare în Europa de Vest,

America de Nord și Australia față de Asia și Africa sub-Sahariana cel mai probabil datorită accesului limitat la un diagnostic diferențiat în aceste zone (van de Donk et al., 2021).

Vârsta medie la diagnostic este de 66-70 ani (în funcție de studiu) (Kyle et al., 2003). În ceea ce privește diferența dintre bărbați și femei studiile sunt contradictorii (Callander et al., 2022). Incidența MM se pare a fi de 2-3 ori mai mare în cazul persoanelor de rasă neagră versus albă dar este mai scăzută la asiatici și la hispanici (Kumar et al., 2017)

Conform Myeloma Euronet România în anul 2020 au fost diagnosticate 500 cazuri noi.

## 1.2. Anomalii moleculare și citogenetice recurente

MM rezultă din acumularea unor alterări cromozomiale de-a lungul evoluției liniei de limfocite B (de Moraes Hungria et al., 2018).

Chattopadhyay și colab. a evidențiat pe un număr de 3999 pacienți 16 *loci* ce interacționează și ar putea avea rol în transmiterea familială a unei predispoziții către această afecțiune (Chattopadhyay et al., 2019).

Translocațiile ce implica gena IGH (imunoglobulin heavy chain) localizată în poziția 14q32 sunt considerate evenimente inițiale în patogenia MM (Duek et al., 2019). Alte anomalii importante sunt trisomiile cromozomilor impari, rearanjarile genei MYC, deleția de 1p, amplificarea de 1q, deleția parțială sau monosomia cromozomului 13, deleții la nivelul cromozomului 14 și deleția de 17p (Gay et al., 2019).

Primele evenimente în MM pot fi grupate în două subtipuri: (i) hiperdiploide (HRD) și (ii) nonhiperdiploide. Prima categorie este caracterizată prin trisomii ce implică cromozomii impari : 3, 5, 7, 9, 11, 15,17, 19 și/sau 21. A doua categorie are ca și trăsătură predominantă prezența translocațiilor genei IGH în principal: t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) și t(14;20) (Cowan et al., 2022).

Există numeroase evenimentele necesare evoluției tumorale, cum ar fi: marea majoritate a variațiilor numărului de copii ale secvențelor de ADN (CNV/CNA), translocațiile ce implică gena MYC și mutațiile somatice în MAPK, NFκB și căile de reparare ale ADN ce sunt întâlnite doar în etapa de MM și nu și în etapele premaligne fiind considerate evenimente secundare (Manier et al., 2016).

Mieloamele hiperdiploide au fost asociate cu un prognostic bun spre deosebire de cele non-hiperdiploide (Avet-Loiseau et al., 2012). Acest lucru s-ar putea datora acțiunii

unor gene supresoare de tumoră sau sensibilității la terapie (Kumar et al., 2012). Pacienții cu MM hiperdiploid care au și anomalii structurale, de obicei dezvoltă o formă mai agresivă a bolii, ce implică translocații IGH și/sau duplicația brațului lung al cromozomului 1 (Carrasco et al., 2006, Chng et al., 2006).

MM hipodiploide (cu mai puțin de 48 de cromozomi) și cele aproape tetraploide (cu mai mult de 75 de cromozomi) sunt asociate cu o rată de supraviețuire foarte mică (Hocor et al., 2012, Smadja et al., 2001).

## Capitolul 2: MATERIAL ȘI METODE

### 2.1 Lotul de studiu

În perioada decembrie 2017-decembrie 2021, în urma examenului clinic, în cadrul Institutului Regional de Oncologie, Iași, 343 pacienți au ridicat suspiciunea de MM (și au acceptat să fie introduși în acest studiu).

În urma analizelor clinice și de laborator pentru 45 pacienți s-a confirmat diagnosticul de MGUS, 13 plasmocitom solitar, 27 leucemii cu plasmocite și 102 cu alte diagnostice. Pentru 156 pacienți a fost confirmat diagnosticul de Mielom Multiplu.

Toți pacienții au semnat consimțământul informat. Studiul a avut aprobarea comisiei de etică a Institutului Regional de Oncologie, Iași.

Factorii care au împiedicat evaluarea corectă și completă a plasmocitelor atipice din aspiratul medular sunt: „*patchy disease*” (distribuția neuniformă a plasmocitelor la nivelul măduvei hematogene), hemodiluția, diversitatea clonală și boala extramedulară.

#### 2.1.1 Lot de studiu- IMUNOFENOTIPARE

Din cei 156 pacienți diagnosticați cu MM doar pentru 143 s-a putut realiza diagnosticarea prin imunofenotipare, 13 probe fiind coagulate și deci neconforme. 72 au fost bărbați și 71 femei. Media de vârstă a fost de 66 ani variind între 39 și 87 ani.

#### 2.1.2 Lot de studiu- MLPA

Pentru realizarea analizei MLPA s-au aplicat următoarele criterii de includere: infiltratul de PC în măduvă, conform analizei citologice, să fie mai mare de 10%; infiltratul de PC evaluat prin flowcitometrie să fie mai mare de 1,5% și toți pacienții să fie diagnosticați cu MM activ. De asemenea, s-au exclus toți pacienții care au decedat imediat după diagnosticare fără să fie implementat niciun tratament. Astfel au rămas 107 pacienți (Tabel 1).

Tabel 1- Caracteristicile grupului studiat

	n	
Pacienți cu MM	n=107	
Vârsta medie la diagnostic	65	Variază între 39-87 ani
Vârsta <60	29	27.1%
Vârsta 60-70	44	41.1%
Vârsta >70	34	31%
<u>Sex</u>		
Bărbați	51	47.66%
Femei	56	52.33%
<u>Stadiu ISS</u>		
1	21	19.6%
2	39	36.4%
3	47	43.9%
<u>Tratament</u>		
VCD	74	69.1%
Alte terapii	33	30.8%
Transplant autolog	30	40.5%

### 2.1.3 Lot de studiu- SNParray

Pentru 50 pacienți s-a realizat analiza SNParray pentru a evidenția anomaliile numărului de copii ADN (CNAs) suplimentare celor detectate prin MLPA. 20 (40%) au fost bărbați și 30 (60%) femei. Vârsta medie a grupului analizat a fost de 67 ani.

### 2.1.4 Lot de studiu- CARIOTIP și FISH

În perioada decembrie 2017-ianuarie 2022 156 probe de la pacienți diagnosticați cu MM s-au adresat departamentului de citogenetică din cadrul IRO Iași în vederea realizării analizei CARIOTIP. Dintre acestea 46 au avut indice mitotic 0, 85 au fost cu 46XX/46XY, 3 au prezentat anomalii numerice și structurale neanalizabile și pentru 22 metafazele au prezentat anomalii cromozomiale.

Pentru a confirma diverse anomalii s-a utilizat tehnica FISH în 13 cazuri.

## 2.2 Metode

### 2.2.1 Imunofenotipare prin citometrie în flux

Citometria în flux reprezintă o analiza multiparametrică ce permite caracterizarea celulelor din punct de vedere a proteinelor membranare numite clustere de diferențiere (CD).

Metoda este utilizată cu succes în imunofenotiparea probelor provenite de la pacienții cu MM inclusiv a plasmocitelor normale și atipice. În Tabelul 2 este prezentat întreg panelul de anticorpi utilizați. Acesta este împărțit în două tuburi. În Tabelul 3 sunt prezentate diferențele de expresie a anticorpilor la nivelul plasmocitelor normale versus anormale.

Tabelul 2: Panelul utilizat în imunofenotiparea Mielomului Multiplu

Nr Tub	FITC	PE	PC5	PC7	APC	AC7	PB	PO
1	CD38	CD56	Cy-beta2m(4)	CD19	Kappa (3)	Cy-lambda(3)	CD45	CD138
2	CD38	CD28(5)	CD27(3)	CD19	CD117	CD81	CD45	CD138

Tabelul 3. Profilul normal/anormal de expresie a markerilor fenotipici

CD	NORMAL	ATIPIC
CD19	+	-
CD56	-	+/-
CD27	+	-
CD28	-	+
CD81	+	-
CD117	-	+/-
CD45	+	-
CD38	+	+
CD138	+	+

Panelul de anticorpi utilizați este în concordanță cu recomandările EuroFlow EuroFlow (Roshal et al., 2017, Flores-Montero et al., 2016).

Probele au fost analizate cu ajutorul citometrelor Navios (Beckman Coulter) și FACS ARIA III (Becton Dickenson) – 3 lasere, 10 culori, din cadrul laboratorului TRANSCENT, al Institutului Regional de Oncologie, Iași. O medie de 100,000 celule a fost achiziționată pentru fiecare tub/probă analizată. Citometrul a fost calibrat și monitorizat zilnic conform cu recomandările producătorului și standardelor EuroFlow (Kalina et al., 2012, Glier et al., 2019). Pentru analiza datelor, fișierele (.fcs or .lmd) au fost prelucrate utilizând softul Infinicyt 1.8 software (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Plasmocitele au fost evidențiate prin selectarea populației pozitive pentru CD38 și CD138. Un prag (*threshold*) de 10% a fost

aplicat pentru ca un CD să fie considerat pozitiv la nivelul plasmocitelor, excepție s-a făcut în cazul CD19 unde threshold-ul a fost setat la 50% (Paiva et al., 2017b).

### 2.2.3 Sortarea plasmocitelor cu bile magnetice

Îmbogățirea probelor prin citometrie în flux a ridicat diverse probleme și prin urmare s-a optat pentru sortarea plasmocitelor cu bile magnetice marcate cu anticorpi anti-CD138 (ProtocolCD138MicroBeads, Shin et al., 2012, Bansal et al., 2021).

Prima etapă a acestui proces constă în separarea celulelor mononucleate-BMMC/PBMC (*bone marrow mononuclear cells/peripheral blood mononuclear cells*) prin gradient de densitate cu Ficoll (Hystopaque). Peletul celular astfel obținut se incubează cu bilele magnetice ce marchează celulele CD138+. După marcarea, suspensia celulară s-a transferat pe o coloană de separare și a fost expusă unui câmp magnetic. În ultimă instanță celulele marcate sunt eluate de pe coloană (ProtocolCD138MicroBeads),

S-a utilizat kit-ul CD138 MicroBeads, human de la Miltenyi Biotec, iar plasmocitele separate s-au utilizat la izolarea ADN.

După sortare s-a realizat verificarea procentului de plasmocite izolate prin marcarea cu CD138 și CD38. S-a reușit ridicarea procentului de plasmocite atipice de la valori de 5-6% până la 87%.

### 2.2.4 Extracția și cuantificarea acizilor nucleici

#### Extracția ADN

S-a realizat cu ajutorul kit-ului Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA). Principiul de bază constă în precipitarea ADN-ului genomic cu izopropanol (după etapele de liză celulară și eliminare a proteinelor și RNA-zelor) (Rodríguez-Riveiro et al., 2022).

De asemenea pentru extracția ADN-ului genomic s-a utilizat și kit-ul QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen ce izolează acizii nucleici cu ajutorul unor membrane de siliciu. Inițial proba este lizată cu proteinază K și un buffer de liză, după care se adaugă un buffer de prindere la membrană (ce conferă lizatului un anumit PH și o anumită salinitate ce va determina ca prin centrifugare ADN-ul să rămână fixat pe membrană iar proteinele și restul

contaminanților să fie îndepărtate). Urmează două etape de spălare și eluția cu soluție tampon (Handbook)

#### Cuantificarea acizilor nucleici

Prima etapă de control este reprezentată de cuantificarea spectrofotometrică a produșilor izolați, cu citire la 260nm și 280nm, folosind un spectrofotometru NanoDrop 2000. Această etapă se bazează pe capacitatea de absorbție pentru lumina ultravioletă a acizilor nucleici la o lungime de undă de 260nm și a proteinelor la 280nm. ARN-ul și ADN-ul monocatenar au un coeficient de extracție de  $0.027 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Pentru evaluarea purității acizilor nucleici se utilizează raportul între absorbanța 260nm și 280nm. Un ADN pur are acest raport egal cu  $\sim 1.8$ , iar ARN-ul pur  $\sim 2$ .

#### 2.2.5 Tehnica MLPA -kitul P0425-B2 pentru Mielom Multiplu

Pentru identificarea anomaliilor citogenetice (variații ale numărului de copii ADN) la pacienții cu MM s-a utilizat kit-ul MLPA P425-B1 (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) ce poate pune în evidență deleții sau duplicații ale următoarelor regiuni cromozomiale și gene țintă: 1p21.1 (COL11A1), 1p12 (FAM46C), 1p32.2 (PLPP3 și DAB1), 1p32.3 (FAF1, CDKN2C), 1q21.3 (CKS1B), 1p31.3 (LEPR), 1p21.3 (DPYD), 1p31.2 (RPE65), 1q23.3 (NUF2, RP11 și PBX1), 5q31.3 (PCDHA1, PCDHAC1, PCDHB2, PCDHB10, SLC25A2, și PCDHGA11), 9p24.1 (JAK2), 9q34.3 (COL5A1), 12p13.31 (CD27, VAMP1, NCAPD2, CHD4), 13q14.2 (RB1 și DLEU2), 13q22.1 (DIS3), 14q32.32 (TRAF3), 15q12 (GABRB3), 15q26.3 (IGF1R), 16q12.1 (CYLD), 16q23.1 (WWOX) și 17p13.1 (TP53). Fiecare sondă are între 129 și 499 nucleotide.

S-au lucrat probe sortate versus fracția de celule CD138- și proba nesortată iar rezultatele obținute au subliniat faptul că îmbogățirea probei este absolut necesară în cazul acestei patologii și pentru utilizarea acestei tehnici (Figura 1, Tabelul 4).



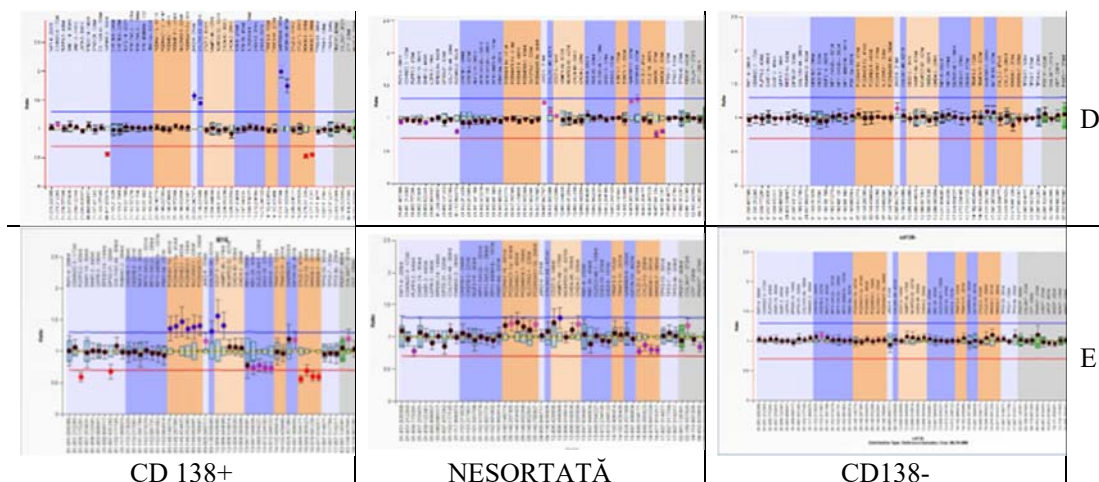


Figura 1. Grafice rezultate în urma analizei MLPA

Tabel 4. Valoarea logaritmică a CNAs în celulele a două probe de la care s-a testat fracția CD138+, CD138- și proba nesortată

		D			E		
		CD138+	NESORTATĂ	CD138-	CD138+	NESORTATĂ	CD138-
MLPA	GAIN	1.69	1.22	1	1.35	1.2	1
	LOSS	0.64	0.79	1	0.68	0.68	1

### 2.2.6 Analiza SNP-array în Mielomul Multiplu

Tehnica SNParray este în general utilizată pentru investigarea mutațiilor genetice constituționale, cu toate acestea, în ultimul deceniu s-a evidențiat utilitatea acesteia și în cazul schimbărilor somatice. Când celulele afectate sunt dependente de micromediul din organism această tehnică poate veni în ajutorul tehnicilor de cariotipare și FISH (Busse et al., 2017, Peterson et al., 2018, Rack et al., 2019, Munshi et al., 2011).

Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) cu sonde de tip Single Nucleotide Polymorphism (SNP) a fost realizată pe o lamă cu 4x180.000 (180K) sonde (110.112 sonde CGH, 59.647 sonde SNP, 3.000 sonde replicate și 8.121 sonde control) care acoperă întreg genomul uman cu o rezoluție spațială de ~25.3 kb ADN (Agilent). Fișierele obținute în urma scanării au fost interpretate cu ajutorul softului CytoGenomics v2.0 de la Agilent, utilizând parametrii standard de interpretare.

Pentru utilizarea SNParray în cazul pacienților cu MM este absolut necesară îmbogațirea probei prin sortarea celulelor CD138 pozitive (Munshi and Avet-Loiseau, 2011) .(Figura 2, Tabelul 5).

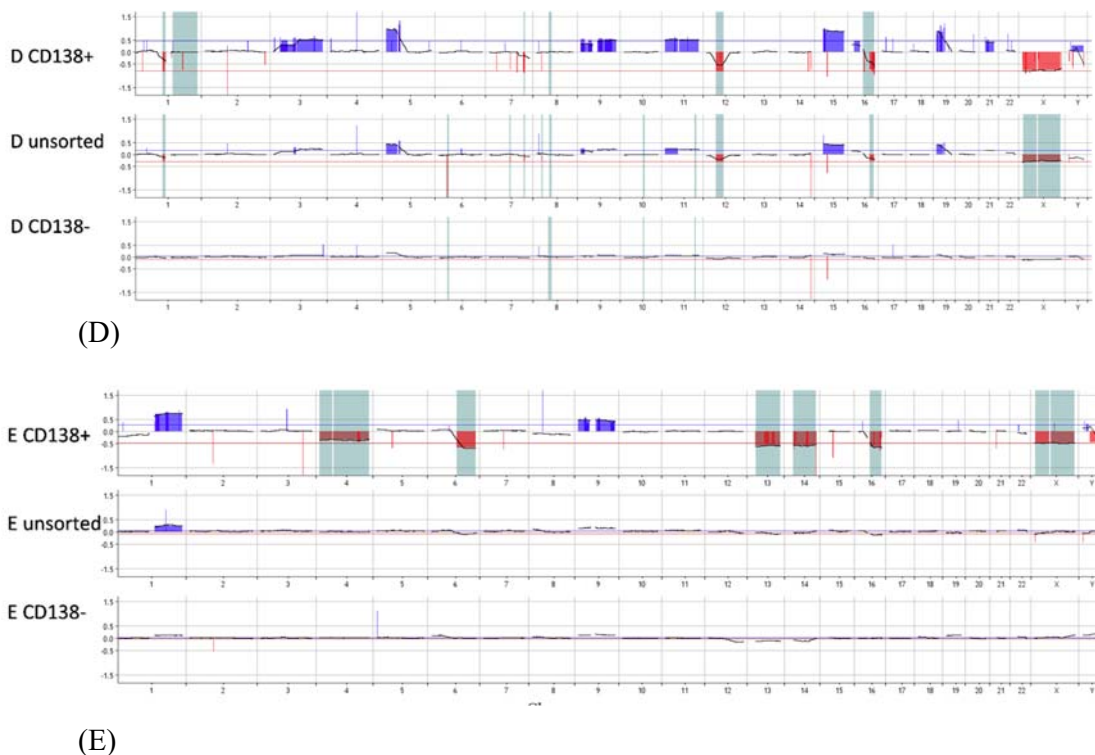


Figura 2. Imagini rezultate în urma analizei SNParray de la doi pacienți diagnosticați cu MM.

Table 5. Valoarea ratei logaritmice în cazul a doi pacienți analizați prin SNParray

		D			E		
		CD138+	NESORTATĂ	CD138-	CD138+	NESORTATĂ	CD138-
aCGH	DUP	0.66	0.57	0	0.52	0.25	0
	DEL	-0.76	-0.37	0	-0.75	0	0

Prin analiza datelor s-a ajuns la concluzia că este necesar ca și în cazul MLPA un infiltrat minim de plasmocite de 30 % în proba analizată pentru ca rezultatele obținute prin această tehnică să fie corecte.

Anomaliile recurente ce pot fi identificate prin array în cazul MM sunt: hiperdiploidia, deleția chr 13, deleția 17p, deleția 1p, amplificarea/ duplicația 1q, microdeleții, cromotripsis, cromoanasinteza, pierderea heterozigoției.

### 2.2.7 Analiza cromozomială standard Cariotip și tehnica FISH

Analizele de citogenetică sunt metode prin care sunt analizați cromozomii. Cariotipul este aranjamentul standard al cromozomilor unei celule, realizat cu scopul de a detecta anomaliile cromozomiale numerice sau structurale, omogene sau în mozaic, ale autozomilor sau ale gonozomilor.

Metoda presupune obținerea de celule în diviziune (cultură nestimulată cu mitogeni fără sincronizare, cu celule din țesuturi ce se divid activ), celulele respective fiind apoi prelucrate în mai multe etape succesive (blocarea diviziunii în metafază, hipotonizare, fixare, etalare pe lamă și colorare). Ulterior, cromozomii sunt fotografiați și dispuși în perechi de cromozomi omologi după criterii standard.

Plasmocitele clonale sunt dependente de micromediul medular și prin urmare, activitatea lor proliferativă în cultură este scăzută. Datorită acestui fapt, doar 30-50% din cazurile noi diagnosticate de MM analizate prin citogenetică clasică prezintă un cariotip anormal (Chin and Zakaria, 2014). Prin cariotipare se pot descrie doar anomalii numerice și structurale mai mari de 5Mb (Riegel, 2014). De asemenea, diverse anomalii importante pentru prognostic precum t(4;14) sunt criptice în citogenetica clasică (Stevens-Kroef et al., 2012). În schimb, prin această tehnică, fiecare celulă este analizată individual și prin urmare, putem observa clonele și subclonele unei anumite linii celulare.

Introducerea testării nucleilor interfazici prin FISH (hibridizarea fluorescentă in situ) a îmbunătățit detectarea anomaliilor genetice în MM. Această tehnică constă în hibridizarea unor sonde fluorescente la ADN-ul țintă.

Ghidul European apărut în 2019 recomandă pentru rutina din diagnostic realizarea cariotipului și un panel de FISH-uri ce include: t(4;14), t(11;14), del17p, t(16;14), t(14;20) plus amplificarea 1q, deleția 1p (Rack et al., 2019). De asemenea, se sugerează utilizarea unor tehnici amplificative (bazate pe extracția ADN) ca și alternativă în cazul în care nu se obțin metafaze analizabile.

### 2.2.8 Analiza statistică

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul softurilor IBM® SPSS Statistics 21.0, R v4.0.3 și software-ul Office-Excel. Toți parametrii au fost analizați în raport cu supraviețuirea fără progresie (PFS) și supraviețuirea globală (OS). PFS a fost definită ca

durata de la începutul tratamentului până la progresia bolii sau decesul pacientului (indiferent de cauza decesului). Evenimentele analizei PFS au inclus progresia bolii, recidiva și decesul pacienților. Progresia bolii a fost diagnosticată conform criteriilor de diagnostic ale IMWG. OS a fost definit ca timpul de la data diagnosticului până la data decesului pacientului. Evenimentele analizei OS au inclus doar moartea. Pierderea pacienților în timpul urmăririi a fost tratată ca informații cenzurate. Metoda Kaplan și Meier și testul log-rank au fost utilizate pentru analiza supraviețuirii. Fiecare grafic conține informațiile statistice relevante: n - numărul total de pacienți și valoarea p (un  $p < 0,05$  a fost considerat ca fiind semnificativ statistic). Analiza regresiei Cox a fost utilizată pentru generarea ratei riscului relativ (HR). HR este o valoare matematică ce calculează probabilitatea ca la o persoană din grupul țintă să apară evenimente de tipul progresia bolii sau moarte.

Elaborarea graficelor tip „*heatmap*” a fost realizată în software-ul R folosind pachetul Complex Heatmap (Gu et al., 2016).

## Capitolul 3: REZULTATE ȘI DISCUȚII

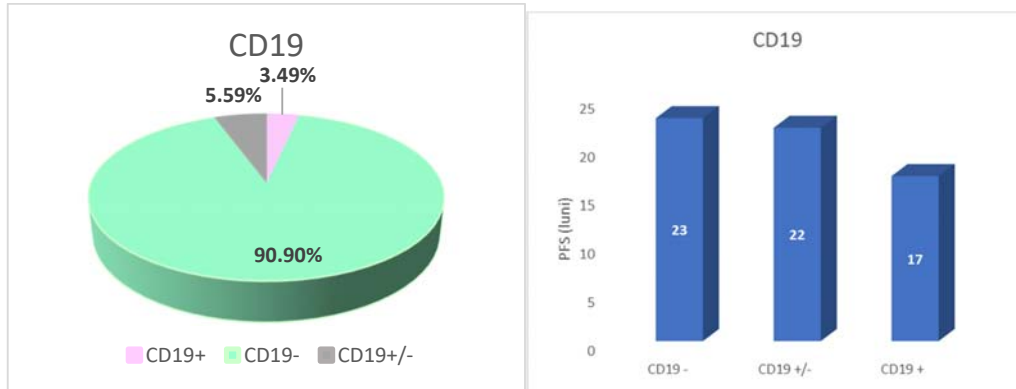
### 3.1 Rezultate și discuții – IMUNOFENOTIPARE

Antigenii de suprafață specifici (CD) sunt utilizați în mod obișnuit în testele de citometrie în flux pentru discriminarea plasmocitelor maligne de cele normale (Alaterre et al., 2017, Sato et al., 2021). Unii dintre acești antigeni de suprafață prin asociere devin factori de prognostic, iar alții reprezintă factori de prognostic independenți. Funcțiile lor celulare inițiale nu sunt întotdeauna înțelese, iar implicațiile lor asupra diagnosticului, prognosticului și stratificării riscului sunt variabile și nu sunt convenite în mod uniform. Există un consens cu privire la CD-urile analizate prin citometrie în flux ce pot identifica clona patogenă și o pot caracteriza în continuare (Paiva et al., 2010, Caers et al., 2018).

Indiferent de categoria bolii plasmocitele au caracteristici imunofenotipice similare, care sunt distincte de cele ale PC normale. De obicei, CD38 și CD138 sunt markerii cei mai importanți pentru discriminarea PC-ului de alte celule din BM. În plus, exprimarea CD45, CD19, CD56, CD117, CD28, CD27 și CD81 împreună cu evidențierea lanțului ușor al imunoglobulinei citoplasmatică permite o discriminare clară între PC normal/reactiv față de PC monoclonal. Împreună, acești markeri sunt utilizați de consorțiul EuroFlow pentru a crea un panel standardizat, permițând identificarea și caracterizarea imunofenotipică a PC neoplazic (Flores-Montero et al., 2016).

#### **CD19**

O expresie mai mare de 50% a acestui marker a fost întâlnită doar în cinci cazuri (3,49%) având o mediană a supraviețuirii de 17 luni în cazul PFS. Opt pacienți au prezentat o expresie cuprinsă între 8% și 41% (Figura 3).



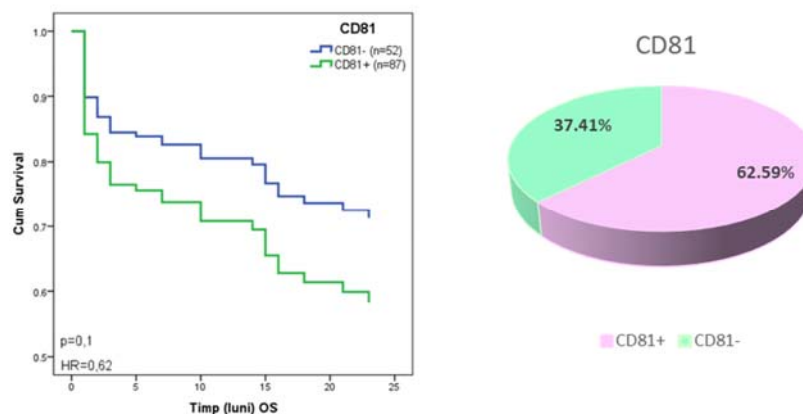
(a)

(b)

Figura 3. (a) Prezența CD19 în grupul analizat; (b) Supraviețuirea fără progresie (mediana calculată cu ajutorul analizei Kaplan Meier) a pacienților grupați în funcție de expresia CD19.

### CD81

Analiza acestui marker s-a realizat doar pentru 139 cazuri din care 62.5% (n=87) au prezentat expresia acestei proteine la nivel membranar iar în cazul a 37.41 (n=52) a lipsit. În literatură este cunoscut ca un factor de prognostic negativ independent mai ales în ceea ce privește PFS (Paiva et al., 2012). În grupul nostru p a fost nesemnificativ dar HR indică prognosticul negativ atât pentru PFS (0,73, CI 95% 0,42-1,26) cât și pentru OS (0,62 CI 95% 0,31-1,24) (Figura 4).

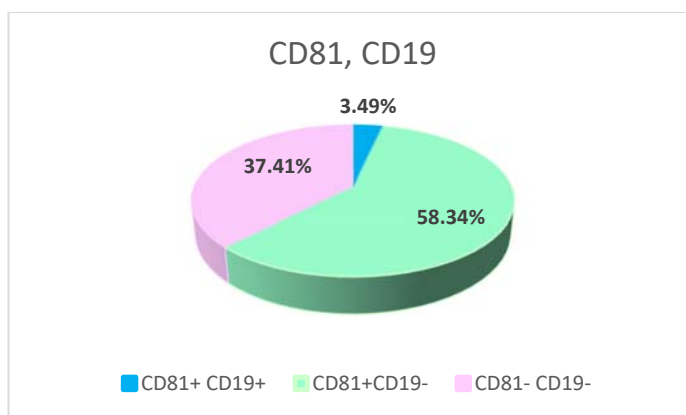


(a)

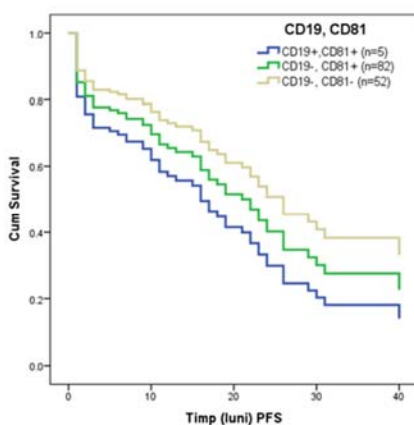
(b)

Figura 4. (a) Reprezentarea modelelor de supraviețuire globală a grupurilor CD81+/CD81- rezultată în urma analizei COX regression; (b) Prezența CD81 în grupul analizat.

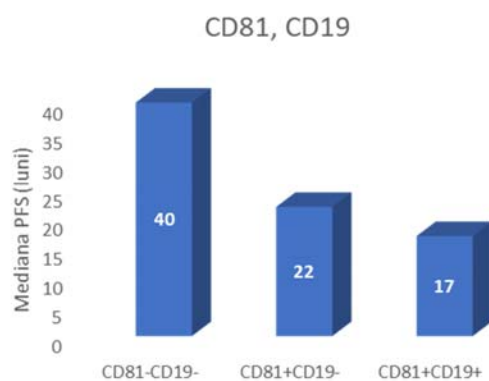
Paiva et al. ((Paiva et al., 2017a) împart plasmocitele în funcție de expresia CD19 și CD81 în trei grupe de diferențiere. CD19(+)CD81(+) PC imature („less-differentiated”), CD19(-) CD81(+) PC intermediar diferențiate („ intermediate-differentiated”) și CD19(-) CD81(-) PC mature („fully differentiated”). În grupul nostru cinci cazuri (3,49% similar cu studiul menționat unde incidența a fost de 3% pentru această clonă) au prezentat PC imature având o mediană a supraviețuirii PFS de doar 17 luni (HR 0.65, 95% CI 0.29-1.43). 58,34% (n=82) au prezentat PC în stadiul doi de diferențiere având o mediană a PFS de 22 luni (HR 0.86 95% CI 0.20-3.55) și 37,4% (n=52) au prezentat PC mature cu o mediana a PFS de 40 luni. În ceea ce privește supraviețuirea globală mediana pentru clona de PC nediferențiată a fost tot de 7 luni iar pentru celelalte categorii a depășit 48 luni (Figurile 5).



(a)



(b)



(c)

Figura 5. (a) Distribuția expresiei CD19, CD81 în grupul studiat; (b) Supraviețuirea fără progresie evaluată în funcție de expresia CD19, CD81 prin COX regression; (c) Mediana PFS calculată prin Kaplan Meier evaluată în funcție de expresia CD19, CD81.

## CD117

Acest CD a fost evaluat în 142 cazuri din care 66.42% (n=93) au prezentat CD117+ și 33,57% (n=49) au prezentat CD117-. Prezența acestei proteine a constituit un factor de prognostic independent pozitiv cu o mediana pentru PFS de 24 luni (versus cei cu CD117- cu 19 luni),  $p=0.04$  (HR=1.61, 95% CI 1.0-2.6) și o mediana pentru OS mai mare de 48 luni (versus cazurile cu CD117- ce au avut mediana la 23 luni), HR=1.63 (95%CI 0.90-2.92) (Figura 6).

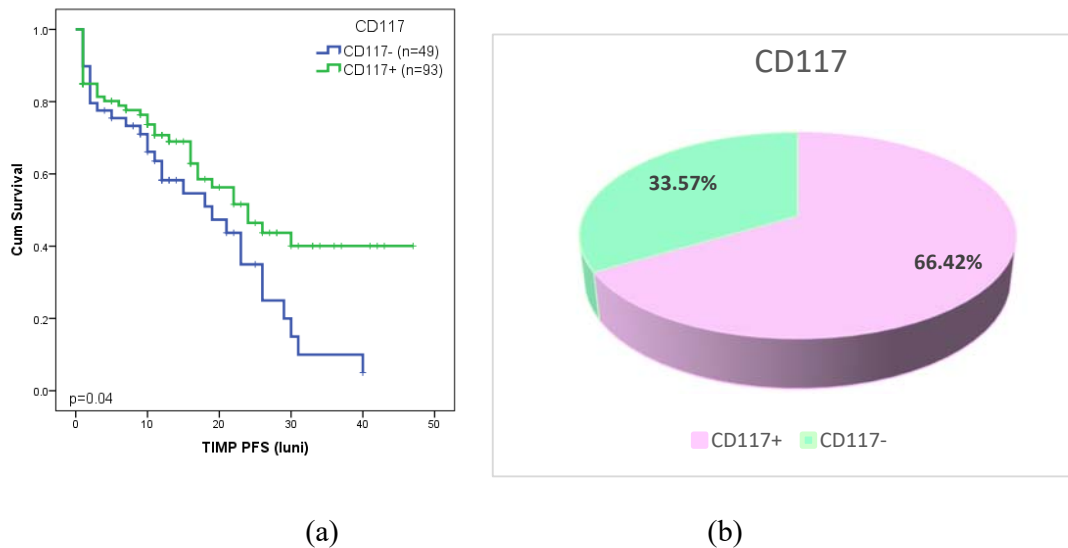


Figura 6. (a) Incidența CD117 în grupul analizat; (b) Curba de supraviețuire Kaplan Maier pentru PFS în funcție de expresia CD117.

### 3.2 Rezultate și discuții- MLPA

Instabilitatea genomică, care implică anomalii numerice și structurale complexe, este o caracteristică a PC atipice din MM (Kim et al., 2015). FISH -ul, cariotipul și citologia sunt cunoscute a fi metode standard („gold standard”) pentru diagnosticarea MM (Dimopoulos et al., 2021).

Xiaofei și colab., 2021 (Ai et al., 2021), au subliniat corelația datelor obținute prin iFISH și MLPA obținând un procent de similitudine de 97,1% (1354 rezultate din 1395 comparații, au fost concordante), deși, au existat unele discrepante în rezoluție, mutații punctiforme și subclone cauzate de sondele utilizate în ambele metode. În plus, conform



studiilor anterioare analiza iFISH este capabilă să detecteze doar delețiile sau duplicațiile mari de 20–50 kb (He et al., 2016), în timp ce MLPA poate recunoaște secvențe de 50–100 nt în lungime (Stuppia et al., 2012). Astfel, apare necesitatea folosirii unor metode alternative, atât în MM [49, 50], cât și în alte boli hematologice.

Anomaliile chr identificate cu kit-ul MLPA P-425 B1 sunt cunoscute, în general ca având un prognostic negativ, excepție făcând doar hiperdiploidia (HRD) despre care se cunoaște că are un prognostic pozitiv (Chretien et al., 2015, Zhan et al., 2006, Zang et al., 2015), (Figura 7).

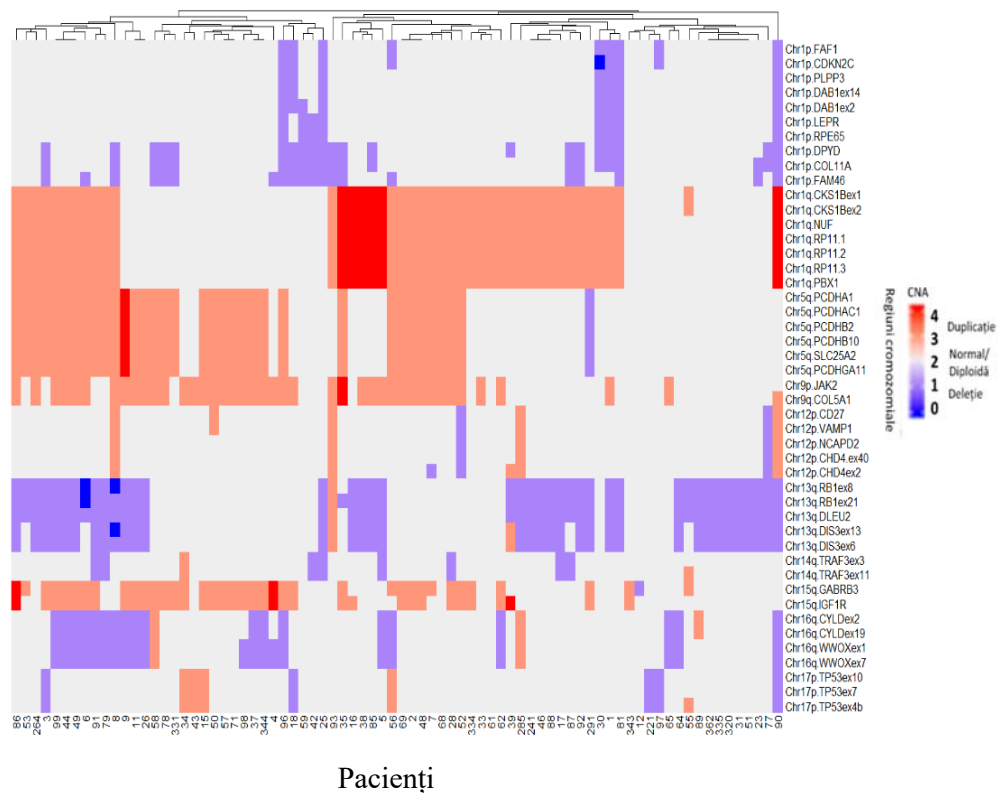


Figura 7. Prezentare de ansamblu a tuturor CNAs prezente în grupul studiat

Studiile anterioare au arătat că anomaliile cromozomiale, în proporții și combinații diferite, pot afecta prognosticul pacienților cu MM (Walker et al., 2015), fapt care a fost observat și în lotul de pacienți studiat, unde asocierea del1p cu dup1q și/sau del13q a avut ca rezultat o supraviețuire mai redusă decât fiecare modificare luată individual.

Shah și colab. (Shah et al., 2018) au împărțit MM în funcție de prezența leziunilor ADN adverse cumulate, în trei grupuri: cu zero leziuni adverse, cu o leziune adversă și cu două leziuni adverse. Acest concept de leziuni cumulate, folosit și de alți cercetători (Baysal

et al., 2020), a făcut ca diversitatea anomaliilor citogenetice să fie mai ușor de înțeles și aplicat în evaluarea prognosticului și răspunsului la tratament pentru practica clinică. În același mod, luând în considerație numai CNA adverse, grupul studiat a fost împărțit în patru subgrupe (fără CNA adverse, o CNA adversă, două CNA adverse și cel puțin trei CNA adverse). Cea mai proastă supraviețuire a fost observată atunci când s-au asociat cel puțin trei modificări rezultând un PFS, cu o mediană de 16 luni (n = 21), comparativ cu pacienții fără CNA adverse (PFS mai mare de 48 luni). OS a fost mai scăzut doar în cazul pacienților cu cel puțin trei modificări adverse (38 de luni), în timp ce restul pacienților au depășit intervalul de timp al studiului (Figurile 8 și 9).

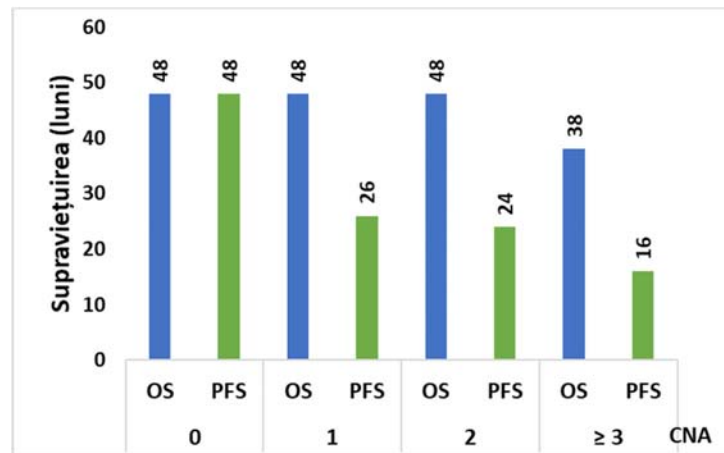


Figura 8. Supraviețuirea globală (OS) și supraviețuirea fără progresie (PFS) corelate cu CNA adverse. Mediana PFS și OS au fost calculate folosind analiza Kaplan-Mayer. 0- fără CNA adverse, 1-un CNA, 2- două CNA adverse și ≥ 3- cel puțin trei CNA adverse.

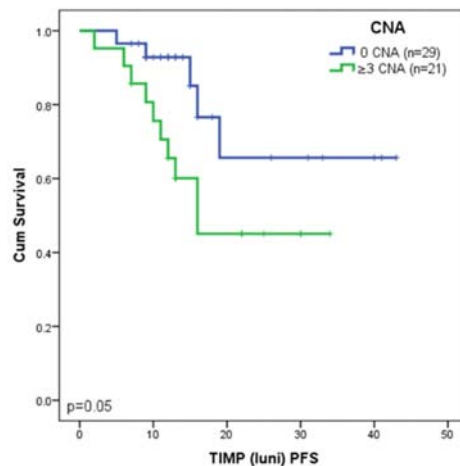


Figura 9. Supraviețuirea fără progresie (PFS) corelată cu CNA adverse. folosind analiza Kaplan-Meier. 0- fără CNA adverse, ≥ 3- cel puțin trei CNA adverse.

### 3.3 Corelarea rezultatele obținute în urma analizelor MLPA și imunofenotipare

PC monoclonale au fost identificate și caracterizate fenotipic prin MFC. CD19 a fost predominant negativ, cu excepția a patru cazuri. Dintre markerii de suprafață analizați, următorii markeri au constituit indicatori de prognostic: CD81, CD19 și CD117, corelați cu CNA-urile identificate.

Markerul CD81 a fost exprimat la 62,8% dintre pacienți, fiind un marker advers cu o mediană a OS de 45 luni ( $p=0,012$ ). Mai mult de 30% dintre ei au asociat fie del13q, fie dup1q. Asocierea cu acesta din urmă a avut un impact negativ semnificativ asupra OS (mediana de supraviețuire de 38 de luni) ( $p=0,002$ ) și PFS (mediana de supraviețuire de 14 luni) ( $p=0,001$ ). La pacienții la care CD81+ a fost asociat cu mai mult de trei CNA adverse ( $n=13$ ), PFS a fost scăzută, cu o mediană de 13 luni ( $p=0,045$ ) și OS de 38 de luni ( $p=0,017$ ) (Tabelul 6).

Tabel 6. Corelația expresiei CD81 cu CNA adverse și prognosticul clinic al pacienților cu MM estimat prin analiza de regresie COX și Kaplan-Meier.

CNAs Adverse	N	PC atipice CD81+					
		OS			PFS		
		LUNI	Rata de hazard (95%CI)	p	LUNI	Rata de hazard (95%CI)	p
del13q	23	38	0.39 (0.18-0.85)	0.013	19	0.62(0.33-1.1)	ns
dup1q	29	38	0.31 (0.14-0.68)	0.002	14	0.38 (0.21-0.7)	0.001
del1p	14	34	0.41 (0.17-0.99)	0.04	16	0.47(0.23-0.97)	0.035
≥3 CNA	13	38	0.36 (0.15-0.87)	0.017	13	0.46 (0.21-1.0)	0.045

Abrevieri: n- număr de cazuri; ns - fără semnificație statistică;  $p<0,05$  a fost considerat semnificativ statistic, luni-mediana calculată prin Kaplan Meier, Rata de hazard a rezultat în urma analizei COX regression.

Având în vedere expresia CD19 și CD81, stadiile de maturare (Paiva et al., 2017a) ale PC atipice au fost corelate cu CNA-urile identificate (Tabelul 20). Pacienții cu PC CD19(+) CD81(+) (slab diferențiate sau nediferențiate) ( $n=4$ ) au avut o mediană PFS de 17 luni și în 75% din cazuri au fost asociate cu HRD. Pacienții cu CD19(-) CD81(+) ( $n= 62$ ) (PC diferențiate intermediar) au avut o mediană PFS de 23 de luni și cazurile cu PC CD19(-) CD81(-) (PC mature/diferențiate) au avut o mediană PFS de 40 de luni. Când expresia CD19 și CD81 a fost comparată cu mai puțin sau mai mult de trei CNA adverse, rezultatele

Kaplan-Maier au evidențiat: CD19(+) CD81(+) (n= 1) a avut cea mai scăzută mediană PFS de 7 luni; CD19(-) CD81(+) (n=11) a avut o mediană PFS de 12 luni; CD19(-) CD81(-) (n=7) a avut o mediană a PFS mai mare de 48 de luni ( Tabelul 7, Figurile 10 și 11).

Tabelul 7. Asocierea între stadiile de maturare ale PC și CNA.

Stadiile de maturare a PC	N	Alterări genomice (CNA)							
		del1p	dup1q	HRD	del12p	del13q	del14q	del16q	del17p
CD19 (+) CD81(+)	4	0%	25%	75%	0%	50%	0%	25%	0%
CD19(-) CD81(+)	62	22.6%	43.6%	46.8%	3.2%	33.9%	8.1%	22.6%	6.5%
CD19(-) CD81(-)	39	20.5%	33.3%	48.7%	0%	41%	7.7%	12.8%	0%

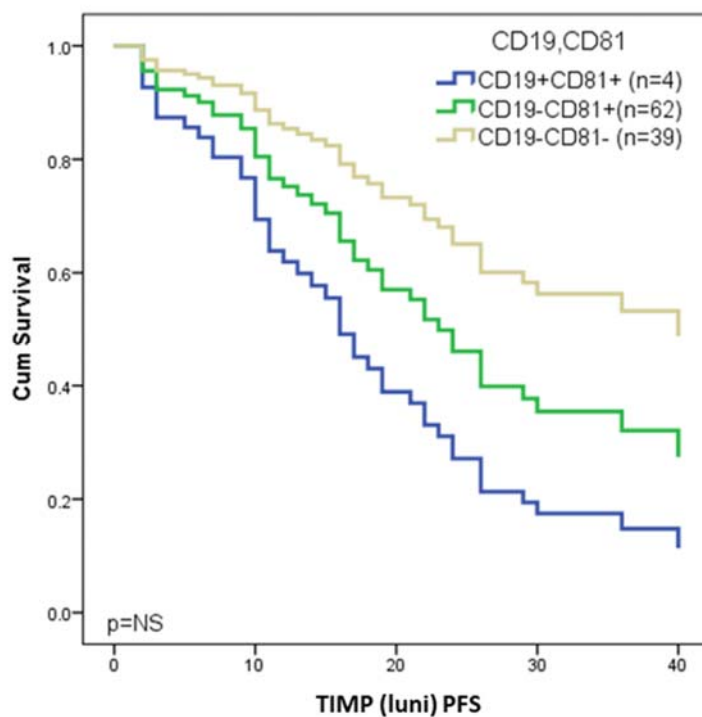


Figura 10. Analiza COX regression a supraviețuirii PFS a grupului de pacienți repartizați în funcție de expresia CD81, CD19.

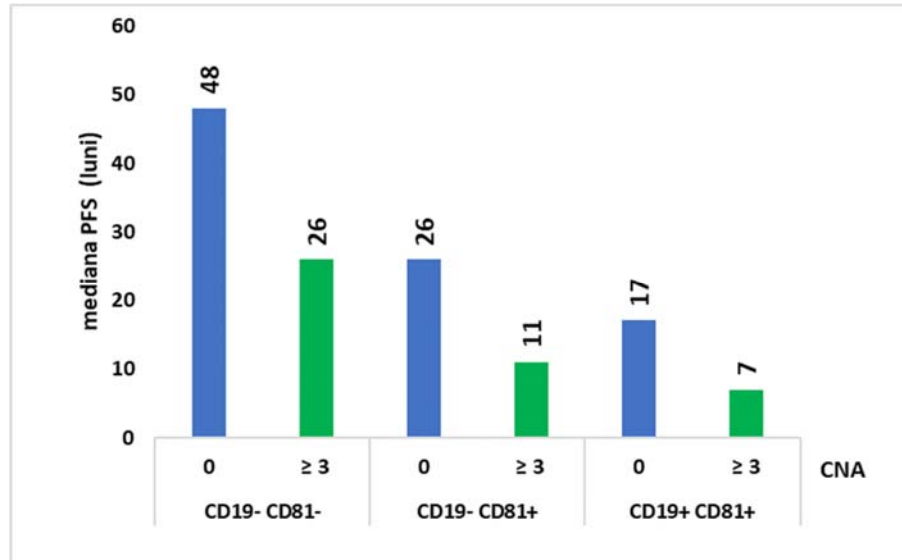


Figura 11. Supraviețuirea pacienților analizați în funcție de asocierea dintre expresia CD81, CD19 și CNA.

Expresia markerului CD117 a fost identificată la 67 de pacienți și a avut un impact favorabil pentru PFS ( $p=0,008$ ) și OS ( $p=0,019$ ). Acest prognostic a fost afectat de co-exprimarea CD81 după cum urmează: mediana PFS a crescut de la 18 luni la 36 de luni în cazul CD117(+) CD81(+) vs CD117(-) CD81(+) ( $p=0,025$ ), HR 0,48 (CI 95% 0,23-0,90) și mediana OS de la 40 de luni la mai mult de 48 de luni ( $p=0,046$ , HR 0,44 (CI 95% 0,19 - 0,99)). Nu a existat nicio diferență în PFS sau OS în cadrul grupul CD81(-) cu sau fără expresie CD117 ( $p=0,82/p=0,84$ ) (Figura 11 a și b).

De asemenea s-a efectuat o analiză a asocierii CD117 cu cel puțin trei CNA-uri adverse. Expresia CD117 a avut un impact pozitiv în grupul cu mai puțin de 3 CNA. Astfel, în acest grup, expresia CD117 a crescut PFS de la 21 la 36 de luni ( $p=0,008$ ) și OS de la 45 la peste 48 de luni ( $p=0,02$ ). În grupul cu mai mult de 3 CNA, expresia CD117 nu a arătat nicio semnificație statistică, poate datorită numărului scăzut de pacienți din acest grup (Figura 11 c și d).

În plus, diferitele stadii de maturare a PC au fost comparate cu expresia CD117 și cu prezența sau absența a trei CNA adverse. Astfel, la pacienții cu PC diferențiate (CD19(-) CD81(-)) cu CD117(-) și mai puțin de trei CNA adverse, PFS a fost de 24 de luni în comparație cu grupul cu cel puțin trei CNA adverse, care a avut o PFS mai scăzută, de 13 luni. În grupul de PC diferențiate intermediare (CD19(-), CD81(+)) cu CD117(-), mediana

PFS a fost de 19 luni în absența a trei CNA adverse și a scăzut semnificativ până la 7 luni, când au fost identificate cel puțin trei CNA adverse.

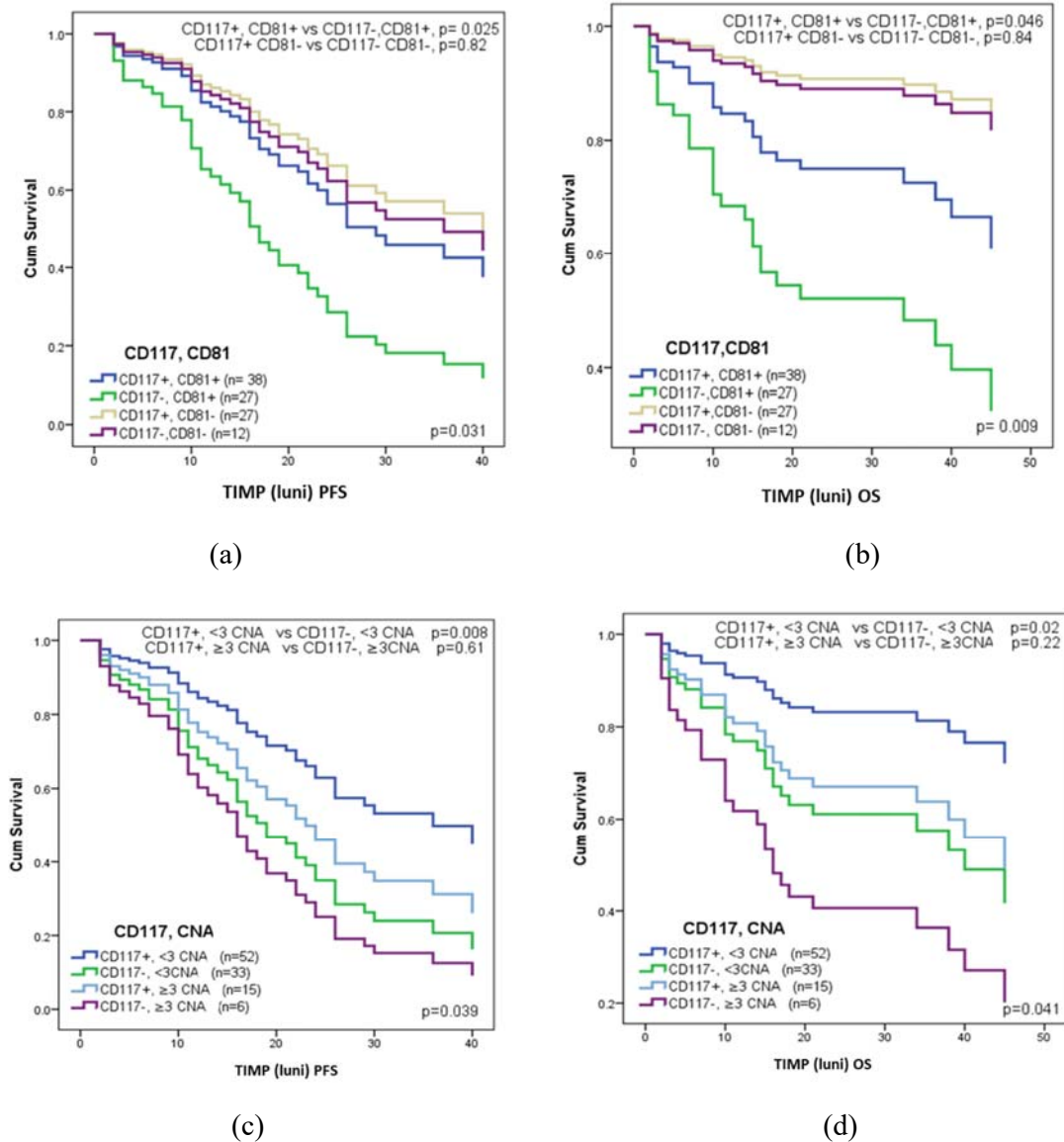


Figura 11. Modele de supraviețuire a pacienților cu MM ținând cont de co-expresia CD81, CD117 (a)-PFS , (b)-OS și CD117, CNA (c)-PFS , (d)-OS calculată prin analiza COX regression.

În ultimul grup, PC mai puțin diferențiate (CD19(+), CD81(+), au fost analizați doar patru pacienți: pentru trei dintre aceștia CD117 a fost pozitiv și au fost identificate mai puțin de trei CNA, ceea ce a dus la o mediană a PFS de 17 luni; pentru ultimul pacient din acest grup, care a prezentat trei CNA adverse și CD117(-), mediana PFS a fost de numai 7 luni.

Astfel, chiar dacă trei CNA adverse scad PFS în toate cele trei stadii de maturare, expresia CD117 poate îmbunătăți rezultatul (Figura 12, Tabelul 8).

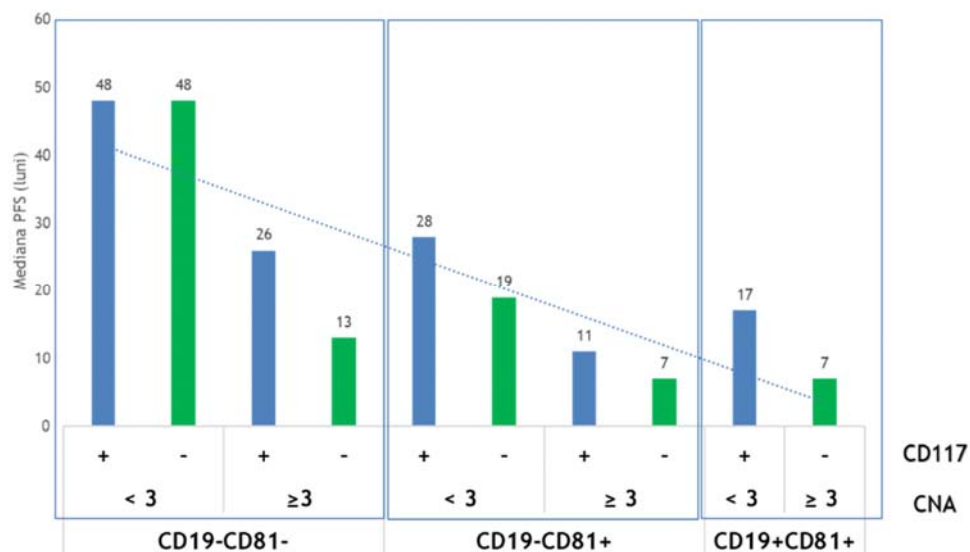


Figura 12. Corelația stadiilor de maturare a PC atât cu expresia CD117, cât și CNA adverse afectează supraviețuirea fără progresie a pacienților cu mielom. Mediana PFS și OS au fost calculate folosind analiza Kaplan-Maier.

Tabel 8. Corelația dintre CD19, CD81, CD117 și CNA-uri

CD19, CD81 Stadiile de maturare	CNAs	CD117		N	Supraviețuire fără progresie		
		Pozitiv sau negativ	Subgrupe		Luni	HR	p
CD19- CD81- (diferențiat)	<3	+	(a)	22	>48	1.88 (0.22-15.69)	-
		-	(b)	10	24	0.68 (0.06-7.70)	0.75 (b vs a)
	≥3	+	(c)	5	>48	0.56 (0.06-4.48)	0.53 (c vs a)
		-	(d)	2	13	x	x
CD19- CD81+ (intermediar)	<3	+	(e)	27	>48	3.021 (1.28-7.08)	-
		-	(f)	23	19	0.33 (0.14-0.77)	0.008 (f vs e)
	≥3	+	(g)	9	13	0.35 (0.12-1.04)	0.049 (g vs e)

		-	(h)	3	7	0.21 (0.042- 1.05) (h vs e)	0.051
CD19+							
CD81+	<3	+	(i)	3	17	0.28 (0.76- 1.09) (i vs e)	0.052
(puțin sau nediferențiat)	≥3	-	(j)	1	7	x	x

Analiza grupurile de PC împreună cu CNA adverse și expresia CD117 a pus în evidență rezultate relevante numai în grupul CD19-CD81+. Astfel, expresia CD117 a avut un impact pozitiv atunci când au fost identificate mai puțin de trei CNA adverse.

În general, expresia CD117 a îmbunătățit rezultatul la PC-urile diferențiate intermediare, indiferent de numărul de modificări ADN. Ca rezultat, factorul de prognostic favorabil CD117 ar trebui luat în considerare în algoritmul de stadializare și urmărire a bolii. În consecință, acest studiu arată că CD19 și CD81 împart pacienții cu MM în trei grupuri distincte de diferențiere a PC, care asociate cu CNA adverse și CD117, permit identificarea de noi subgrupuri cu prognostice diferite, care pot reprezenta ținte suplimentare pentru studii viitoare și chiar și pentru terapii specifice.

### 3.4 Rezultate și discuții - SNParray

Tehnicile standard pentru identificarea anomaliilor genetice în MM sunt cariotipul și FISH-ul (Moreau et al., 2021), dar pe măsură ce cunoștințele noastre despre modificările genetice au crescut, la fel și metodologia de a detecta noi informații genetice a evoluat. Citogenetica PC atipice este adesea neuniformă și greu de caracterizat mai ales în stadiile incipiente ale bolii (Neuse et al., 2020). FISH-ul este limitat la un mic set de anomalii comune iar cariotipul are o rată de succes conform studiilor anterioare de doar 30% (Gole et al., 2014). Astfel SNParray-ul vine în ajutorul tehnicilor clasice putând detecta modificări de mici dimensiuni ale numărului de copii de ADN, la o rezoluție foarte mare (<200 kb) (López-Corral et al., 2012).

Prin această tehnică au fost investigați 50 pacienți. Datele au fost vizualizate utilizând softul CytoGenomics v3.0. Toți pacienții analizați au prezentat anomalii cromozomiale. Toate datele obținute au fost confruntate cu cele obținute prin MLPA observându-se o concordanță de 100%.



În urma analizei lamelor s-a observat că 52% (n=26) din pacienți au prezentat trisomii ale cromozomilor impari (mai mult de 3 cromozomi implicați) și 5.76% (n=3) au prezentat anomalii de mici dimensiuni (Figura 13 și 14).

Trisomiile cromozomilor impari sunt un important criteriu de diagnostic diagnostic (van de Donk et al., 2021). Cel mai frecvent s-au întâlnit trisomiile cromozomilor 9 și 19. Conform cu literatura duplicațiile cromozomii 3,5 și 21 sunt cele mai frecvente (González et al., 2007) (Figura 15).

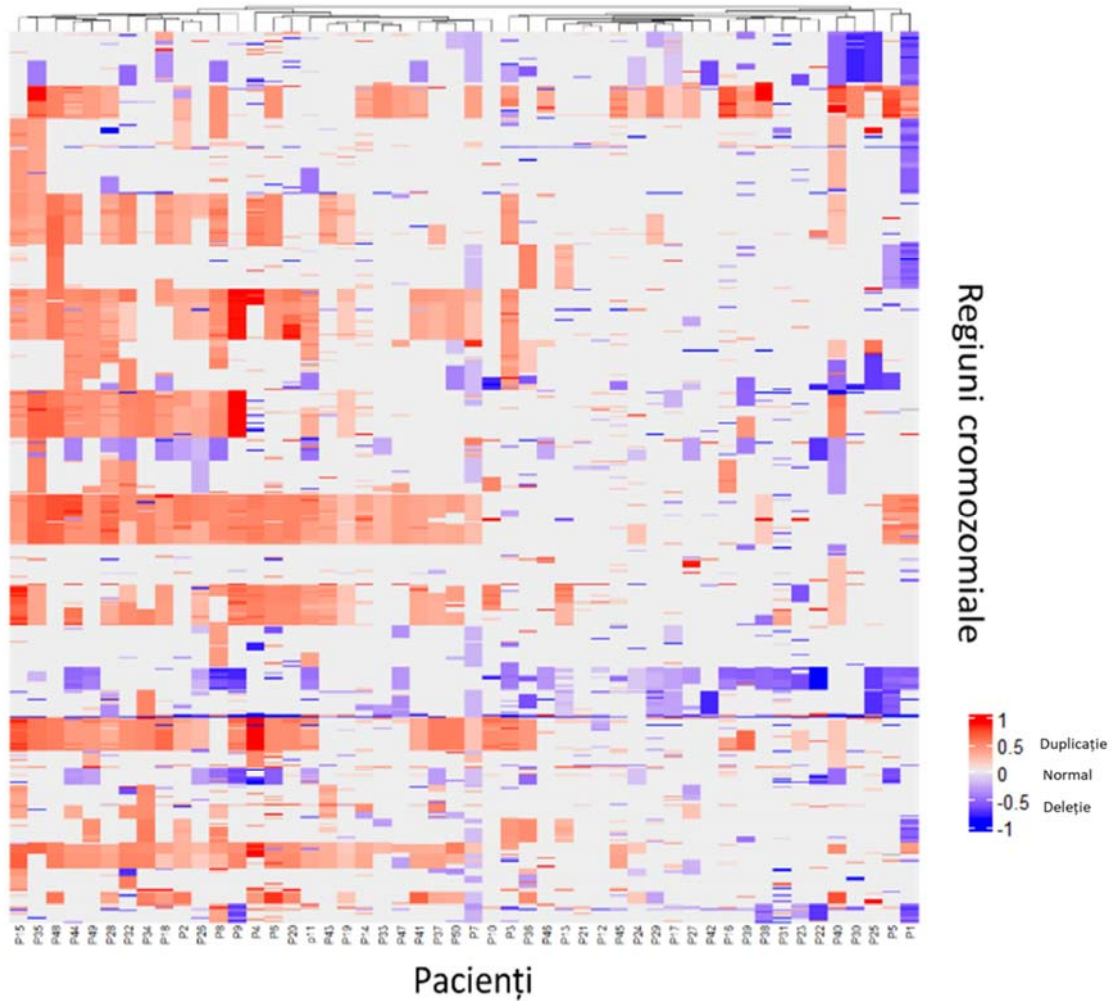


Figura 13. Profilul genomic al pacienților investigați prin SNParray

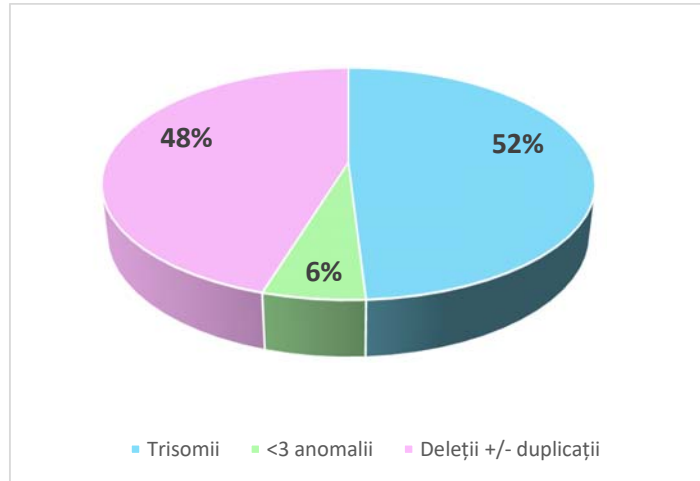


Figura 14. Distribuția pe grupe a lotului de studiu în funcție de anomaliile prezentate

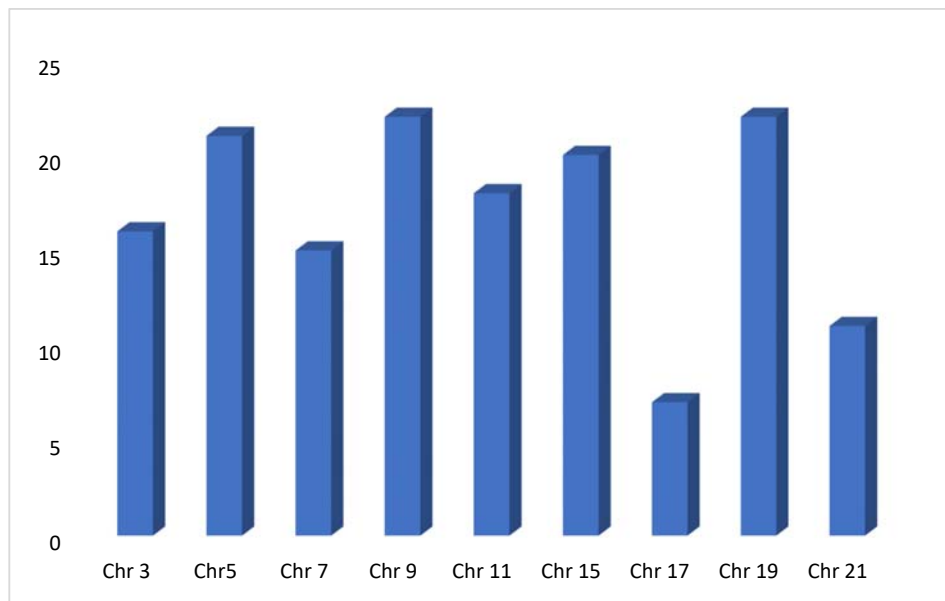


Figura 15. Frecvența duplicațiilor cromozomilor impari

Deleția bratului p al cromozomului 1 a fost întâlnită în 18 cazuri. Statistic del1p22.1 a conferit pacienților un prognostic negativ ( $p=0,002$ ,  $n=17$ ) mediana de supraviețuire pentru PFS fiind de 13 luni. Cel mai frecvent s-au întâlnit delețiile 1p22 (17/18) și 1p13 (17/18). În general supraviețuirea fără progresie a grupului care a prezentat această anomalie a fost de doar 16 luni având un HR de 0.84 (95% CI 0.43-1.62).

Duplq a fost prezentă la 27 cazuri. Chiar dacă supraviețuirea nu a prezentat semnificație statistică totuși mediana calculată prin metoda Kaplan Meier a fost de doar 13 luni pentru PFS iar HR a fost de 0.66 (95%CI 0.34-1.27) (Figurile 16 și 17).

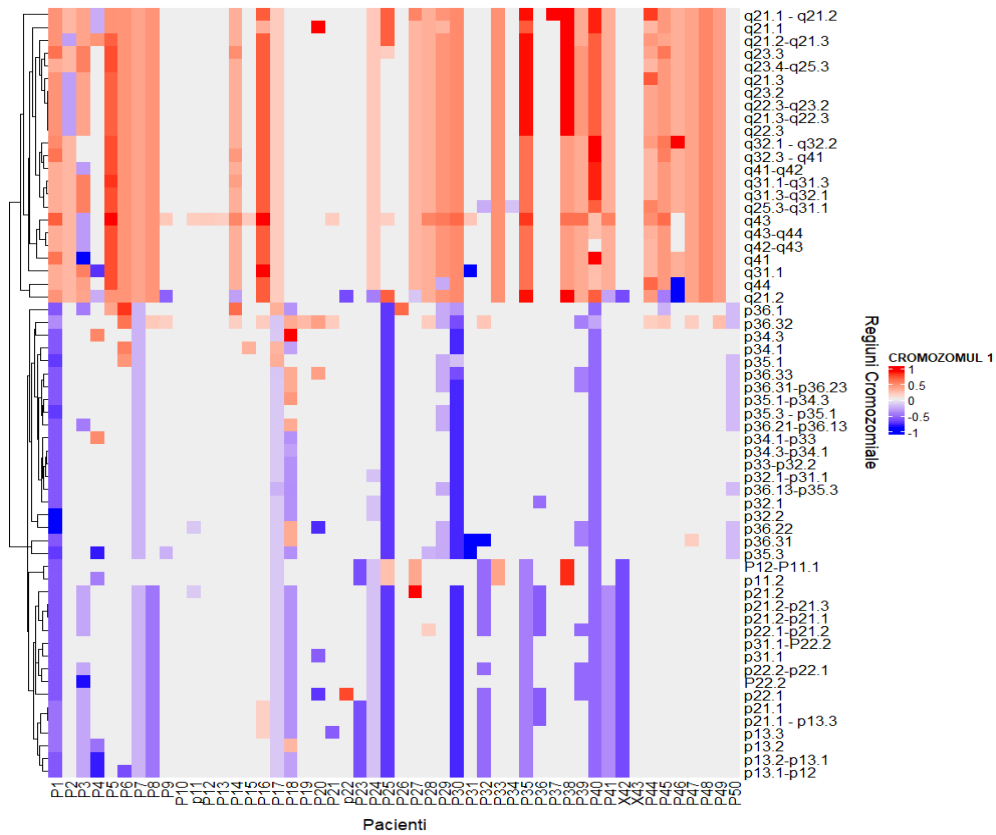


Figura 16. Profilul genomic al cromozomului 1 în grupul studiat.

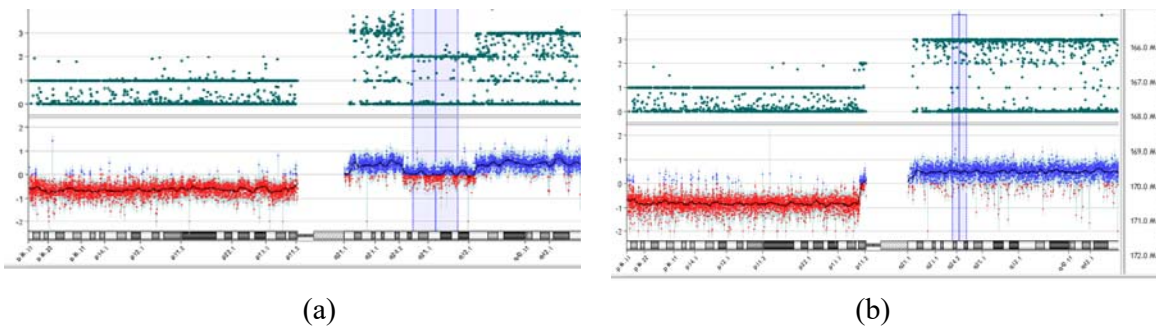


Figura 17. (a) Caz#1 – Se observă deleția brațului p al cromozomului 1 și amplificare parțială a brațului q (prezența unor procese multiple complexe), (b) Caz 30 -Deleție de braț p și pierderea heterozigoției pentru brațul q cu amplificare de pâna la 3 copii.

La nivelul cromozomului 2 la 3 cazuri (p15,p35 și p41) s-a observat dup2q37 ceea ce sugerează prezența der(2)t(1;2)(q12-21;q37) o anomalie rară descrisă doar la 8 cazuri cu MM (Busson Le Coniat et al., 2000, Sawyer et al., 2014) (Figura 96). În cazul grupului analizat se pare că această anomalie a conferit un prognostic advers. În 6 cazuri s-au observat duplicații de mari dimensiuni ale chr 2 iar în 3 deleții fără semnificație statistică (Figura 18).

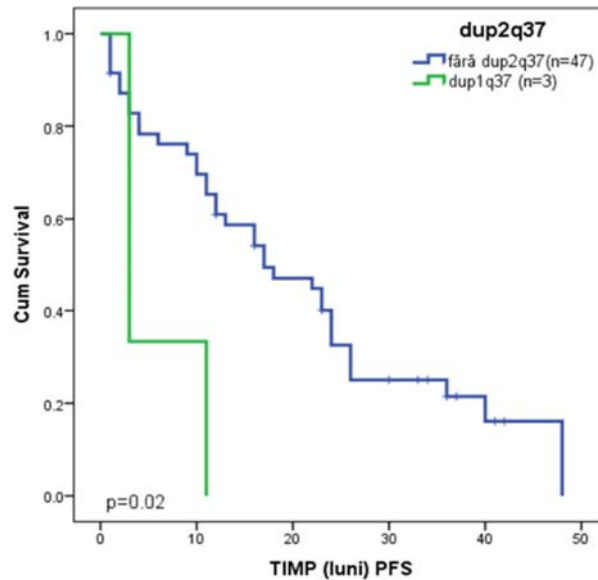


Figura 18. Supraviețuirea (PFS) a pacienților studiați distribuiți în grupuri în funcție de prezența sau absența dup2q37.

Chiar dacă trisomia cromozomului 3 a fost raportată ca fiind prezentă în cazul pacienților cu hiperdiploidie și deci cu un prognostic pozitiv în lotul nostru această anomalie a avut un impact negativ fiind prezentă la 17/50 din cazuri cu o mediană a PFS de doar 11 luni ( $p=0.046$ ) și pentru OS de doar 17 luni ( $p=0.05$ ) (Figura 19).

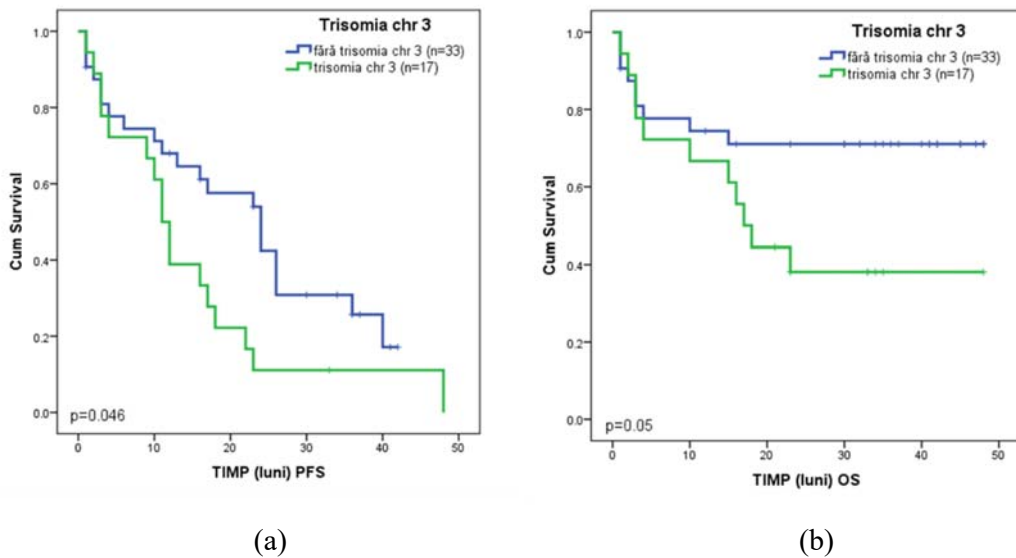
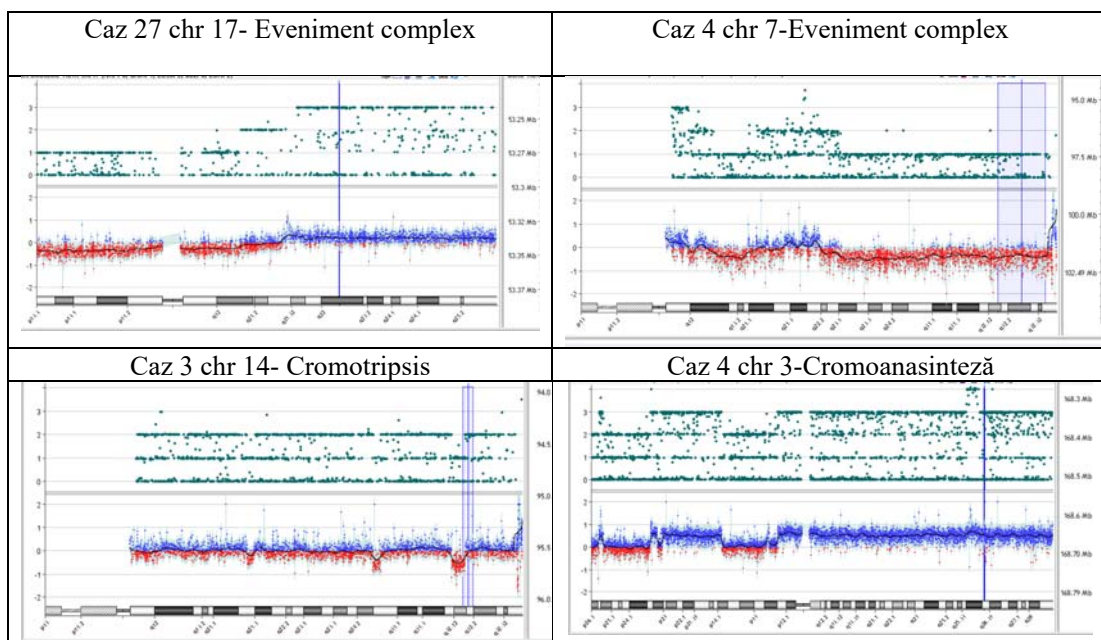


Figura 19. Supraviețuirea globală (OS) (b) și supraviețuirea fără progresie (PFS) (a) a pacienților cu mielom multiplu (MM) corelate cu prezența sau absența trisomiei chr 3.

Deleția 5q a fost întâlnită doar în cazul unui pacient ce a prezentat o supraviețuire de doar 2 luni. Această deleție este întâlnită mai ales în sindroamele mielo-displazice mereu fiind asociată cu un prognostic negativ (Ortega et al., 2013).

S-au observat de asemenea prezența a 20 procese diverse (cromoplexie, cromotripsis și cromoanasinteza) la 18 pacienți (Figura 20).



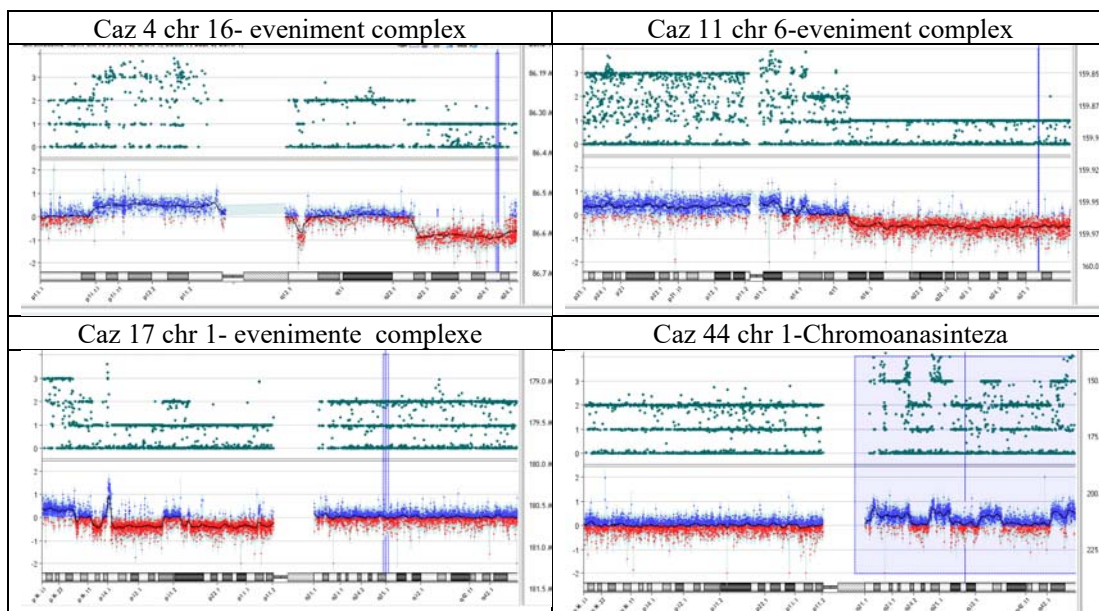


Figura 20. Exemple de evenimente complexe/cromotripsis/cromoanasinteza

Pacienții care au prezentat aceste anomalii complexe au avut o evoluție mai agresivă cu un PFS de doar 17 luni versus pacienții care nu au prezentat aceste alterări cromozomiale care au prezentat un PFS de 30 luni. Toate probele a căror PC au exprimat la nivel membranar CD19+, CD81+ au prezentat astfel de evenimente complexe.

Deleția 13q un alt important factor în diagnosticul MM a fost întâlnită în 30% (n=7) din grupul probelor ce prezintă trisomii ale cromozomilor impari și în 61% (n=16) din cazurile ce prezintă mai puțin de 3 cromozomi impari amplificați. În întreg lotul de studiu 44% (n=23) au prezentat del13q fapt ce este în concordanță cu studiile raportate anterior (aprox. 50%) la nivel internațional (Königsberg et al., 2000).

Pierderea heterozigoției este un eveniment răspândit sporadic în lotul de studiu fără a prezenta aparent importanță statistică în ceea ce privește evoluția bolii și răspunsul la tratament (Figura 21).

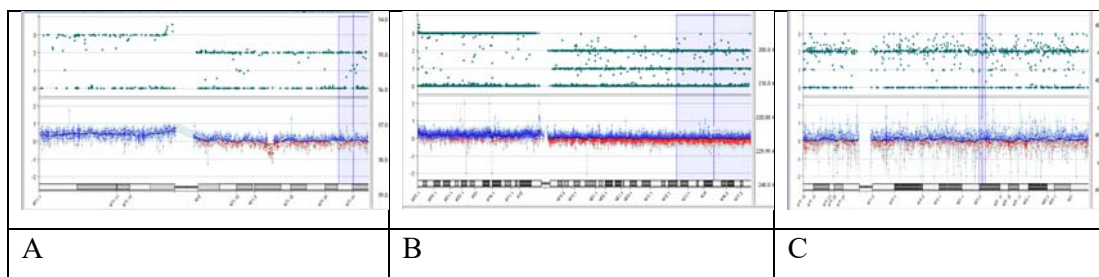


Figura 21. A- Chr 19, cazul 1- se observă pierderea heterozigoției întregului chr cu amplificarea de până la 3 copii a brațului p., B. Caz 2, LOH cu amplificare braț p chr 2, C. Caz 25 chr 18 -pierderea heterozigoției întregului cromozom

Rezultatele obținute prin această tehnică ilustrează ca și în cazul MLPA o mare instabilitate genomică. Spre deosebire de MLPA array-ul este o tehnică mai scumpă dar oferă o imagine de ansamblu asupra întregului genom ceea ce în cazul MM se pare că este tot mai necesar pentru a se pune un diagnostic corect și pentru ca pacientul să aibă acces la o terapie țintită.

### 3.5 Rezultate și discuții - CARIOTIP și FISH

Din totalul probelor prelucrate doar pentru 22 s-au obținut metafaze analizabile (Figura 22).

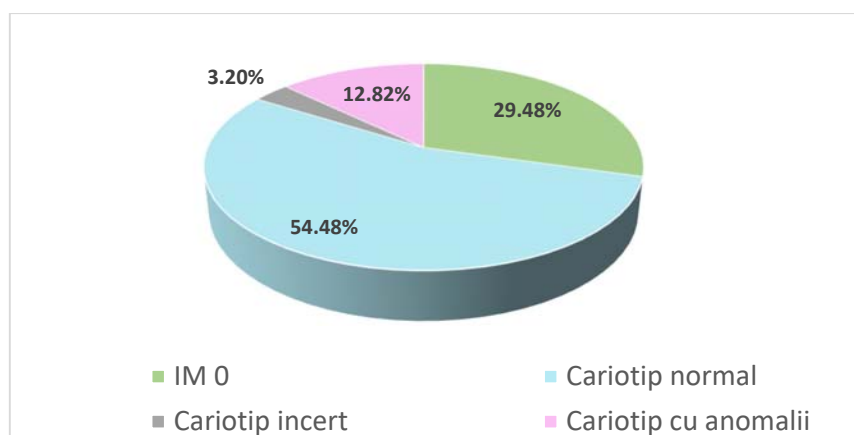


Figura 22. Repartizarea rezultatelor obținute în urma realizării analizei de cariotip

Rata de succes în cazul acestei analize s-a situat sub media raportată în literatură (12,8 vs 30% din cazuri) (Hamdaoui et al., 2020).

Hiperdiploidia s-a regăsit în 11/22 cazuri (încadrându-se în limitele raportate anterior (Robiou du Pont et al., 2017). Cel mai frecvent au fost prezente duplicațiile cromozomilor 5 și 19 urmat de cromozomii 9 și 15 (Figura 23) .

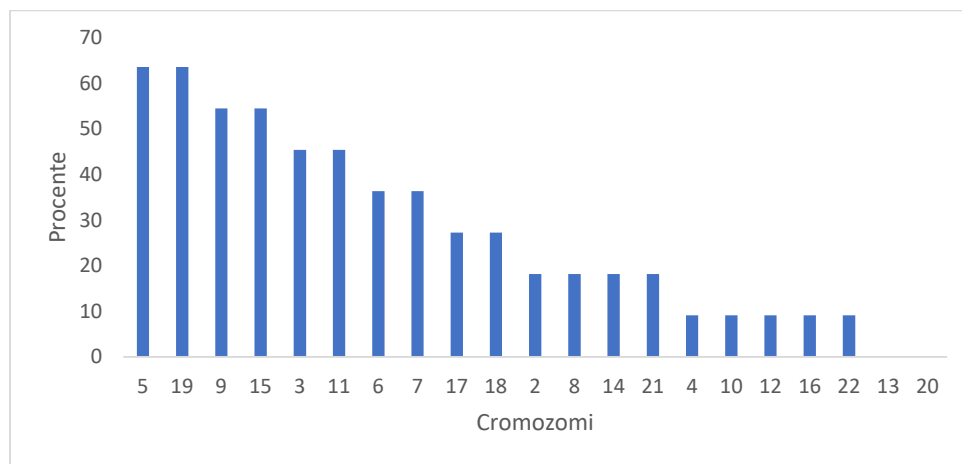


Figura 23- Frecvența cromozomilor care au prezentat trisomii identificate prin cariotip.

Cea mai des întâlnită deleție a fost deleția cromozomului 13 urmată de deleția cromozomului 8. Del13 a fost asociată în 2/22 cazuri cu t(11;14) (Figura 105).

Translocațiile cromozomilor 4 și 14 (t(4;14)), 14 și 16 (t(14;16)) și deleția cromozomului 17p (del(17p)) constituie criterii de încadrare în stadiile de boală conform R-ISS (Greipp et al., 2005). Cercetările în curs dezvăluie un peisaj genomic complex în MM, caracterizat prin instabilitate cromozomială majoră. t(11;14) a fost caracterizată ca având un prognostic intermediar pentru pacienții cu MM (Paner et al., 2020). Celulele MM cu t(11;14) au o biologie unică, cu o expresie relativ mai mare a proteinei antiapoptotice BCL2 și o expresie mai mică a MCL1, spre deosebire de celulele MM fără această translocare. Translocația t(11;14) a apărut ca primul marker predictiv în MM, indicând susceptibilitatea la inhibitori BCL2 (Kaufman et al., 2021). În grupul nostru în total 4 pacienți au prezentat această translocație (identificată prin FISH- Figura 24).



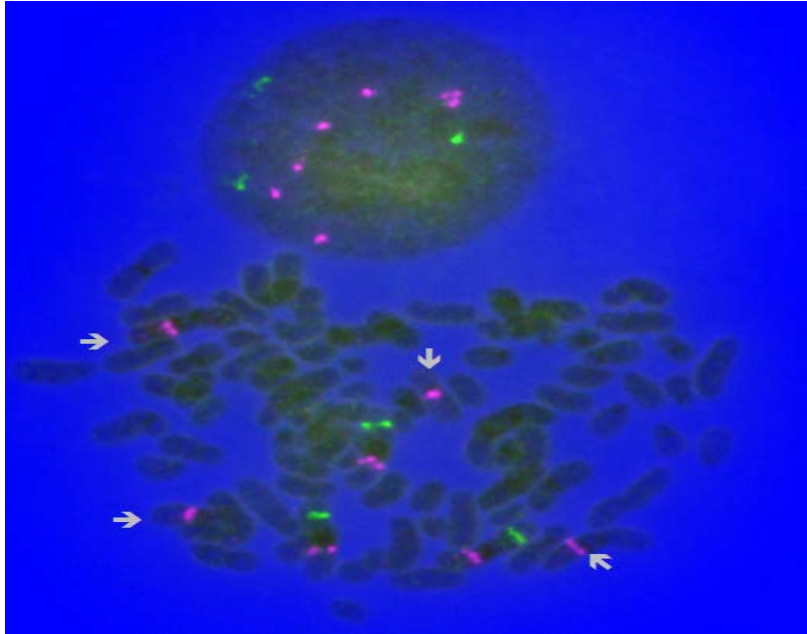


Figura 24. Imagine de FISH în care se observă t(11;14).

Deleția de 17p a fost prezentă în 4 cazuri. Această variație a numărului de copii de ADN are implicații negative în numeroase tipuri de cancer (Kaufman et al., 2021). În cazul lotului nostru pacienții ce au prezentat această anomalie și au fost investigați prin citogenetică clasică au avut o medie de supraviețuire de doar 10 luni.

Prin cariotip s-au pus de asemenea în evidență cazuri ce au prezentat clone multiple și tetraploidie. O evaluare statistică nu s-a putut realiza datorită numărului redus de probe cu metafaze analizabile.

În concluzie FISH-ul oferă informații asupra prezenței translocațiilor cu rol prognostic în cazul pacienților cu MM. Iar cariotipul oferă o imagine de ansamblu asupra întregului genom cu caracterizarea clonelor și subclonelor aflate în probă dar la o rezoluție scăzută și direct proporțională cu eficiența PC atipice din probă de a prolifera în mediul extramedular.

## CONCLUZII GENERALE

O mai bună înțelegere a instabilității genomice a plasmocitelor clonale la pacienții cu Mielom multiplu (MM), contribuie la selectarea strategiilor optime de tratament, cu beneficii pe termen lung.

Identificarea unor noi markeri în contextul eficientizării metodologiei, este esențială în diagnosticarea precoce a MM.

Descrierea completă a mecanismelor de transformare a plasmocitelor în plasmocite atipice și a mutațiilor implicate în acest proces, va contribui la înțelegerea procesului de progresie tumorală în cazul mielomului multiplu și la identificarea unor soluții țintite în terapie.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu, au condus la următoarele concluzii:

- Îmbogățirea probelor de măduvă hematogenă (provenite de la pacienți diagnosticați cu MM) prin sortare, conferă o rezoluție mai bună în cazul identificării anomaliilor genetice atât prin tehnici de citogenetică clasică (iFISH) cât și prin tehnicile de biologie moleculară (SNParray, MLPA, etc.).
- Rezultatele obținute prin analiza de imunofenotipare au demonstrat că în cazul clusterului de diferențiere 117 (CD117) acesta poate fi considerat un factor de prognostic pozitiv independent, deoarece supraviețuirea fără progresie în grupul analizat, a fost semnificativă statistic mai bună ( $p=0,04$ ).
- CD81 este un factor de prognostic negativ în grupul analizat, aspect indicat de analiza regresiei COX, rata de hazard fiind 0.62.
- Coexpresia CD19 și CD81 împart PC în trei stadii de diferențiere (PC slab diferențiate: CD19+,CD81+; intermediar diferențiate: CD19-, CD81+ și diferențiate: CD19-, CD81-) cu un răspuns diferit la tratament și respectiv o rată de supraviețuire specifică.
- În cazul mielomului multiplu, cariotiparea nu reprezintă întotdeauna o metodă fiabilă de identificare a anomaliilor, deoarece plasmocitele atipice au o rată de proliferare scăzută in vitro, fiind dependente de micromediul medular.
- Testele performante de diagnostic precum SNParray și MLPA, permit atât identificarea și descrierea de noi anomalii genetice cu implicații în apariția MM, cât și optimizarea strategiilor de diagnostic și de urmărire a evoluției bolii sub tratament.

- Corelarea datelor de MFC au pus în evidență că în grupele de diferențiere a plasmocitelor atipice caracterizate prin coexpresia CD19 și CD81 prezența lui CD117 conferă un prognostic pozitiv ( $p=0,024$ ).
- În cadrul grupului CD19-, CD81+, CD117+ prezența a cel puțin trei regiuni cu anomalii ale numărului de copii (CNA) adverse a determinat o scădere a ratei de supraviețuire a pacienților ( $p=0,008$ ).
- Deși doar grupa CD19-, CD81+ a fost statistic relevantă privind în ansamblu rezultatele în toate cele 3 stadii de diferențiere a plasmocitelor, se evidențiază grupuri cu un risc mare de progresie caracterizate prin CD117- și  $\geq 3$  CNA adverse.
- Imunofenotiparea oferă detalii asupra expresiei diverselor proteine la nivel membranar, iar corelarea acestor date cu anomaliile cromozomiale, expresia unor markeri moleculari, tratament și rata de supraviețuire, va permite identificarea de noi strategii de tratament.
- Comparativ cu metodele clasice de cariotipare și genotipare, tehnica SNParray furnizează la o rezoluție mai bună o imagine de ansamblu asupra anomaliilor din întreg genomul.
- Procesele de ce implică evenimente complexe, cromotripsis și cromoanasinteză, au efecte negative asupra declanșării și evoluției a diferite forme de cancer. În grupul analizat, aceste evenimente au redus mediana PFS la 10 luni ( $p=0,05$ ) și OS la 15 luni ( $p=0,049$ ).
- Toți pacienții cu plasmocite CD19+,CD81+ au prezentat astfel de procese complexe.
- Cariotiparea deși are o rezoluție scăzută, prin analiza celulă cu celulă oferă informații importante despre clonele prezente în probă.
- Tehnica de analiză FISH permite evidențierea translocațiilor ce au un profund prognostic advers.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AI, X., LI, B., XU, Z., LIU, J., QIN, T., LI, Q. & XIAO, Z. 2021. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization for detecting chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)*, 100, e25768.
2. ALATERRE, E., RAIMBAULT, S., GOLDSCHMIDT, H., BOUHAYA, S., REQUIRAND, G., ROBERT, N., BOIREAU, S., SECKINGER, A., HOSE, D., KLEIN, B. & MOREAUX, J. 2017. CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*, 8, 98931-98944.
3. ARSHAM, M. S., BARCH, M. J. & LAWCE, H. J. 2017. *The AGT cytogenetics laboratory manual*, John Wiley & Sons
4. AVET-LOISEAU, H., ATTAL, M., CAMPION, L., CAILLOT, D., HULIN, C., MARIT, G., STOPPA, A.-M., VOILLAT, L., WETTERWALD, M. & PEGOURIE, B. 2012. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t (4; 14), del (17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 1949-1952.
5. BLIMARK, C., HOLMBERG, E., MELLQVIST, U. H., LANDGREN, O., BJÖRKHOLM, M., HULTCRANTZ, M., KJELLANDER, C., TURESSON, I. & KRISTINSSON, S. Y. 2015. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*, 100, 107-113.
6. BÜSCHER, M. 2019. Flow Cytometry Instrumentation - An Overview. *Curr Protoc Cytom*, 87, e52.
7. BUSSE, T. M., ROTH, J. J., WILMOTH, D., WAINWRIGHT, L., TOOKE, L. & BIEGEL, J. A. 2017. Copy number alterations determined by single nucleotide polymorphism array testing in the clinical laboratory are indicative of gene fusions in pediatric cancer patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 56, 730-749.
8. BUSSON LE CONIAT, M., BRIZARD, F., SMADJA, N. V., MAAREK, O., DER SARKISSIAN, H. & BERGER, R. 2000. Interstitial telomere repeats in translocations of hematopoietic disorders. *Leukemia*, 14, 1630-3.
9. CAERS, J., GARDERET, L., KORTÜM, K. M., O'DWYER, M. E., VAN DE DONK, N. W., BINDER, M., DOLD, S. M., GAY, F., CORRE, J. & BEGUIN, Y. 2018. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica*, 103, 1772.
10. CALLANDER, N. S., BALJEVIC, M., ADEKOLA, K., ANDERSON, L. D., CAMPAGNARO, E., CASTILLO, J. J., COSTELLO, C., DEVARAKONDA, S., ELSEDAWY, N., FAIMAN, M., GARFALL, A., GODBY, K., HILLENGASS, J., HOLMBERG, L., HTUT, M., HUFF, C. A., HULTCRANTZ, M., KANG, Y., LARSON, S., LIEDTKE, M., MARTIN, T., OMEL, J., SBOROV, D., SHAIN, K., STOCKERL-GOLDSTEIN, K., WEBER, D., BERARDI, R. A., KUMAR, R. & KUMAR, S. K. 2022. NCCN Guidelines® Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw*, 20, 8-19.
11. CARRASCO, D. R., TONON, G., HUANG, Y., ZHANG, Y., SINHA, R., FENG, B., STEWART, J. P., ZHAN, F., KHATRY, D. & PROTOPOPOVA, M. 2006. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer cell*, 9, 313-325.
12. CHATTOPADHYAY, S., THOMSEN, H., YADAV, P., DA SILVA FILHO, M. I., WEINHOLD, N., NÖTHEN, M. M., HOFFMAN, P., BERTSCH, U., HUHN, S. & MORGAN, G. J. 2019. Genome-wide interaction and pathway-based identification of key regulators in multiple myeloma. *Communications Biology*, 2, 89.
13. CHIN, Y.-M. & ZAKARIA, Z. 2014. Routine laboratory diagnosis of chromosome aberrations in multiple myeloma. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2, 1241.
14. CHNG, W., SANTANA-DAVILA, R., VAN WIER, S., AHMANN, G., JALAL, S., BERGSAGEL, P., CHESI, M., TRENDLE, M., JACOBUS, S. & BLOOD, E. 2006. Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia*, 20, 807.
15. CHRETIEN, M. L., CORRE, J., LAUWERS-CANCES, V., MAGRANGEAS, F., CLEYNEN, A., YON, E., HULIN, C., LELEU, X., ORSINI-PIOCELLE, F., BLADE, J. S., SOHN, C., KARLIN, L., DELBREL, X., HEBRAUD, B., ROUSSEL, M., MARIT, G., GARDERET, L., MOHTY, M., RODON, P., VOILLAT, L., ROYER, B., JACCARD, A., BELHADJ, K., FONTAN, J., CAILLOT, D., STOPPA, A. M., ATTAL, M., FACON, T., MOREAU, P., MINVIELLE, S. & AVET-

- LOISEAU, H. 2015. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*, 126, 2713-9.
16. COWAN, A. J., GREEN, D. J., KWOK, M., LEE, S., COFFEY, D. G., HOLMBERG, L. A., TUAZON, S., GOPAL, A. K. & LIBBY, E. N. 2022. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *Jama*, 327, 464-477.
  17. DANAILA, C. & DASCALESCU, A. 2011. Hematologie, patologie neoplazica. Elemente de diagnostic si tratament. Editura Junimea. Iasi.
  18. DE MORAES HUNGRIA, V. T., DE QUEIROZ CRUSOÉ, E., BITTENCOURT, R. I., MAIOLINO, A., MAGALHÃES, R. J. P., DO NASCIMENTO SOBRINHO, J., PINTO, J. V., FORTES, R. C., DE SÁ MOREIRA, E. & TANAKA, P. Y. 2018. New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematology, transfusion and cell therapy*.
  19. EGAN, P. A., ELDER, P. T., DEIGHAN, W. I., O'CONNOR, S. J. M. & ALEXANDER, H. D. 2020. Multiple myeloma with central nervous system relapse. *Haematologica*, 105, 1780-1790.
  20. FIRTH, J. 2019. Haematology: multiple myeloma. *Clin Med (Lond)*, 19, 58-60.
  21. FLORES-MONTERO, J., DE TUTE, R., PAIVA, B., PEREZ, J. J., BÖTTCHER, S., WIND, H., SANOJA, L., PUIG, N., LECREVISSE, Q. & VIDRIALES, M. B. 2016. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 90, 61-72.
  22. GAY, F. & GOLDSCHMIDT, H. 2019. Do we need cytogenetics in the follow-up of multiple myeloma? *Br J Haematol*.
  23. GIVAN, A. L. 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699, 1-29.
  24. GLIER, H., NOVAKOVA, M., TE MARVELDE, J., BIJKERK, A., MORF, D., THURNER, D., REJLOVA, K., LANGE, S., FINKE, J., VAN DER SLUIJS-GELLING, A., SEDEK, L., FLORES-MONTERO, J., BÖTTCHER, S., FERNANDEZ, P., RITGEN, M., VAN DONGEN, J. J. M., ORFAO, A., VAN DER VELDEN, V. H. J. & KALINA, T. 2019. Comments on EuroFlow standard operating procedures for instrument setup and compensation for BD FACS Canto II, Navios and BD FACS Lyric instruments. *J Immunol Methods*, 475, 112680.
  25. GOLE, L., LIN, A., CHUA, C. & CHNG, W. J. 2014. Modified cIg-FISH protocol for multiple myeloma in routine cytogenetic laboratory practice. *Cancer Genet*, 207, 31-4.
  26. GONZÁLEZ, D., VAN DER BURG, M., GARCÍA-SANZ, R., FENTON, J. A., LANGERAK, A. W., GONZÁLEZ, M., VAN DONGEN, J. J., SAN MIGUEL, J. F. & MORGAN, G. J. 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 110, 3112-3121.
  27. GREIPP, P. R., SAN MIGUEL, J., DURIE, B. G., CROWLEY, J. J., BARLOGIE, B., BLADÉ, J., BOCCADORO, M., CHILD, J. A., AVET-LOISEAU, H., KYLE, R. A., LAHUERTA, J. J., LUDWIG, H., MORGAN, G., POWLES, R., SHIMIZU, K., SHUSTIK, C., SONNEVELD, P., TOSI, P., TURESSON, I. & WESTIN, J. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 3412-20.
  28. GU, Z., EILS, R. & SCHLESNER, M. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32, 2847-2849.
  29. GUPTA, S., KARANDIKAR, N. J., GINADER, T., BELLIZZI, A. M. & HOLMAN, C. J. 2018. Flow cytometric aberrancies in plasma cell myeloma and MGUS - correlation with laboratory parameters. *Cytometry B Clin Cytom*, 94, 500-508.
  30. HAMDAROU, H., BENLARROUBIA, O., AIT BOUJUMIA, O. K., MOSSAFA, H., OULDIM, K., BELKHAYAT, A., SMYEJ, I., BENRAHMA, H., DEHBI, H. & CHEGDANI, F. 2020. Cytogenetic and FISH analysis of 93 multiple myeloma Moroccan patients. *Mol Genet Genomic Med*, 8, e1363.
  31. HANDBOOK, Q.( [file:///C:/Users/loredana/Downloads/HB-2530-001\\_1113198\\_Pcard\\_QIAamp\\_DNA\\_Mini\\_0418\\_WW.pdf](file:///C:/Users/loredana/Downloads/HB-2530-001_1113198_Pcard_QIAamp_DNA_Mini_0418_WW.pdf))
  32. HE, R., WIKTOR, A. E., DURNICK, D. K., KURTIN, P. J., VAN DYKE, D. L., TEFFERI, A., PATNAIK, M. S., KETTERLING, R. P. & HANSON, C. A. 2016. Bone Marrow Conventional Karyotyping and Fluorescence In Situ Hybridization: Defining an Effective Utilization Strategy for Evaluation of Myelodysplastic Syndromes. *Am J Clin Pathol*, 146, 86-94.
  33. HOCTOR, V. T. & CAMPBELL, L. J. 2012. Hyperhaploid plasma cell myeloma. *Cancer genetics*, 205, 414-418.
  34. [HTTPS://SEER.CANCER.GOV/STATFACTS/HTML/MULMY.HTML](https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html) 2022. NIH.
  35. KALINA, T., FLORES-MONTERO, J., VAN DER VELDEN, V. H., MARTIN-AYUSO, M., BÖTTCHER, S., RITGEN, M., ALMEIDA, J., LHERMITTE, L., ASNAFI, V., MENDONÇA, A., DE TUTE, R., CULLEN, M., SEDEK, L., VIDRIALES, M. B., PÉREZ, J. J., TE MARVELDE, J. G., MEJSTRIKOVA, E., HRUSAK, O., SZCZEPAŃSKI, T., VAN DONGEN, J. J. & ORFAO, A.

2012. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26, 1986-2010.
36. KAUFMAN, J. L., GASPARETTO, C., SCHJESVOLD, F. H., MOREAU, P., TOUZEAU, C., FACON, T., BOISE, L. H., JIANG, Y., YANG, X., DUNBAR, F., VISHWAMITRA, D., UNGER, S., MACARTNEY, T., PESKO, J., YU, Y., SALEM, A. H., ROSS, J. A., HONG, W. J., MACIAG, P. C., PAUFF, J. M. & KUMAR, S. 2021. Targeting BCL-2 with venetoclax and dexamethasone in patients with relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Am J Hematol*, 96, 418-427.
  37. KAZANDJIAN, D. 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*, 43, 676-681.
  38. KIM, M., LEE, S. H., KIM, J., LEE, S. E., KIM, Y. J. & MIN, C. K. 2015. Copy number variations could predict the outcome of bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, 54, 20-7.
  39. KÖNIGSBERG, R., ACKERMANN, J., KAUFMANN, H., ZOJER, N., URBAUER, E., KRÖMER, E., JÄGER, U., GISSLINGER, H., SCHREIBER, S., HEINZ, R., LUDWIG, H., HUBER, H. & DRACH, J. 2000. Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*, 14, 1975-9.
  40. KUMAR, S., FONSECA, R., KETTERLING, R. P., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., GERTZ, M. A., HAYMAN, S. R., BUADI, F. K., DINGLI, D. & KNUDSON, R. A. 2012. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, blood-2011-11-390658.
  41. KUMAR, S. K., RAJKUMAR, V., KYLE, R. A., VAN DUIN, M., SONNEVELD, P., MATEOS, M. V., GAY, F. & ANDERSON, K. C. 2017. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17046.
  42. KYLE, R. A. & STEENSMA, D. P. 2011. History of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res*, 183, 3-23.
  43. LOCKWOOD, W. W., CHARI, R., CHI, B. & LAM, W. L. 2006. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *European Journal of Human Genetics*, 14, 139-148.
  44. LÓPEZ-CORRAL, L., SARASQUETE, M. E., BEÀ, S., GARCÍA-SANZ, R., MATEOS, M. V., CORCHETE, L. A., SAYAGUÉS, J. M., GARCÍA, E. M., BLADÉ, J., ORIOL, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. T., GIRALDO, P., HERNÁNDEZ, J., GONZÁLEZ, M., HERNÁNDEZ-RIVAS, J. M., SAN MIGUEL, J. F. & GUTIÉRREZ, N. C. 2012. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia*, 26, 2521-9.
  45. MANIER, S., SALEM, K., GLAVEY, S. V., ROCCARO, A. M. & GHOBRIAL, I. M. 2016. Genomic aberrations in multiple myeloma. *Plasma Cell Dyscrasias*. Springer.
  46. MAURA, F., RUSTAD, E. H., BOYLE, E. M. & MORGAN, G. J. 2020. Reconstructing the evolutionary history of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 33, 101145.
  47. MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11.
  48. MOREAU, P., KUMAR, S. K., SAN MIGUEL, J., DAVIES, F., ZAMAGNI, E., BAHLS, N., LUDWIG, H., MIKHAEL, J., TERPOS, E., SCHJESVOLD, F., MARTIN, T., YONG, K., DURIE, B. G. M., FACON, T., JURCZYSHYN, A., SIDANA, S., RAJE, N., VAN DE DONK, N., LONIAL, S., CAVO, M., KRISTINSSON, S. Y., LENTZSCH, S., HAJEK, R., ANDERSON, K. C., JOÃO, C., EINSELE, H., SONNEVELD, P., ENGELHARDT, M., FONSECA, R., VANGSTED, A., WEISEL, K., BAZ, R., HUNGRIA, V., BERDEJA, J. G., LEAL DA COSTA, F., MAIOLINO, A., WAAGE, A., VESOLE, D. H., OCIO, E. M., QUACH, H., DRIESSEN, C., BLADÉ, J., LELEU, X., RIVA, E., BERGSAGEL, P. L., HOU, J., CHNG, W. J., MELLQVIST, U. H., DYTFFELD, D., HAROUSSEAU, J. L., GOLDSCHMIDT, H., LAUBACH, J., MUNSHI, N. C., GAY, F., BEKSAC, M., COSTA, L. J., KAISER, M., HARI, P., BOCCADORO, M., USMANI, S. Z., ZWEEGMAN, S., HOLSTEIN, S., SEZER, O., HARRISON, S., NAHI, H., COOK, G., MATEOS, M. V., RAJKUMAR, S. V., DIMOPOULOS, M. A. & RICHARDSON, P. G. 2021. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*, 22, e105-e118.
  49. MUNSHI, N. C., ANDERSON, K. C., BERGSAGEL, P. L., SHAUGHNESSY, J., PALUMBO, A., DURIE, B., FONSECA, R., STEWART, A. K., HAROUSSEAU, J.-L. & DIMOPOULOS, M. 2011. Guidelines for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*, blood-2010-10-300970.
  50. MUNSHI, N. C. & AVET-LOISEAU, H. 2011. Genomics in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 17, 1234-1242.
  51. NEUSE, C. J., LOMAS, O. C., SCHLIEMANN, C., SHEN, Y. J., MANIER, S., BUSTOROS, M. & GHOBRIAL, I. M. 2020. Genome instability in multiple myeloma. *Leukemia*, 34, 2887-2897.

52. ORTEGA, M., MALLO, M., SOLÉ, F., SÁNCHEZ-MORATA, C., LÓPEZ-ANDREONI, L., MARTÍNEZ-MORGADO, N., GIRONELLA, M., VALCÁRCEL, D. & VALLESPÍ, T. 2013. 5q-syndrome and multiple myeloma diagnosed simultaneously and successfully treated with lenalidomide. *Leuk Res*, 37, 1248-50.
53. PADALA, S. A., BARSOUK, A., BARSOUK, A., RAWLA, P., VAKITI, A., KOLHE, R., KOTA, V. & AJEBO, G. H. 2021. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med Sci (Basel)*, 9.
54. PAIVA, B., ALMEIDA, J., PÉREZ-ANDRÉS, M., MATEO, G., LÓPEZ, A., RASILLO, A., VIDRIALES, M. B., LÓPEZ-BERGES, M. C., MIGUEL, J. F. S. & ORFAO, A. 2010. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78, 239-252.
55. PAIVA, B., GUTIERREZ, N., CHEN, X., VIDRIALES, M., MONTALBÁN, M.-Á., ROSINOL, L., ORIOL, A., MARTINEZ-LOPEZ, J., MATEOS, M. & LOPEZ-CORRAL, L. 2012. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*, 26, 1862-1869.
56. PAIVA, B., PUIG, N., CEDENA, M. T., DE JONG, B. G., RUIZ, Y., RAPADO, I., MARTINEZ-LOPEZ, J., CORDON, L., ALIGNANI, D., DELGADO, J. A., VAN ZELM, M. C., VAN DONGEN, J. J., PASCUAL, M., AGIRRE, X., PROSPER, F., MARTÍN-SUBERO, J. I., VIDRIALES, M. B., GUTIERREZ, N. C., HERNANDEZ, M. T., ORIOL, A., ECHEVESTE, M. A., GONZALEZ, Y., JOHNSON, S. K., EPSTEIN, J., BARLOGIE, B., MORGAN, G. J., ORFAO, A., BLADE, J., MATEOS, M. V., LAHUERTA, J. J. & SAN-MIGUEL, J. F. 2017a. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia*, 31, 382-392.
57. PAIVA, B., PUIG, N., CEDENA, M. T., DE JONG, B. G., RUIZ, Y., RAPADO, I., MARTINEZ-LOPEZ, J., CORDON, L., ALIGNANI, D., DELGADO, J. A., VAN ZELM, M. C., VAN DONGEN, J. J. M., PASCUAL, M., AGIRRE, X., PROSPER, F., MARTÍN-SUBERO, J. I., VIDRIALES, M. B., GUTIERREZ, N. C., HERNANDEZ, M. T., ORIOL, A., ECHEVESTE, M. A., GONZALEZ, Y., JOHNSON, S. K., EPSTEIN, J., BARLOGIE, B., MORGAN, G. J., ORFAO, A., BLADE, J., MATEOS, M. V., LAHUERTA, J. J. & SAN-MIGUEL, J. F. 2017b. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia*, 31, 382-392.
58. PANER, A., PATEL, P. & DHAKAL, B. 2020. The evolving role of translocation t(11;14) in the biology, prognosis, and management of multiple myeloma. *Blood Rev*, 41, 100643.
59. PETERSON, J. F., VAN DYKE, D. L., HOPPMAN, N. L., KEARNEY, H. M., SUKOV, W. R., GREIPP, P. T., KETTERLING, R. P. & BAUGHN, L. B. 2018. The utilization of chromosomal microarray technologies for hematologic Neoplasms: An ACLPS critical review. *American Journal of Clinical Pathology*.
60. RACK, K., VAN DEN BERG, E., HAFERLACH, C., BEVERLOO, H., COSTA, D., ESPINET, B., FOOT, N., JEFFRIES, S., MARTIN, K. & O'CONNOR, S. 2019. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*, 1.
61. RAJA, K. R., KOVAROVA, L. & HAJEK, R. 2010. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol*, 149, 334-51.
62. REMILY-WOOD, E. R., BENSON, K., BAZ, R. C., CHEN, Y. A., HUSSEIN, M., HARTLEY-BROWN, M. A., SPRUNG, R. W., PEREZ, B., LIU, R. Z. & YODER, S. J. 2014. Quantification of peptides from immunoglobulin constant and variable regions by LC-MRM MS for assessment of multiple myeloma patients. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 8, 783-795.
63. RIBATTI, D. 2018. A historical perspective on milestones in multiple myeloma research. *European journal of haematology*, 100, 221-228.
64. RIEGEL, M. 2014. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 37, 194-209.
65. ROBIQU DU PONT, S., CLEYNEN, A., FONTAN, C., ATTAL, M., MUNSHI, N., CORRE, J. & AVET-LOISEAU, H. 2017. Genomics of Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*, 35, 963-967.
66. RODRÍGUEZ-RIVEIRO, R., VELASCO, A. & SOTELO, C. G. 2022. The Influence of DNA Extraction Methods on Species Identification Results of Seafood Products. *Foods*, 11.
67. ROSHAL, M., FLORES-MONTERO, J. A., GAO, Q., KOEBER, M., WARDROPE, J., DURIE, B. G. M., DOGAN, A., ORFAO, A. & LANDGREN, O. 2017. MRD detection in multiple myeloma: comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. *Blood Adv*, 1, 728-732.
68. SATO, K., OKAZUKA, K., ISHIDA, T., SAKAMOTO, J., KANEKO, S., NASHIMOTO, J., UTO, Y., OGURA, M., YOSHIKI, Y. & ABE, Y. 2021. Minimal residual disease detection in multiple

- myeloma: comparison between BML single-tube 10-color multiparameter flow cytometry and EuroFlow multiparameter flow cytometry. *Annals of Hematology*, 100, 2989-2995.
69. SAWYER, J. R., TIAN, E., HEUCK, C. J., EPSTEIN, J., JOHANN, D. J., SWANSON, C. M., LUKACS, J. L., JOHNSON, M., BINZ, R., BOAST, A., SAMMARTINO, G., USMANI, S., ZANGARI, M., WAHEED, S., VAN RHEE, F. & BARLOGIE, B. 2014. Jumping translocations of 1q12 in multiple myeloma: a novel mechanism for deletion of 17p in cytogenetically defined high-risk disease. *Blood*, 123, 2504-12.
  70. SHAH, V., SHERBORNE, A. L., WALKER, B. A., JOHNSON, D. C., BOYLE, E. M., ELLIS, S., BEGUM, D. B., PROSZEK, P. Z., JONES, J. R., PAWLYN, C., SAVOLA, S., JENNER, M. W., DRAYSON, M. T., OWEN, R. G., HOULSTON, R. S., CAIRNS, D. A., GREGORY, W. M., COOK, G., DAVIES, F. E., JACKSON, G. H., MORGAN, G. J. & KAISER, M. F. 2018. Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia*, 32, 102-110.
  71. SHERRY, S. T., WARD, M.-H., KHOLODOV, M., BAKER, J., PHAN, L., SMIGIELSKI, E. M. & SIROTKIN, K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29, 308-311.
  72. SMADJA, N. V., BASTARD, C., BRIGAUDEAU, C., LEROUX, D. & FRUCHART, C. 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, 98, 2229-2238.
  73. SMETANA, J., FRÖHLICH, J., VRANOVÁ, V., MIKULÁŠOVÁ, A., KUGLÍK, P. & HÁJEK, R. 2011. Oligonucleotide-based array CGH as a diagnostic tool in multiple myeloma patients. *Klin Onkol*, 24, S43-S48.
  74. SMITH, N., KIMBERGER, K., PARRISH, C., CURRIE, S., BUTTERWORTH, S. & ALTY, J. 2019. Multiple myeloma with multiple neurological presentations. *Pract Neurol*, 19, 511-517.
  75. STEVENS-KROEF, M., WEGHUIS, D. O., CROOCKEWIT, S., DERKSEN, L., HOOIJER, J., ELIDRISSI-ZAYNOUN, N., SIEPMAN, A., SIMONS, A. & KESSEL, A. G. V. 2012. High detection rate of clinically relevant genomic abnormalities in plasma cells enriched from patients with multiple myeloma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51, 997-1006.
  76. STUPPIA, L., ANTONUCCI, I., PALKA, G. & GATTA, V. 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*, 13, 3245-76.
  77. TATHINENI, P., CANCAREVIC, I. & MALIK, B. H. 2020. Uncommon Presentations of Multiple Myeloma. *Cureus*, 12, e8400.
  78. VAN DE DONK, N., PAWLYN, C. & YONG, K. L. 2021. Multiple myeloma. *Lancet*, 397, 410-427.
  79. WALKER, B. A., BOYLE, E. M., WARDELL, C. P., MURISON, A., BEGUM, D. B., DAHIR, N. M., PROSZEK, P. Z., JOHNSON, D. C., KAISER, M. F. & MELCHOR, L. 2015. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *Journal of clinical oncology*, 33, 3911-3920.
  80. YLSTRA, B., VAN DEN IJSSEL, P., CARVALHO, B., BRAKENHOFF, R. H. & MEIJER, G. A. 2006. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic acids research*, 34, 445-450.
  81. ZANG, M., ZOU, D., YU, Z., LI, F., YI, S., AI, X., QIN, X., FENG, X., ZHOU, W., XU, Y., LI, Z., HAO, M., SUI, W., DENG, S., ACHARYA, C., ZHAO, Y., RU, K., QIU, L. & AN, G. 2015. Detection of recurrent cytogenetic aberrations in multiple myeloma: a comparison between MLPA and iFISH. *Oncotarget*, 6, 34276-87.
  82. ZHAN, F., HUANG, Y., COLLA, S., STEWART, J. P., HANAMURA, I., GUPTA, S., EPSTEIN, J., YACCOBY, S., SAWYER, J., BURINGTON, B., ANAISSIE, E., HOLLMIG, K., PINEDAROMAN, M., TRICOT, G., VAN RHEE, F., WALKER, R., ZANGARI, M., CROWLEY, J., BARLOGIE, B. & SHAUGHNESSY, J. D., JR. 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 108, 2020-8.



## ARTICOLE PUBLICATE

Autor principal:

1. **Dragoș ML**, Ivanov IC, Mențel M, Văcărean-Trandafir IC, Sireteanu A, Titianu AA, Dăscălescu AS, Stache AB, Jitaru D, **Gorgan DL**. Prognostic Value of Association of Copy Number Alterations and Cell-Surface Expression Markers in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(14):7530. <https://doi.org/10.3390/ijms23147530> (Articol ISI- I.F. - 6.2, Q1 -*Biologie Moleculară & Biochimie*; A.I.S.-1.06, Q2 -*Biologie Moleculară & Biochimie*);
2. **Dragoș, M. L.**, Ivanov, I. C., Trandafir-Văcărean, I. C., Jitaru, D., Mențel, M., & **Gorgan, L. D.** Optimization of plasma cell enrichment for cnv detection by snp array and mlpa. *Journal of Experimental and Molecular Biology*. J. Exp. Molec. Biol. 2022, DOI: 10.47743/jemb-2022-62 (Articol BDI).

Co-autor:

1. Vacarean-Trandafir, I. C., Ivanov, I. C., **Dragoș, L. M.**, Dascalescu, A. S., Titianu, A. A., & Cojocaru, D. (2019). ABL1 tyrosine kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia treatment resistance. *Revista: MOLECULAR BIOLOGY REPORTS*, 1-8, , Volume 46, Issue 4, pp 3747–3754. DOI: 10.1007/s11033-019-04816-5, (I.F.= 1.889; A.I.S.=0.4)
2. Trandafir, I. C. V., Ivanov, I. C., **Dragoș, L. M.**, Titianu, A. A., & Cojocaru, D. (2019) Detection of IG and TCR Monoclonality as a Molecular Marker in Acute Hematopathies. *REVISTA DE CHIMIE*, 70(2), p532-535. (I.F. =1.49; A.I.S. =0.13)
3. Ștefanache T, Forna N, Bădescu M, Jitaru D, **Dragoș ML**, Rezuș C, Diaconescu BM, Bădulescu O, Rezuș E, Ciocoiu M, Bădescu C. Modulation of the activity of certain genes involved in tumor cell metabolism in the presence of the cytotoxic peptides defensin and cathelicidin LL37. *Exp Ther Med*. 2019 Dec;18(6):5033-5040. doi: 10.3892/etm.2019.8117. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31819768; PMCID: PMC6895780. (I.F. = 0.47; A.I.S. =0.3)
4. Diaconescu, B. M., Jitaru, D., **Dragoș, M. L.**, Badescu, M., Stefanache, T., Ciocoiu, M., ... & Badescu, C. (2018). The Effect of Some Natural Cytotoxic Peptides on Tumor Cells. *REVISTA DE CHIMIE*, 69(3),p 597-601. (I.F. =1.49; A.I.S. =0.13)
5. Mihai, D. J., **Dragoș, L.**, Bădescu, C., Bădulescu<sup>1</sup>, O. A. N. A., Pleșoianu, C., Vasileu, T., & Ciocoiu<sup>1</sup>, M. B. (2018) Genomic Particularities of the Thrombophilic Status in Type 2

Diabetic Patients.revista Romanian Biotechnological Letters, Vol. No.X, (I.F. =0.59; A.I.S. =0.08)

6. Stefanache, T., Jitaru, D., **Dragos, M. L.**, Badescu, M., Diaconescu, B. M., Ciocoiu, M., ... & Badescu, C. (2018). Tumor Immune Response in the Presence of a Cytotoxic Peptide. REVISTA DE CHIMIE, 69(5), 1179-1186. (I.F. =1.49; A.I.S. =0.13)

## **PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE :**

### **A. Participare cu lucrare la conferințe internaționale**

#### **1. Conferința Internațională a SRBBM 2019, Iași, 26-27 Septembrie 2019**

- **Loredana M. Dragoș**, Iuliu C. Ivanov, Irina C. Vacarean Trandafir, Daniela Jitaru, Lucian Gorgan. *„Incidence of some Anomalies Assessed By Mlpa And Flow Cytometry in Patients with Multiple Myeloma”*.

#### **2. Conferința Internațională a SRBBM 2018, București, 05-07 Septembrie 2018**

- **Loredana M. Dragoș**, Iuliu C. Ivanov, Mihaela Mentel, Irina C. Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Valentina L. Nemtanu, Eugen Carasevici, Daniela Jitaru, Lucian Gorgan. *„Methods of investigation of genetic anomalies in multiple myeloma patients”*.
- I.C. Ivanov, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Pintilie, Daniela Jitaru, **Loredana Dragoș**, Mihaela Mentel, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Loredana Nemtanu, Angela Dascalescu, C. Danaila, I. Antohe, E. Carasevici. *„Identification of copy number variations using mlpa technique in chronic lymphocytic leukemia”*.
- Irina Cezara Văcărean Trandafir, Iuliu Ivanov, **Loredana Mihaiela Dragoș**, Mihaela Mențel, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Adriana Sireteanu, Eugen Carasevici, Daniela Jitaru, Dumitru Cojocar . *„Detection of ig and tcr monoclonality as a molecular marker in acute lymphoblastic leukemias”*.

#### **3. Conferința Institutului Regional de Oncologie, Iași, 23-26 noiembrie – CONFER 2018**

- **Loredana Mihaiela Dragos**, I. C. Ivanov, Mihaela Mentel, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Cristina Madalina Ștefan, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Valentina Loredana Nemtanu, E. Carasevici, Daniela Jitaru, L. Gorgan. „*Investigarea mielomului multiplu prin MLPA si SNParray*” – prezentare orala
- I. C. Ivanov, Carmen Cozmei, **Loredana Mihaiela Dragos**, Cristina Mădălina Ștefan, Mihaela Mentel, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Daniela Jitaru, E. Carasevici. „*Genotiparea EGFR in NSCLC- abordari tehnice , tesut versus biopsie lichida*”.
- Irina Cezara Vacarean Trandafir, I. C. Ivanov, **Loredana Mihaiela Dragos**, D. Cojocar. „*Determinarea mutatiilor in domeniul tirozin kinazic BCL-ABL1 implicate in rezistenta la tratament la pacientii cu leucemie mieloida cronica*”.

#### **4. Conferința Institutului Regional de Oncologie, Iași, 23-26 noiembrie – CONFER 2017**

- Daniela Jitaru, Anca Cristina Cecati, **Loredana Mihaiela Dragoș**, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, C.D. Dănăilă, Angela Dăscălescu „*Beta 2 micro-globulin and immunoglobulin light chain assessment in patients with multiple myeloma / MGUS*”.
- Amalia Titieanu, Diana Ichim, Georgiana Butură, Cristina Burcoveanu, I. Antohe, A. Cianga, Măriuca Timofte, Ioana Grigoraș, Iulia Jitaru, Irina Ristescu, Angelica Gata, **Loredana Dragoș**, C. Dănăilă, Angela Dăscălescu „*Diagnosticul aspergilozei invazive la pacienții cu malignități hematologice prin detecția PCR a ADN Aspergillus SPP din ser și lavaj bronșic – evaluarea a 52 de pacienți diagnosticați în IRO Iași*”

#### **B. Participare cu lucrare la conferințe naționale**

##### **1 A XIII-A Conferință Națională A Asociației de Medicină de laborator din România cu participare internațională, București , 25-27 mai 2022**

- **Loredana M. Dragos**, Iuliu C Ivanov, Elena Nisioi, Mihaela Mentel, Irina C. Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Amalia Titianu, Angela Dascalescu , Daniela Jitaru, Lucian Gorgan. „*The impact of deletion 16q – a poor prognosis factor in multiple myeloma*”.

##### **1. A 3-lea conferință națională a Asociației de Medicină de Laborator, Iași ,5-7 iunie 2019:**

- **Loredana Mihaiela Dragoș**, Iuliu Cristian Ivanov, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Valentina Loredana Nemtanu, Angela Dascalescu, Daniela Jitaru, Lucian Gorgan „*Investigarea pacientilor cu Mielom Multiplu prin imunofenotipare, MLPA si SNParray*”,.-prezentare orala

**2. Al 11-lea Congres național cu participare internațională și a 37-a Sesiune Științifică anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Constanța, 20-23 iunie 2019:**

- **Loredana M. Dragos**, Iuliu C. Ivanov, Irina C. Vacarean Trandafir, Cristina Madalina Stefan, Lucian Gorgan. „*Incidence of some anomalies assessed by MLPA and Flow Cytometry at patients with multiple myeloma in eastern Romania*”.

**3. Conferinta Nationala a Scolilor Doctorale din Consorțiul Universitaria, 31 octombrie-3 noiembrie 2018, Iasi, Romania:**

- **Loredana Mihaiela Dragoș**, Iuliu Cristian Ivanov, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Valentina Loredana Nemtanu, Lucian Gorgan. „*Studiul unor anomalii moleculare și citogenetice în mielomul multiplu*”.

**4. Al 2-lea Congres Național al Asociației de Medicină de Laborator, Bucuresti, 9-12 mai 2018**

- **Loredana Mihaiela Dragoș**, Iuliu Cristian Ivanov, Mihaela Mentel, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Valentina Loredana Nemtanu, Eugen Carasevici, Daniela Jitaru, Lucian Gorgan. „*Detectarea anomaliilor genetice prin SNParray la pacientii cu Mielom Multiplu*”.

**5. The 12th Edition of „Ecology and Protection of Ecosystems” Symposium Bacău, Romania, 2-4 noiembrie 2018**

- **Loredana Mihaiela Dragoș**, Iuliu Cristian Ivanov, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Adriana Sireteanu, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Daniela Jitaru, Lucian Gorgan. „*Characterization of some multiple myeloma cases from Regional Institute of Oncology, Iasi, Romania*”.

## 6 .Al XI-lea Congres Național de Citometrie, București, 17-21 octombrie 2017

- **Mihaiela Loredana Dragos**, Adriana Sireteanu, Iuliu Cristian Ivanov, Cornel Bujoran, Oana Elena Ciobanu, Mihaiela Zlei, Oana Maria Pintilie, Angela Dascalescu, Catalin Danaila, Irina Cezara Vacarean Trandafir, Daniela Jitaru. – prezentare orala . „*Cytogenetic and Immunophenotypic characterization of 22 multiple myeloma cases from Regional Institute of Oncology, Iasi, Romania*”,
- Irina Cezara Vacarean Trandafir, Iuliu Cristian Ivanov, **Mihaiela Loredana Dragos**, Oana Maria Pintilie , Daniela Jitaru. „*Mutations in the tyrosin kinase domain of ABL1 gene responsible for the acutisation process in chronic myeloid leukemia*”.
- Daniela Jitaru, Anca Cristina Cecati, Andreea Liteanu, Nicoleta Emanuela Achitei, **Loredana Mihaiela Dragos**, Mihaela Zlei, Oana Maria Pintilie, Angela Dascalescu. „*Flow Cytometry assesment of  $\beta 2$  micro-globulin and immunoglobulin light chains on plasma cell in corelation to plasma leve land immunofixation in patients with multiple myeloma/MGUS*”.
- Oana Maria Pintilie, Alina Mirela Veringu, Raluca Oana, Ioana Doina Popa, **Mihaiela Loredana Dragos**, Iuliu Cristian Ivanov, Adriana Sireteanu Cornel Bujoran, Oana Elena Ciobanu, Daniela Jitaru. „*Case raport: Co- existance of two malignant B cell (Burkitt lymphoma and CLL) in one patient, as detected by flow cytometry in correlation to cytogenetic data (FISH and karyotype)*”,