

ANUL 2023

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

Caracterizarea profilului mutațiilor somatice în adneocarcinomul pancreatic
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GHEORGHE CRISTIAN**

Student-doctorand:
BUNDUC ȘTEFANIA

ANUL 2023

Introducere si motivația tezei

Adenocarcinomul pancreatic (PDAC) are o incidență în creștere și un prognostic sumbru. Creșterea incidenței se datorează creșterii prevalenței factorilor de risc – obezitate, diabet zaharat creșterea speranței de viață. Supraviețuirea la cinci ani nu depășește o medie de 9% pentru toate stadiile de boală și nu a înregistrat o îmbunătățire remarcabilă în ultimele decenii în pofida progreselor majore din domeniul oncologiei. Pe de o parte - diagnosticul bolii în stadii avansate, non-elegibile pentru terapii cu viză curativă, iar pe de altă parte, rezistența crescută a acestuia la chimio-radioterapie pot explica acest fenomen.

Progresele remarcabile în domeniul geneticii și ingineriei biomedicale, au dus la descoperirea de mecanisme fiziopatologice subtile în special în patologii neoplazice și la o schimbare de paradigmă cu impact major în oncologie și nu numai – respectiv terapia personalizată – în funcție de profilul molecular tumoral. Efectul acestui fenomen în cancerul pancreatic însă este încă limitat.

Cunoașterea profilului mutational al cancerului pancreatic a devenit însă o premisă indispensabilă pentru un tratament care să ofere beneficii maxime pacientului. În ceea ce privește managementul, testarea genetică este actualmente recomandată în special pacienților cu stadii avansate de boală pentru ghidarea terapiilor țintite. În plus, eforturi de cercetare susținute adresează posibilitatea utilizării testelor genetice atât pentru un diagnostic precoce al bolii, cât și pentru evaluarea prognosticului acesteia.

În lucrarea de față abordăm două direcții principale în ceea ce privește caracterizarea profilului mutational în adenocarcinomul pancreatic – pe de o parte – posibilitatea utilizării probelor tumorale obținute prin puncție aspirativă cu ac fin sub ghidaj ecoendoscopic (EUS-FNA), pentru secvențiere genică de nouă generație (NGS) și pe de altă parte posibilitatea de a utiliza metode de biopsie lichidă pentru evaluarea prognosticului bolii.

Rezultate

În primul studiu am efectuat o analiza de cohortă. În perioada noiembrie 2018 și decembrie 2021, 105 pacienți cu PDAC confirmat prin EUS-FNA au fost incluși în studiu. Pentru FNA au fost folosite fie ace de 22 gauge (G) și de 19G. Un pasaj de FNA a fost dedicat extragerii de ADN. Concentrația (ng/uL) și puritatea (A260/280, A260/230) ADN au fost evaluate prin spectrofotometrie. Am evaluat diferențele în parametrii ADN în funcție de dimensiunea acului și de caracteristicile tumorale (dimensiune, locație) și calitatea ADN-ului extras pentru NGS (materialul adecvat definit ca $A260/280 \geq 1,7$ cantitatea de ADN: ≥ 10 ng pentru NGS țintit pe bază de ampliconi, ≥ 50 ng pentru secvențierea întregului exom [WES], ≥ 100 ng pentru secvențierea întregului genom [WGS]). În acest scop am efectuat analiza varianței și respectiv testul t pentru observații independente. De asemenea, am evaluat parametrii de puritate a ADN-ului între în raport cu cantitatea de ADN izolat. Cohorta noastră a inclus 49% bărbați, cu vârsta de $67,02 \pm 8,38$ ani. Acul de 22G a fost folosit în 71% din cazuri. Parametrii

ADN din probele noastre au variat după cum urmează: cantitatea de ADN: 1289 ng (inter interval de quartile: 534,75-3101), A260/280 = 1,85 (1,79-1,86), A260/230 = 2,2 (1,72-2,36). Am izolat > 10 ng ADN din toate probele și > 100 ng în 93% dintre acestea (o probă a produs < 50 ng ADN). Nu au fost diferențe semnificative de concentrație și A260/280 între probe în funcție de dimensiunea acului. Dimensiunea acului a fost singurul predictor independent al A260/230 care a fost mai mare în probele 22G (P = 0,038). Rata probe adecvate pt NGS a fost de 90% pentru acele de 19G, indiferent de tipul NGS, și pentru acele de 22G - 89% pentru adecvarea WGS și respectiv 91% pentru WES și NGS bazat pe ampliconi. Probele care au produs > 100 ng ADN au avut A260/280 semnificativ mai mare ($1,89 \pm 0,32$ vs $1,34 \pm 0,42$, P = 0,013). Caracteristicile tumorale nu au fost corelate semnificativ cu parametrii ADN. În concluzie, probele de adenocarcinom pancreatic prelevate prin puncție aspirativă cu ac fin sub ghidaj ecoendoscopic produc ADN adecvat pentru NGS. Cantitatea de ADN a fost similară între acele de FNA de 22G și 19G. Parametrii de puritate ai ADN pot varia indirect cu dimensiunea acului.

Pentru evaluarea rolului prognostic al markerilor de biopsie lichidă în PDAC am efectuat două studii de tip review sistematic și meta-analiză. Primul review sistematic a evaluat rolul prognostic al ADN-ului liber circulant (cfDNA) în adenocarcinomul ductal pancreatic (PDAC). Studiile eligibile au raportat diferențe în supraviețuirea globală (OS) și fără progresie de boală (PFS) în funcție de parametri cfDNA. Modelul cu efect aleatoriu a generat ratele hazard (HR) și intervalele de încredere de 95% (CI). Pozitivitatea biomarkerilor de cfDNA a fost definită ca: detectarea ADN-ului tumoral circulant (ctDNA), detectarea de mutații KRAS și alte modificări ale cfADN. În total, 38 de studii (3.318 pacienți) au îndeplinit criteriile de eligibilitate. Supraviețuirea fără progresie de boală (HR = 1,92, 95 % CI: (1,29, 2,86)) și supraviețuirea globală (HR = 2,25, 95 % CI:(1,73,2,92)) au fost semnificativ reduse în cazurile cu cfADN detectabil. Rezultate similare s-au obținut și în cazul detectării de mutații KRAS atât pentru PFS (HR = 1,88, CI:1,22,2,92); cât și pentru OS (HR = 1,52, 95% CI:(1,22,1,90)), incluzând în analiză toate stadiile de boală. Pentru stadiile non-rezecabile de boală, riscul de progresie a fost semnificativ mai mare în cazurile cu ctDNA detectabil (HR = 2,50, 95% CI:(1,94,3,23)). Rezultatele nu au fost similare pentru cazurile non-rezecabile cu mutații KRAS detectabile (HR = 1,16, 95 %CI:(0,46,2,94)). Pozitivitatea biomarkerilor cfDNA s-a corelat cu prognostic alterat și în stadiile rezecabile de boală și dacă a fost depistată în timpul tratamentului. În concluzie, biomarkerii cfDNA indică progresia accelerată a bolii și o scădere a supraviețuirii globale în PDAC. Sunt necesare studii suplimentare pentru stabilirea semnificației detectării mutațiilor KRAS în stadiile non-rezecabile de boală.

Cel de-al doilea review sistematic a evaluat rolul prognostic al biomarkerilor exosomalii în adenocarcinomul ductal pancreatic (PDAC). Au fost incluse în

review studiile care raportează diferențele în supraviețuirea globală (OS) și fără progresie de boală (PFS) la pacienții PDAC în funcție de statusul biomarkerilor exosomal circulanți. Modelul cu efect aleatoriu a estimat ratele de hazard multivariate (AHR) și univariate (UHR) și intervalele de confidență de 95% (CI) corespunzătoare. Unsprezece studii cuprinzând 634 de pacienți au fost eligibile pentru meta-analiză. Detectarea biomarkerilor exosomal a indicat un risc crescut de mortalitate precoce (UHR = 2,81, IC: 1,31 6,00, I2 = 88,7%, P < 0,001) și progresie a bolii (UHR = 3,33, IC:2,33 4,77, I2 = 0, P = 0,879) în diferite stadii ale PDAC. Detectarea biomarkerilor exosomal preoperatory la stadiile rezecabile au relevat un risc mai mare de mortalitate precoce (UHR = 5,55, CI: 3,24 9,49, I2 = 0, P = 0,898). Nu s-au decelat diferențe semnificative în supraviețuirea globală în stadiile non-rezecabile de boală cu biomarkeri exosomal pozitivi (UHR = 2,51, CI: 0,55 11,43, I2 = 90,3%, P <0,001). Decelarea anumitor tipuri de micro ARN exosomal s-a fost asociat mortalitate precoce (UHR = 4,08, CI: 2,16 7,69, I2 = 46,9%, P =0,152) în diferite stadii de boală. Aceste rezultatele reflectă potențialul biomarkerilor exosomal pentru evaluarea prognosticului în PDAC. Heterogenitatea asociată rezultatelor reflectă variabilitatea a metodelor utilizate în studiile care au raportat rezultate eligibile și necesitatea uniformizării lor în vederea utilizării acestui tip de biomarkeri în clinică.