

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL IV**

**Niculina MANG**



**REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT  
BIOMARKERI GENETICI ȘI METABOLICI ÎN  
PATOLOGIA PEDIATRICA**

**Conducător științific:**

**Prof. Univ. Dr. Andrei ANGHEL**

**TIMISOARA**

**2019**

# CUPRINS

<b>Lista lucrărilor publicate .....</b>	<b>V</b>
<b>Lista abrevierilor .....</b>	<b>IX</b>
<b>Indexul Figurilor .....</b>	<b>XII</b>
<b>Indexul Tabelelor .....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>XV</b>
<b>PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>1</b>
<b>1. BOLI CONGENITALE .....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipotiroidismul congenital .....	3
1.1.1. Epidemiologie .....	3
1.1.2. Etiologie .....	4
1.1.3. Clasificare .....	6
1.1.4. Diagnostic. Biomarkeri .....	9
1.1.5. Terapie.....	13
1.1.6. Prognostic si evolutie .....	13
1.2 Osteogeneza imperfecta .....	15
1.2.1.Generalitati .....	15
1.2.2. Epidemiologie .....	15
1.2.3. Etiopatogenie .....	16
1.2.4. Diagnostic .....	16
1.2.4.1. Metode de investigatie. Biomarkeri.....	16
1.2.4.2. Diagnosticul prenatal și postnatal .....	18
1.2.5. Clasificare.....	19
1.2.6. Terapie .....	21

<b>2. BIOMARKERI .....</b>	<b>23</b>
2.1. Definitie .....	23
2.2. Tipuri de biomarkeri.....	25
2.3. Metode de identificare și analiză .....	25
2.4.Biomarkeri in hipotiroidismul congenital.....	29
2.5..Biomarkeri in osteogeneza imperfecta.....	33
2.6.Vitamina D3 –biomarker in sanatate si patologie.....	35
 <b>PARTEA SPECIALĂ .....</b>	 <b>38</b>
1. Scopul și obiectivele studiului .....	38
1.1. Scopul studiului .....	38
1.2. Obiectivele studiului .....	38
2. Rezultate .....	39
2.1. Considerații privind prevalenta polimorfismului genei deiodinaza 2 iodotironina la copii cu hipotiroidism congenital din Vestul Romaniei si impactul acesteia asupra nivelului TSH .....	39
2.2. Consideratii privind terapia antiresorbtiivă cu pamidronat in tratamentul copiilor cu osteogeneza imperfecta .....	77
2.3. Consideratii privind posibilitatea introducerii vitaminei D ca biomarker in etiologia si evolutia artritei idiopatice juvenile .....	95
<b>CONCLUZII FINALE.....</b>	<b>110</b>
<b>CONTRIBUȚII PROPRII .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXE .....</b>	<b>132</b>

## INTRODUCERE

În realizarea dezideratului milenar, cel al medicinei personalizate, în care stabilirea predispoziției, diagnosticului și terapiei vor fi adaptate profilului individual, biomarkerii reprezintă un instrument de lucru indispensabil, ei fiind chemați să ofere informații personalizate despre profilul genic și metabolic, despre reacțiile la diferiți factori de mediu, de modificarea unor parametrii celulari și fiziologici în diferitele stadii ale unei boli, de răspuns la aplicarea unei terapii.

În acest context abordarea patologiei pediatrice are la dispoziție noi instrumente de investigare a etiologiei, diagnosticului și predispoziției unor boli complexe dintre care cele congenitale au primit în ultimul timp o atenție deosebită deoarece, în ciuda progreselor din medicina și a eforturilor de reducere a incidenței acestora, bolile congenitale dețin în continuare o pondere semnificativă în morbiditatea și mortalitatea infantilă. .

Pe această linie de preocupări se înscrie și studiul de față care și-a propus ca scop și obiective clarificarea și consolidarea valorii unor noi biomarkeri în abordarea unei patologii pediatrice complexe, în condițiile în care pe plan național nu se cunosc încă abordări multifactoriale ale acestei tematici, iar la nivel internațional există încă controverse.

## **PARTEA GENERALĂ**

Tulburările genetice și defectele la naștere reprezintă un procent ridicat al internărilor copiilor în spitale. Malformațiile congenitale și anomaliile cromozomiale sunt cele mai frecvente cauze ale mortalității infantile .

Hipotiroidismul congenital (HC) este cea mai frecventă afecțiune endocrină la vârsta pediatrică și determină deficiențe neurologice, motorii și de creștere, retardul mental ireversibil reprezentând cea mai redutabilă complicație.

Programele de screening neonatale pentru HC din ultimele patru decenii au fost eficiente diagnostic și benefice din punct de vedere economic. Copiii afectați sunt detectați foarte timpuriu după naștere, înainte ca simptomele clinice și semnele să devină evidente. Detectarea și tratamentul precoce previn morbiditatea, în special dizabilitățile neurologice.

În privința patogenezei hipotiroidismului congenital s-a evidențiat că deficiențele genetice sunt detectabile nu numai la pacienții cu disormonogeneză, dar și la pacienții cu defecte de dezvoltare ale tiroidei, care anterior au fost considerați a avea o tulburare sporadică . Cu toate acestea, deși testarea genetică moleculară poate clarifica cauza dishormonogenezei la majoritatea pacienților, baza moleculară a hipotiroidismului congenital la cei cu disgezie tiroidiană rămâne în mod predominant necunoscută.

Osteogeneza imperfecta sau o boala oaselor fragile este o afecțiune clinică, cu etiologie în genetica formării matricei și remodelării osoase, caracterizată prin masă osoasă scăzută, fragilitate și deformare osoasă, statură mică, sclera cenușie sau albastră și surditate.

Osteogeneza imperfecta sau o boala oaselor fragile este o afecțiune clinică, cu etiologie în genetica formării matricei și remodelării osoase, caracterizată prin masă osoasă scăzută, fragilitate și deformare osoasă, statură mică, sclera cenușie sau albastră și surditate.

Etiologia bolii este dată majoritar (peste 90%) de mutații dominante la nivelul genelor COL1A1 și COL1A2, mutații ce generează modificări cantitative și/sau calitative ale colagenului de tip I, componenta majoră a matricei extracelulare a oaselor și a pielii. O proporție de aproximativ 10% se datorează mutațiilor dominante sau recesive, la nivelul mai multor gene noncolagenice, implicate în procesarea post-translațională a procologanului I, în transportul colagenului la nivel intracelular, în semnalizarea specifică la nivelul osteoblastelor .

## **PARTEA SPECIALĂ**

Prezenta lucrare de doctorat își propune să aducă o contribuție în identificarea și evaluarea unor factori implicați în patologia pediatrică, în special în etiologia unor boli congenitale, factori cu valoare de biomarkeri în diagnostic și orientare terapeutică.

Un prim studiu urmărește evaluarea efectului disfuncției tiroidiene în anomaliile hematologice în sindromul Down (DS), cunoscând faptul că DS este asociat cu complicații multiple , între care există un risc crescut pentru leucemie și disfuncții tiroidiene . Investigatia de față este un studiu clinic care și-a propus să examineze distribuția cantitativă și calitativă a celulelor din sânge în pacienți cu DS fără leucemie sau tulburări tranzitorii ale mielopoiezei . În același timp s-a evaluat efectul disfuncției tiroidiene asupra acestor anomalii hematologice din DS.

Un alt studiu , având ca temă etiologia hipotiroidismului congenital cât și în evaluarea monoterapiei cu levotiroxină a acestuia, a investigat implicarea polimorfismului genei deodinaza 2 iodotironină.

În alt studiu , dedicat osteogenezei imperfecte, s-au evaluat biomarkerii metabolismului osos în evaluarea tratamentului cu pamidronat , iar în ultimul studiu,

dedicat artritei idiopatice juvenile, a fost investigata posibilitatea utilizării ca biomarker a vitaminei D, mai exact a formei plasmatice 25(OH)D, în evaluarea severității și duratei acestei afecțiuni.

Principalele obiective propuse și atinse în decursul stagiului doctoral au fost următoarele:

1. Proiectarea studiilor clinice, stabilirea loturilor de studiu și a lotului control, elaborarea criteriilor de includere și excludere din studiu, elaborarea fișei de consimțământ al pacientului, obținerea avizului comisiei de etică.
2. Stabilirea și optimizarea metodelor de laborator de analiză a parametrilor antropometrici, fiziologici și biochimici, precum și a metodelor de analiză a biomarkerilor din sânge.
3. Constituirea loturilor de pacienți și loturi control pe parcursul perioadei de studiu. Recoltarea, conservarea și analiza probelor biologice.
4. Centralizarea rezultatelor, analiza statistică și interpretarea datelor obținute.
5. Elaborarea concluziilor finale și stabilirea valorii de biomarker al profilului celular în sindromul Down, al polimorfismului deiodinazelor în cazul hipotiroidismului congenital, a vitaminei D în cazul artritei idiopatice juvenile și a markerilor metabolismului osos în cazul tratamentului cu pamidronat în osteogeneza imperfectă.
6. Diseminarea rezultatelor prin publicații în reviste de specialitate și participarea la conferințe cu tematica în domeniul temei de studiu.

## **REZULTATE SI DISCUTII**

Pacienții cu DS au prezentat o neutrofilie și o limfopenie mai mare decât au făcut pacienții DS și hipotiroidism și pacienții cu hipotiroidism. Surprinzător, pacienții cu DS au arătat un grad semnificativ de eozinopenie în sângele periferic. Interesant, hipotiroidismul a avut un efect atenuant asupra diferitelor linii celulare din probele de sânge. Constatările prezentului studiu susțin date anterioare din literatura privind modificările asociate DS în hemoleucograma. Studiul nostru arată, de asemenea, modificări ale numărului total de celule din sânge la pacienți fără leucemie cu DS în asocieră cu hipotiroidism. Efectul atenuant al disfuncției tiroidiene asupra schimbărilor în diferitele linii celulare sanguine, în contextul DS, este o observație nouă care merită analiză suplimentară în studii mai ample.

CBC significant differences between the three group of patients using Z score (P value < 0,05)

Celule sanguine	DS-ht vs ht			DS vs DS-ht			DS vs ht		
	Z score (P value)	%DS-ht	%ht	Z score (P value)	% DS	%Ds-ht	Z score (P value)	%DS	%ht
<b>Euzinofile</b>	↓ 2.11 (0,034)	46,2	11,8	--	--	--	↓ 3.09 (0,002)	70	11,8
<b>Neutrofile</b>	--	--	--	↑ 2.88 (0,003)	50	0	↑ 2.66 (0,007)	50	5,9
<b>Limfocite</b>	--	--	--	↓ 2.29 (0,022)	50	7,7	↓ 3.22 (0,001)	50	0

*ht: hipotiroidism; DS-ht: sindrom Down cu hipotiroidism; DS: sindrom Down fara hipotiroidism; ↑: crestere numar CBC ; ↓: scadere numar CBC ; --: diferente nesemnificative..*

Investigarea prevalenței polimorfismului genei deiodinaza 2 iodotironina Ala92Thr la copii cu hipotiroidism congenital din Vestul României și impactul acesteia asupra nivelului TSH a demonstrat ca la pacienții cu valori ridicate ale TSH după tratamentul cu levotiroxina, genotipurile AA au fost semnificativ mai prevalente ( $p = 0,044$ ) decât genotipurile TT și AT.

Această corelație se explică printr-o afectare funcțională a deiodinazei D2 generată de polimorfismul AA, afectare care va reduce conversia  $T4 \rightarrow T3$  și în aceste condiții chiar dacă nivelul plasmatic al T4 este normal, scăderea cantității de T3 (hormonul tiroidian efector) va afecta restabilirea completă a funcției tiroidiene. Efectul va fi mai pronunțat la nivelul creierului unde peste 80% din T3 este rezultatul activității deiodinazei 2, iar acest lucru va afecta procesul de diferențiere al țesutului cerebral mediat de hormonul tiroidian.

Rezultatele studiului arată că, pentru polimorfismul genei D2 Ala92Thr, genotipul AA poate fi defavorabil pentru realizarea eutiroidismului la pacienții cu CH tratați cu levotiroxină, și prin urmare, politerapia ar putea fi considerată o abordare mai bună la acești pacienți.

Investigarea efectelor terapiei antiresorbtivă cu pamidronat în tratamentul copiilor cu osteogeneza imperfectă a urmărit promovarea experienței în tratamentul

osteogenezei imperfecte în condițiile în care nu există un consens în ceea ce privește forma optimă, doza sau durata terapiei cu bifosfonati.

Tratamentul cu pamindronat, administrat prin perfuzii intravenoase administrat (0.5 mg/kg – prima doza, urmată de doza următoare 1 mg/kg/ciclu) într-o perioadă de 3-4 ore, la fiecare 3 luni, timp de 3 ani) a demonstrat o toleranță bună, fără efecte sau evenimente adverse, fără afectarea pubertății.

Evaluarea tratamentului s-a realizat pe baza parametrilor clinici (creșterea înălțimii, mobilitate, DMO, scăderea durerii și numărului de fracturi), a biomarkerilor caracteristici (fosfataza alcalină serică și fosfataza alcalină specific osoasă, osteocalcina și beta-C-telopeptidele serice (bCTX) ) și a evaluării îmbunătățirii calității vieții. Tratamentul s-a dovedit eficient, pacienții ajungând la o înălțime normală în funcție de sex și de vârsta lor ulterioară .

Alte efecte descrise la pacienții noștri au fost: mobilitate crescută și DMO evidențiate prin scor Z la evaluarea DXA, scăderea durerii și ratei fracturilor și îmbunătățirea calității vieții.

Investigarea biomarkerilor specifici țesutului osos au arătat ca fosfataza alcalină specific osoasă prezintă o bună corelație între aspectele clinice și evoluția sub tratament ( $p < 0,05$ ) la fel fiind și osteocalcina și beta-C-telopeptidele serice (bCTX), în timp ce fosfataza alcalină serică nu s-a corelat nici cu evoluția clinică nici cu numărul de fracturi.

Investigarea posibilității introducerii vitaminei D ca biomarker în etiologia și evoluția artritei idiopatice juvenile corespunde tendințelor de cercetare în domeniu deoarece în ciuda nivelelor mai scăzute ale vitaminei D la copiii cu artrită juvenilă, interpretarea rezultatelor este problematică și controversată, deoarece nu există o definiție acceptată a deficienței vitaminei D în această categorie și ca urmare standardizarea nivelelor de vitamina D la populația pediatrică și în special în artrita juvenilă devine o cerință. În același timp nu există un studiu privind efectul suplimentării cu vitamina D asupra activității sau a rezultatelor bolii în artrita juvenilă.

Rezultatele studiului sunt similare celor din literatură : 66% dintre copiii din grupul AJI au deficit de vitamina D și 27% insuficiență de vitamina D, totalizând 93% din lotul de studiu cu nivele sub valorile normale de vitamina D.

Tot în cadrul studiului s-au obținut corelații semnificativ statistice ( $p < 0.05$ ) între severitatea bolii (numărul de articulații cu leziuni radiologice evidente ) și durata bolii. În ce privește categoriile de AJI cele mai afectate de deficit al vitaminei D acestea sunt



formele poliarticulare sistemice și cele cu factor reumatoid pozitiv, și din acest motiv aceste afecțiuni trebuie supuse unui screening de rutină pentru identificarea deficitului de vitamină D și, în consecință, tratate prin administrare suplimentară de vitamina D.

Studiul de față a reprezentat o abordare complexă a factorilor implicați în etiopatogenia și managementul unor boli pediatrice. S-a demonstrat o asocieră între răspunsul la terapie în hipotiroidismul congenital și polimorfismul particular al D2 deiodinazelor, între terapia cu pamindronat în osteogeneza imperfectă și markerii de diagnostic, monitorizare și prognostic, precum și între nivelul vitaminei D3 și etiologia și managementul artritei juvenile idiopatice .

## CONCLUZII

1. Studiul are ca principal scop aducerea unor contribuții la identificarea și evaluarea unor factori implicați în patologia pediatrică, în special în etiologia unor boli congenitale, factori cu valoare de biomarkeri în diagnostic și orientare terapeutică

2. Obiectivele studiului au constat în stabilirea valorii de biomarker al polimorfismului deiodinazelor în cazul hipotiroidismului congenital, a vitaminei D în cazul artritei idiopatice juvenile și a markerilor metabolismului osos în cazul tratamentului cu pamidronat în osteogeneza imperfectă.

3. Investigarea prevalenței polimorfismului genei deiodinaza 2 iodotironina Ala92Thr la copii cu hipotiroidism congenital din Vestul României și impactul acesteia asupra nivelului TSH a demonstrat că la pacienții cu valori ridicate ale TSH după tratamentul cu levotiroxina, genotipurile AA au fost semnificativ mai prevalente ( $p = 0,044$ ) decât genotipurile TT și AT. Această corelație se explică printr-o afectare funcțională a deiodinazei D2 generată de polimorfismul AA, afectare care va reduce conversia  $T4 \rightarrow T3$  și în aceste condiții chiar dacă nivelul plasmatic al T4 este normal, scăderea cantității de T3 (hormonul tiroidian efector) va afecta restabilirea completă a funcției tiroidiene. Efectul va fi mai pronunțat la nivelul creierului unde peste 80% din T3 este rezultatul activității deiodinazei 2, iar acest lucru va afecta procesul de diferențiere al țesutului cerebral mediat de hormonul tiroidian.

Rezultatele noastre sugerează că, pentru polimorfismul genei D2 Ala92Thr, genotipul AA poate fi defavorabil pentru realizarea eutiroidismului la pacienții cu CH

tratati cu levotiroxină, prin urmare, politerapia ar putea fi considerată o abordare mai bună la acești pacienți.

4. Investigarea efectelor terapiei antiresorbtivă cu pamidronat in tratamentul copiilor cu osteogeneza imperfecta a urmarit promovarea experientei in tratamentul osteogenezei imperfecte in conditiile in care nu există un consens în ceea ce privește forma optimă, doza sau durata terapiei cu bifosfonati.

Tratamentul cu pamindronat, administrat prin perfuzii intravenoase administrat (0.5 mg/kg – prima doza, urmata de doza urmatoare 1 mg/kg/ciclu) intr-o perioada de 3-4 ore, la fiecare 3 luni timp de 3 ani) a demonstrat o toleranță bună, fără efecte sau evenimente adverse, fara afectarea pubertatii. Evaluarea tratamentului s-a realizat pe baza parametrilor clinici (cresterea inaltimii, mobilitate, DMO, scăderea durerii și numărului de fracturi), a biomarkerilor caracteristici (fosfataza alcalina serica si fosfataza alcalină specific osoasă, osteocalcina și beta-C-telopeptidele serice (b-CTx) ) și a evaluării îmbunătățirii calității vieții. Tratamentul s-a dovedit eficient, pacientii ajungand la o înălțime normală în funcție de sex și de vârsta lor ulterioară . Alte efecte descrise la pacienții noștri au fost: mobilitate crescută și DMO evidențiate prin scor Z la evaluarea DXA, scăderea durerii și ratei fracturilor și îmbunătățirea calității vieții.

Investigarea biomarkerilor specifici tesutului osos au aratat ca fosfataza alcalină specific osoasă prezintă o bună corelație între aspectele clinice și evoluția sub tratament ( $p < 0,05$ ) la fel fiind si osteocalcina si beta-C-telopeptidele serice (b-CTx), in timp ce fosfataza alcalina serica nu s-a corelat nici cu evolutia clinica nici numărul de fracturi

5. Investigarea posibilitatii introducerii vitaminei D ca biomarker in etiologia si evolutia artritei idiopatice juvenile corespunde tendintelor de cercetare in domeniu deoarece in ciuda nivelelor mai scăzute ale vitaminei D la copiii cu artrită juvenilă, interpretarea rezultatelor este problematică si controversata , deoarece nu există o definiție acceptata a deficienței vitaminei D în această categorie si ca urmare standardizarea nivelelor de vitamina D la populația pediatrică și în special în artrita juvenilă devine o cerință .In același timp nu există un studiu privind efectul suplimentării cu vitamina D asupra activității sau a rezultatelor bolii în artrita juvenilă.

Rezultatele noastre sunt similare celor din literatura, chiar și mai dramatice: 66% dintre copiii din grupul AJI au deficit de vitamina D și 27% insuficiență de vitamina D, totalizând 93% din lotul de studiu cu nivele sub valorile normale de vitamina D. Tot

in cadrul studiului nostru s-au obținut corelații semnificativ statistice ( $p < 0.05$ ) între severitatea bolii (numărul de articulații cu leziuni radiologice evidente ) si durata bolii. In ce privește categoriile de AJI cele mai afectate de deficit al vitaminei D acestea sunt formele poliarticulare sistemice și cele cu factor reumatoid pozitiv, si din acest motiv aceste afecțiuni trebuie supuse unui screening de rutină pentru identificarea deficitului de vitamină D și, în consecință, tratate prin administrare suplimentara de vitamina D.

6. Studiul de față a reprezentat o abordare complexă a factorilor implicați în etiopatogenia si managementul unor boli pediatrice. S-a demonstrat o asociere între raspunsul la terapie in hipotiroidismul congenital si polimorfismul particular al deiodinazelor, între terapia cu pamindronat in osteogeneza imperfecta si markerii de diagnostic, monitorizare si prognostic, precum si in investigarea posibilitatii ca vitamin D sa devina un biomarker important in etiologia si managementul artritei juvenile idiopatice .

7. Rezultatele studiului au evidente aplicații practice in investigație și terapie.

In cazul tratamentului de substitutie al hipotiroidismului congenital, in cazurile in care normalizarea nivelului seric de T4, in urma terapiei de substitutie cu levotiroxina, nu este urmata si de o normalizare a nivelului ridicat de TSH, se impune analiza polimorfismului genei D2 Ala92Thr , iar in caz de existent a profilului AA, se impune o introducere in tratamentul de substitutie si a hormonului T3 pana la normalizarea nivelului TSH.

In cazul tratamentului osteogenezei imperfecta se recomanda tratamentul cu pamindronat, administrat prin perfuzii intravenoase administrat (0.5 mg/kg – prima doza, urmata de doza urmatoare 1 mg/kg/ciclu) intr-o perioada de 3-4 ore, la fiecare 3 luni timp de 3 ani), pe termen mai indelungat, 3 ani, iar monitorizarea tratamentului sa tina cont in special de normalizarea valorilor fosfatazei alcaline specific osoasa.

In analiza etiologica si tratamentul artritei idiopatice juvenile un element necesar este investigarea nivelului seric al vitaminei D, forma 25(OH)D<sub>3</sub> serica, iar in caz de insuficienta sau deficit sa se instituie tratament de suplimentare cu vitamina D pana la normalizarea valorilor . Studii ulterioare vor putea stabili daca se vor adopta si variante in care sa fie introdusa si vitamina K . Datorita solicitarilor tesutului osos pe perioada de crestere monitorizarea nivelului de vitamina D va trebui extinsa cel putin pana la oprirea procesului de crestere .

Designul experimental si metodologia, utilizate in cazul investigarii polimorfismului genic al deiodinazelor in hipotiroidismul congenital poate fi utilizat si in alte maladii in care exista nivele ridicate de TSH concomitent cu valori normale de T4, in conditiile excluderii altor etiologii posibile .

