

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

**PARTICULARITĂȚI IMUNOLOGICE ALE
PACIENTELOR CU NEOPLAZIE CERVICALĂ
PREINVAZIVĂ
- Rezumat teză de doctorat -**

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

ACAD. PROF. DR. FI. STAMATIAN

DOCTORAND

DR. ROTAR IOANA CRISTINA

CLUJ-NAPOCA

2011

CUPRINS

CUPRINS	2
ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEZĂ	4
PARTEA ÎNTÂI. DATE DIN LITERATURĂ	6
I. INTRODUCERE	6
I.1. Importanța problemei. Argument	6
I.2. Epidemiologie	7
II. ANATOMIE, EMBRIOLOGIE ȘI HISTOLOGIE CERVICALĂ	8
III. NEOPLAZIILE INTRAEPITELIALE CERVICALE	10
III.1. Definiție	10
III.2. Factori de risc pentru neoplazia intraepitelială cervicală	10
III.3. Istoric. Clasificare. Istoria naturală	12
III.4. Screening. Definiție. Metode utilizate în screening-ul cervical	18
III.5. Recomandări actuale privind screening-ul cervical	23
III.6. Metode de tratament	24
III.7. Prognostic după tratament	28
IV. INFECȚIA CERVICALĂ CU VIRUSUL PAPILOMA DE TIP UMAN	29
IV.1. Infecția HPV și neoplaziile intraepiteliale	29
IV.2. Tulpinile HPV	29
IV.3. Genomul HPV	30
IV.4. Metode de detectare a ADN-ului viral	32
IV.5. Utilitatea clinică actuală a testării HPV	34
IV.6. Infecția HPV: istoria naturală și carcinogeneza cervicală	35
IV.7. Implicarea HPV în neoplazii cu altă localizare față de cea cervicală	36
IV.8. Vaccinarea anti-HPV	36
V. MODIFICĂRI IMUNOLOGICE ÎN INFECȚIA HPV ȘI CARCINOGENEZA CERVICALĂ	38
V.1. Organizarea sistemului imun	38
V.2. Răspunsul sistemului imun la infecția HPV	38
V.3. Relația răspuns imun – carcinogeneza în cadrul infecției HPV și cancer cervical	43
VI. POLIMORFISMUL GENETIC	46
VI.1. Definiție	46
VI.2. Clasificarea polimorfismelor genetice	46
VI.3. Polimorfismele genelor interleukinelor și neoplazia cervicală intraepitelială	47
PARTEA A DOUA. CONTRIBUȚII PERSONALE	49
VII. SCOP ȘI OBIECTIVE	49
VIII. MATERIAL ȘI METODA	50
VIII.1. Designul studiului. Criterii de includere/excludere pentru lotul caz respectiv martor	50
VIII.4. Extragerea ADN-ului genomic. Analiza ADN-ului	56
VIII.5. Metode utilizate pentru analiza statistică	57
IX. CARACTERISTICILE LOTULUI STUDIAT	59
X. POLIMORFISMELE IL4	64

X.1. Polimorfismul -590C>T al IL-4	64
X.2. Polimorfismul repetat de 70 bp al intronului 3 – IL 4	82
X.3. Analiza integrată a polimorfismelor IL-4 studiate	99
XI. POLIMORFISMUL IL1 β -511C>T	101
XI.1. Introducere	101
XI.2. Material și metodă	102
XI.3. Rezultate	103
XI.4. Discuții	109
XI.5. Concluzii parțiale	119
XII.POLIMORFISMUL IL6-174 G>C	121
XII.1. Introducere	121
XII.2. Material și metodă	121
XII.3. Rezultate	123
XII.4. Discuții	129
XII.5. Concluzii parțiale	138
XIII. POLIMORFISMUL IL-10 -1082 G>A	141
XIII.1. Introducere	141
XIII.2. Material și metodă	142
XIII.3. Rezultate	143
XIII.4. Discuții	149
XIII.5. Concluzii parțiale	162
XIV. ANALIZA INTEGRATĂ A POLIMORFISMELOR, NEOPLAZIA INTRAEPITELIALĂ CERVICALĂ ȘI INFECȚIA HPV	164
XV. CONCLUZII FINALE	172
XVI. DISCUȚII GENERALE	174
XVII. CONTRIBUȚII PERSONALE	176
REFERINȚE	177

CUVINTE CHEIE: HPV, neoplazie intraepitelială cervicală, IL 4, IL 1 β , IL 6, IL10, polimorfism genetic, PCR-RFLP, PCR

INTRODUCERE

Infecția HPV reprezintă în prezent cea mai frecventă maladie cu transmitere sexuală. Riscul estimat de a trece printr-o infecție HPV pe parcursul vieții este de 50-80%. Totuși, paciențele care vor dezvolta o neoplazie intraepitelială este incomparabil mai mic, ceea ce conduce spre ideea existenței unui factor predispozant care ține, probabil, de sistemul imun al gazdei. Profesorul zur Hausen a primit premiul Nobel pentru Medicină, demonstrând rolul HPV în carcinogeneza cervicală. Cercetările actuale încearcă să determine factorii cu rol în eliminarea spontană a virusului.

Se cunosc în prezent peste 100 de tulpini HPV, din care aproximativ 40 au tropism genital. Virusul odată pătruns la nivelul epiteliului scuamos, de obicei prin microeroziuni rezultate în urma contactului sexual, persistă la acest nivel în stare epizomală sau în stadiile mai avansate integrat în nucleu, intereferând apoi cu mijloacele de control ale ciclului celular.

Accesabilitatea colului a permis realizarea citologiei exfoliative ce a fost utilizată ca și metodă de screening la nivel populațional, cu consecințe importante în țările civilizate asupra mortalității și morbidității prin cancer cervical. În prezent se discută din ce în ce mai mult despre oportunitatea introducerii testării HPV în screening-ul cervical odată cu progresul tehnicilor de biologie moleculară. În urma aplicării la nivel populațional a screening-ului a crescut ponderea neoplaziilor intraepiteliale. Studiile privind istoria naturală a infecției HPV au arătat că % din leziunile de HSIL se vindecă spontan. Aplicarea unor tratamente leziunilor de grad înalt se poate asocia cu consecințe obstetricale indiferent de procedul terapeutic utilizat (crescut de naștere prematură, greutate mică la naștere și ruptură prematură de membrane).

Ciclul de viață al infecției HPV eludează parțial sistemul celulelor dendritice și Langerhans. Absența efectului citopat, abilitatea de a se replica fără a induce moartea celulară și semnale proinflamatorii favorizează persistența virală. Prin acest mecanism sunt inactivate sau parțial activate celulele dendritice cu limitarea abilității acestora de a migra în ganglionii regionali. Fenomenul de toleranță imunologică apare în condițiile activării parțiale a celulelor prezentatoare de antigene cu absența inițierii dezvoltării de către limfocite a unui răspuns antigen specific. Limfocitele tolerante vor fi astfel incapabile să răspundă în cazul expunerii ulterioare la antigenele HPV.

Un al doilea mecanism prin care virusul scapă de sistemul imun înăscut este reprezentat de controlul strict al replicării virale. Exprimarea în cantități reduse a proteinelor virale, în principal E6 și E7, la nivelul straturilor bazale și intermediare imediat adiacente produce o activare suboptimală a celulelor Langerhans. În plus, producerea virionilor înalt imunogeni are loc în straturile apicale privilegiate din punct de vedere imun. În mod particular virionii nu duc la activarea celulelor Langerhans în caz de fixare. Mai mult, la nivelul zonei de transformare infectate HPV, în condițiile de dezvoltare a neoplaziei intraepiteliale se constată o reducere a numărului de celule Langerhans și o modificare a fenotipului acestora.

Interleukinele sunt molecule ce permit comunicarea diferitelor celule ale sistemului imun. Activarea sistemului imun în cadrul unei infecții de exemplu HPV duce la modularea a producției de interleukine. Mai multe studii au arătat un shift al balanței Th1-Th2 înspre Th2 la pacientele infectate HPV.

Prezența unui polimorfism genetic la nivelul unei gene poate influența secreția acesteia, diferitele genotipuri asociindu-se cu un nivel secretor redus, intermediar sau maxim.

Studiile anterioare care au analizat relația între polimorfismele genelor interleukinelor, deși puține, și realizate pe un număr redus de pacienți, au creat premisa prezentei cercetări.

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul de față de tip caz-martor s-a desfășurat în perioada 1 februarie 2008 – 30 iunie 2010 în Clinica Obstetrică Ginecologie I Cluj Napoca. Criteriile de includere pentru cazuri au fost reprezentate de citologie diferită de negativ pentru leziune intraepitelială malignă (NILM) și testare pozitivă pentru tuplinile HPV-HR (Human Papiloma Virus High Risk). Am inclus în lot categoriile: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL și CIS, totalizând astfel 128 de paciente pozitive la testarea HPV-HR. Lotul martor a cuprins paciente cu diagnosticul citologic NILM, negative de asemenea la testarea HPV-HR; în total 111 paciente au respectat criteriilor de includere, fiind incluse în prezentul studiu. Un criteriu de excludere comun pentru cele două loturi a fost dorința expresă a pacientei de a nu participa la studiu.

Fiecare pacientă, cu ocazia vizitei, a fost examinată clinic, practicându-se un consult ginecologic, colposcopie, precum și prelevarea de probe cervicale și a 2 ml de sânge. Din probele cervicale s-a realizat examenul citologic, rezultatul fiind exprimat în sistemul Bethesda și

testarea HPV-HR utilizând kitul Viroactiv de la Virofem®. Din probele de sânge s-a extras ADN-ul, utilizând kitul Wizzard Genomic DNA Purification Kit, Promega®. Probele de ADN au fost stocate apoi la congelator la -20°C, fiind apoi utilizate pentru genotipare.

POLIMORFISMELE IL4

IL4 face parte din familia moleculelor de răspuns Th2, având un rol important în răspunsul imun umoral și inducerea sintezei de anticorpi. În urma stimulării animalelor de laborator (șoarece) cu particule VLP L1 HPV 16 similare celor din vaccinurile aflate pe piață se obține un răspuns mixt Th1/Th2 cu evidențierea unor nivele crescute de IL4, ceea ce sugerează în istoria naturală a infecției HPV. Au fost analizate, în raport cu neoplazia intraepitelială, două polimorfisme ale IL4: polimorfismul repetat de 70 perechi de baze al intronului 3, precum și polimorfismul -590 C>T .

Cele două polimorfisme au fost determinate prin metoda PCR-RFLP, respectiv PCR, după protocoale descrise de Pontes CC și, respectiv, Mout R. Nu s-a detectat existența unei asocieri lineare între cele două polimorfisme și infecția HPV. De asemenea, nu au fost găsite diferențe semnificative la compararea frecvențelor alelice între clasele de neoplazie intraepitelială. Genotipul -590 C/C, respectiv 3R/3R sunt semnificativ mai frecvent întâlnite la pacientele cu CIS față de cele cu HSIL ($p=0.0422$).

POLIMORFISMUL – 511 C>T al IL1 β

Interleukina 1 β are un efect proinflamator, fiind studiată în relație cu mai multe neoplazii, în cancerul ovarian având chiar un rol prognostic. Studii anterioare au arătat un nivel crescut al acestei interleukine în lichidul de lavaj cervicovaginal la pacientele cu cancer cervical. Genotipul T/T este asociat unei secreții maxime, genotipul C/T unui nivel intermediar, în timp ce în cazul genotipului C/C nivelul secretor este minim.

Genotiparea IL-1 β -511 a fost realizată printr-un protocol de tip PCR-RFLP descris de Ishii T. Nu există asociere liniară între polimorfismul -511 al IL1 β și neoplazia intraepitelială. Nu s-au detectat diferențe semnificative în ceea ce privește frecvențele alelice, precum și

frecvențele genotipurilor atât la compararea globală, cât și în cazul analizei pe clase de neoplazie intraepitelială.

POLIMORFISMUL IL6-174 G>C

Interleukina 6 are o acțiune proinflamatorie cu rol central în mecanismele centrale de apărare ale gazdei. Atât în infecția HPV, cât și în cazul celulelor tumorale cervicale, nivelele IL6 sunt crescute. Polimorfismul IL6 -174 este localizat la nivelul promoterului, regiune cheie în transcripție. Astfel, datele din literatură susțin asocierea unui nivel scăzut genotipului C/C, intermediar – C/G, în timp ce în cazul IL6 nivelul secretor este maxim pentru genotipul G/G.

Polimorfismul -174 al IL6 a fost determinat cu ajutorul unui protocol de PCR-RFLP descris de Kristiansen OP. Nu s-a dovedit existența unei asocieri liniare între neoplazia intraepitelială cervicală și polimorfismul -174 al IL6. Analiza pe clase de neoplazie intraepitelială cât și compararea globală a lotului caz și martor nu au furnizat rezultate semnificative. La lotul de studiu prezența alelei C reprezintă un factor protector pentru neoplazie (genotip C/C OR –0.48 în cazul CIS).

POLIMORFISMUL IL10-1082 G>A

Interleukina 10 are o acțiune inhibitorie asupra citokinelor proinflamatorii, exercitând o acțiune inhibitorie asupra activității celulelor Th1, precum și asupra celulelor prezentatoare de antigene, cu posibil efect pozitiv asupra dezvoltării tumorale. Producerea sa de către keratinocite, sediul infecției HPV sugerează un posibil rol în carcinogeneza cervicală.

Polimorfismul -1082 G>A al IL 10 a fost determinat utilizând protocolul de PCR-RFLP descris de Guo W. Nu există asociere liniară între prezența polimorfismului și neoplazia cervicală. Diferențele în ceea ce privește frecvența genotipurilor și neoplazia intraepitelială nu au fost semnificative, cu excepția întâlnirii semnificativ mai frecvente a genotipului A/A în leziunile CIS față de LSIL ($p=0.0494$), respectiv CIS și HSIL față de LSIL ($p=0.0396$). În cazul lotului de studiu prezența alelei variante A reprezintă un factor de risc pentru neoplazie (OR=2.75 - CIS/martor).

DISCUȚII

Cercetarea de față a încercat să creioneze un profil de risc pentru răspunsul la infecția HPV și neoplazia intraepitelială cervicală. Rezultatele obținute pentru fiecare polimorfism în parte nu au arătat o asociere liniară cu neoplazia intraepitelială cervicală. De asemenea, analiza integrată a polimorfismelor nu a arătat vreo asociere. Aceste date converg cu contextul fiziopatogenetic al infecției HPV în urma căreia se declanșează o cascadă de interleukine care își modulează reciproc acțiunile. Deloc de neglijat, în afara rețelei de interleukine mai pot acționa și alți factori locali ce pot modifica semnificativ nivelul acestora.

Studiul prezent nu a realizat o determinare a nivelului seric și nici local, datorită limitărilor legate, în principal, de costuri. Chiar și o determinare a acestora poate crea confuzii nivelul lor prezentând fluctuații în funcție de diverși factori, cum ar fi fazele ciclului menstrual sau alimentația, fiind necesară o analiză pertinentă care să înlăture acești factori de eroare. Sunt necesare studii suplimentare, preferabil multicentrice, care să ia în considerare atât nivelul local, cât și cel seric; mai multe interleukine cu o realizare ideală a secvențării întregii gene și care suplimentar ar trebui să țină cont și alți factori ce interferă cu nivelul local sau chiar mai mult se leagă la nivelul promoterului, influențând transcripția.

Lucrarea crează premise optimiste: trei genotipuri sunt semnificativ mai frecvent asociate leziunilor de tip CIS (genotipul C/C IL 4 -590, genotipul T/T-590 IL4 și respectiv genotipul A/A al IL10-1082), dar de aici până la includerea lor în sisteme de scor prognostic care să justifice o conduită mai agresivă mai este o cale lungă de parcurs.

CONCLUZII FINALE

1. Toate polimorfismele luate în studiu au fost prezente în populația luată în studiu.
2. Nu există asociere liniară între nici unul din polimorfismele luate în studiu și infecția HPV.
3. Regresia logistică nu a arătat o asociere între cele cinci polimorfisme determinate și neoplazia intraepitelială cervicală.
4. Genotipul C/C IL 4 -590 este semnificativ mai frecvent întâlnit în CIS față de HSIL.
5. Genotipul T/T-590 IL4 este un factor de risc pentru LSIL în lotul de studiu (OR 4.95).

6. Alela variantă 3R (repetarea tandemului de 70 bp) al intronului 3 al IL 4 este semnificativ mai frecvent detectată în lotul CIS, comparativ cu HSIL.
7. Prezența alelei 3R în cazul polimorfismul repetat al intronului 3 de 70 bp reprezintă un factor de risc pentru LSIL în cadrul lotului de studiu (OR=4.95).
8. În cazul pacientelor luate în studiu prezența alelei C a IL6-174 reprezintă un factor protector pentru CIS (OR=0.47).
9. Genotipul A/A IL10-1082 este semnificativ mai frecvent întâlnit în CIS față de LSIL.
10. Frecvențele genotipurilor și alelelor luate în calcul diferă semnificativ de cele realizate de marea majoritate a studiilor din literatură.
11. Cele două polimorfisme studiate se află în dezechilibru de lincaj.

CONTRIBUȚII PERSONALE

- Am realizat pentru prima dată pe lotul de studiu format din persoane de sex feminin de rasă caucaziană, cu vârstă cuprinsă între 18-69 ani, provenind din România, genotiparea IL4-590, IL4 VNTR al intronului 3, IL1 -511, IL6-174 și IL10-1082.
 - Am demonstrat prezența polimorfismelor mai sus enumerate în lotul de studiu.
 - Am arătat existența unor diferențe semnificative în ceea ce privește frecvența genotipurilor și frecvențele alelice față de loturile genotipate, în literatură provenind din populații asiatice, caucaziene, afroamericane/africane.
 - Studiul nostru a demonstrat că, global, nici unul din polimorfismele studiate, analizate separat sau împreună, nu se asociază cu neoplazia intraepitelială cervicală.
 - Am demonstrat o asociere particulară între anumite genotipuri și anumite stări de neoplazie intraepitelială (genotipul C/C- 590 IL4- CIS, IL4 3R/3R – CIS, IL 10 -1082-A/A - CIS). Acestea vor putea fi utilizate în viitor într-un sistem de scor integrat împreună cu alți markeri noi pentru displaziile intraepiteliale, cum ar fi p16-INKa și Ki-67 ca și factori prognostici.
 - Am evidențiat prezența dezechilibrului de lincaj, descrise anterior și în alte populații, în lotul de studiu în cazul polimorfismelor IL4 .
 - Am remarcat existența unor asocieri între anumite alele polimorfismele studiate, ceea ce

înseamnă că detectarea unuia dintre acestea face probabilă prezența alelei corespunzătoare a polimorfismului asociat.

Date personale: Rotar Ioana Cristina

Telefon/Fax: 0264 – 450115

Email: cristina.rotar@umfcluj.ro

Naționalitate: Română

Experiență profesională:

2009 - prezent – medic specialist Obstetrică Ginecologie - Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj Napoca, secția Obstetrică Ginecologie I

2009-prezent – asistent universitar, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Catedra de Obstetrică Ginecologie I

2008-2009 - asistent universitar, catedra de Îngrijiri calificate în Obstetrică Ginecologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”

2006-2007- student masterand, Master in Biotehnologii, Clafin University, South Carolina, USA

2005-2008- doctorand cu frecvență Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Catedra Obstetrică Ginecologie I

2004 - 31.08.2006 și 1.09.2007-2009 – medic rezident Obstetrică Ginecologie, Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj Napoca, Clinica de Obstetrică Ginecologie I

Educație:

Studii postuniversitare:

2011 - 4th Romanian Ian Donald Course Romanian Branch, Ian Donald School of Ultrasound, București, România

2011 - ISUOG Education 2011 - Congenital anomalies & fetal echocardiography, International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Royal College of Obstetrics and Gynecology, Londra, Marea Britanie

2010-2011 – Colposcopie – Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași

2010 – Ecocardiografie fetală – prof. dr. Stamatian F., Cluj Napoca, România

2009 – Ecografie Materno-fetală, prof. dr. Stamatian, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca

2009 - 3rd Romanian Ian Donald Course Romanian Branch, Cluj Napoca, Romania

2008 – Psihopedagogie. Pedagogie medicală. Metodica predării la disciplinele medicale și farmaceutice, prof. dr. Muntean V., Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”

2008 - Ecografia 3D/4D versus 2D în medicina contemporană - prof. dr. Stamatian F., Cluj Napoca, România

2006-2007 - Master în Biotehnologii, Clafin University, Orangeburg, South Carolina, SUA

2006 – Ecografia Doppler în Obstetrică și Ginecologie, prof. dr. Stamatian F., Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca

2006 - First Romanian “Ian Donald School of Ultrasound”, București, România

2006 - The Fetal Medicine Foundation Course on First Trimester Screening, Maternal and Fetal Medicine Foundation, Prof. K. Nikolaides, București, România

2004 – Introducere în ecografie în Obstetrică Ginecologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Cluj Napoca

2002 - Basic Life Support, Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu Mureș, Romania

Diplome. Competențe

2011 – Competență în Colposcopie, Ministerul Sănătății din România

2010 – Competență în Ecografie în Obstetrică și Ginecologie, Ministerul Sănătății din România

2009 – Diplomă de medic specialist în Obstetrică și Ginecologie, Ministerul Sănătății din România

2003 – Diplomă doctor-medic, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Facultatea de Medicină Generală

1998 – Diplomă de ajutor programator, Ministerul Educației Naționale, Liceul Emil Racoviță Cluj Napoca, România

1998 – Diplomă de Bacalaureat, Ministerul Educației Naționale, Liceul Emil Racoviță Cluj Napoca, România

Competențe și aptitudini:

2001-2003 – voluntar SMURD (Serviciul Mobil de Urgență Resuscitare și Descarcerare) Cluj Napoca

Competențe și aptitudini organizatorice:

- membru al secretariatului științific al următoarelor manifestări:

- 4th Romanian Ian Donald Course Romanian Branch, 2011 – București, România

- The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, 2011, București, România

- Al VIII-lea Congres Național al Asociației Române de Medicină Perinatală cu tema Diabetul și Sarcina, Cluj Napoca, Romania, 2009

- 3rd Romanian Ian Donald Course Romanian Branch – Cluj Napoca, 2009, România

Premii:

2000 – Premiul Special al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca

Limbi moderne:

Română – limba maternă

Franceză – foarte bine

Engleză – foarte bine

Activitate științifică:**Cărți:**

- colaborator

Daniel Muresan, Florin Stamatian. Guide d'étude. Module d'obstétrique et gynécologie. VIème année, 2011, Editura Medicală Universitară, UMF Cluj Napoca, ISBN : 978-973-693-433-9

- capitolul XII- La grossesse ectopique

- capitolul XIII. Les hémorragies dans le troisième trimestre

- capitolul XIV. L'accouchement prématuré

- capitolul XV. La rupture prématurée des membranes

- capitolul XVI. La grossesse prolongé

Articole publicate :**Prim autor :**

ISI:

1. Noorali S, **Rotar IC**, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, Bagasra O. Role of HERV-W syncytin -1 in placentation and maintenance of human pregnancy. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2009 Jul;17(4):319-28, ISSN 1062-3345 (primii doi autori au contribuit în mod egal)

B+:

1. **Rotar I**, Mureșan D. , Bolboacă SD, Popp R., Petrișor F, Fărcaș M. , Crișan T., Trifa A., Butuza C., Pop IV , Stamatian F. Prezența polimorfismului IL4 C-590T într-o populație din România. Clujul Medical 2011:nr 94: suppl1: vol 84, 2011

2. **Rotar I**, Ona D, Micu R, Harsa R. Morris Syndrome. Case Report and Review of the Literature. Obstetrica si Ginecologia. 2010: LVIII(3):223-227, ISSN 1220-5532

3. **Rotar I**, Bolboacă SD, Mureșan D, Popp R, Fărcaș M, Petrișor F, Butuza C, Caracostea G, Stamatian F. The Analysis of Genetic Polymorphism. The Relationship between Interleukin – 4 Polymorphisms and Intraepithelial Cervical Neoplasia. Applied Medical Informatics 2010;27(3):43-52, ISSN: 1224-5593, E-ISSN: 2067–7855

4. **Rotar I**, Mureșan D, Bolboacă S, Popp R, Apostol S, Coroiu G, Farcaș M, Crișan T, Butuza C, Caracostea G, Stamatian F. IL-4 Polymorphisms , Cervical Intraepithelial Neoplasia And HPV. Obstetrica si Ginecologia, . 2010: LVIII (2):127-132, ISSN 1220-5532

Coautor :**ISI:**

1. Mureșan D, Stamatian F, Ona D, Cruciat Gh, Caracostea G, **Rotar I**, Cucu R. Current Trends in the Treatment of Ectopic Pregnancy. Chirurgia (Bucharest) 2008, 103 (1): 21-26, ISSN 1221-9118.

2. Mureșan D, Ona D, Cruciat G, **Rotar I**, Stamatian F. Recurrent intrahepatic cholestasis of pregnancy. A case report. J Gastrointestin Liver Dis. 2008 Sep;17(3):323-5, ISSN 1842-1121.

B+:

1. Mureșan D., Stamatian F., **Rotar I**. Datarea ecografică a vârstei sarcinii și biometria fetala către o standardizare a atitudinilor. Obstetrica si Ginecologia LVII (2009) 89-95

2. Caracostea G., Stamatian F., Mureșan D., Zaharie G., Kovacs T., **Rotar I**, Cucu R. Markerii biochimici ai afectării în insuficiența placentară. Obstetrica și Ginecologia, nr. 2 (LVI), 2008, p:87-92

3. Caracostea G., Stamatian F, Mureșan D., Kovacs T., **Rotar I**, Cucu R. Electrocardiograma fetală în sarcina suprapurtată. Obstetrica și Ginecologia, nr 3 (LVI), 2008, p:171-180

4. Mureșan D., **Rotar I.**, Popp R., Apostol S., Coroiu G., Ona D., Caracostea G., Stamatian F. Diagnosticul complex al leziunilor cervical preinvazive ale colului uterin. *Obstetrica și Ginecologia*, nr 4, vol (LVI), 2008, p:211-218
5. Cruciat Gh., Puscas M., Orosz K, **Rotar I.**, Aldeș D, Bogdan C. Asocierea unei tumori ovariene cu sarcina de prim trimestru- prezentare de caz. *Obstetrica și Ginecologia LV* (2007), 263-267
- 6.
7. Mureșan D., Stamatian F., Ona D., Pușcas M., Neamțu A., **Rotar I.** Modalități neinvazive de diagnostic a afectării fetale în hidropsul imun. *Obstetrica și Ginecologia*, vol.LIV, nr. supliment., 2006, 146-147
8. Mureșan D., Ona D., **Rotar I.** Tratatamentul parenteral cu Gynipral în iminența de naștere prematură. *Nașterea prematură. Conduita obstetricală și neonatală*, University Press, Tg. Mureș, 2005, 110-113, ISBN 973-7788-69-9
9. Țifrea B., Zaharie G., Popescu A., **Rotar I.**, Andreica S. Caracteristicile nașterilor premature cu suferință fetală asistate în anul 2004 în Clinica Ginecologie I Cluj. *Nașterea prematură. Conduita obstetricală și neonatală*. University Press, Tg. Mureș, 2005, 167-170, ISBN 973-7788-69-9
10. Mureșan D., Ona D., Stamatian F., Militaru M., Neamtu A., **Rotar I.** Corelatii ecomorfologice in Higroma chistica. *Revista de Anatomie si Embriologie Clinica*, Vol.1, nr.1, 2005, 61-64
11. Mureșan D., **Rotar I.** Hidropsul fetal nonimun. Corelatii anatomo-clinice. *Revista de Anatomie si Embriologie Clinica*, vol.I, nr.4, 2006, 7-12
12. Mureșan D., Stamatian F., **Rotar I.**, Radbata D. Toxoplasmoza in sarcina. *Obstetrica si Ginecologia*, Vol. LIII, nr.2, 2005, 107-111.
13. Vinti D., Ona O., Lacziko-Succhiati S., **Rotar I.** Sarcina heterotopica. Prezentare de caz. *Obstetrica si Ginecologia LII*, nr. 1, 2004, 65-67

Prezentări orale:

Congrese internationale:

1. **Rotar I.**, Mureșan D, Popp R., Bolboacă SD, Petrișor F., Butuza C., Apostol S., Coroiu G., Stamatian F, V. IL 6 -174 G>C polymorphism, HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. European Conference of National Strategies for Chlamydia Trachomatis and Human Papillomavirus, May 25-27, 2011, Jurmala, Latvia

2. Mureșan D., Stamatian F., Levai A., **Rotar I.**, Caracostea G. , Preda A., Ona D. Therapeutic interventions in immediate postpartum hemorrhage. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 20-21, 2011, Bucharest Romania, published in *Obstetrica și Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 59
3. Cruciat Gh., **Rotar I.**, Stamatian F., Ona D. Surgical acute abdomen caused by the rupture of thecal-luteinic cysts in a 11th week pregnant women with a spontaneous singleton pregnancy. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 2011, Bucharest Romania, publicat în *Obstetrica și Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 95-99
4. **Rotar I.**, Mureșan D., Bolboacă S., Popp R., Petrișor F., Butuza C., Tanc M., Stamatian F. Interleukins polymorphisms and pregnancy outcome. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 2011, Bucharest Romania, publicat în *Obstetrica și Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 110
5. Mureșan D, **Rotar I.**, Stamatian F. IL4 mutations in patients infected with high risk HPV and abnormal cervical smears. XIX FIGO World Congress of Obstetrics and Gynecology, Cape Town, South Africa, 2009
6. Matei A., Schmidt A.N., Mureșan M., **Rotar I.**, Branzaniuc K. Anatomy of a mermaid. 105 Annual Meeting of The Anatomische Gesellschaft, Hamburg,2010
7. Matei A., Grigorescu-Sido Fr., **Rotar I.**, Mureșan M. The histology of the optic nerve in cyclopia. 105 Annual Meeting of The Anatomische Gesellschaft, Hamburg,2010
8. Mureșan D., **Rotar I.**, Popp R., Apostol S., Coroiu G., Caracostea G., Ona D., Stamatian F. The Complex Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. 1st Capital Congress of the Gynecologic Oncology of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology, Berlin, 2008
9. Bagasra O, Noorali S., **Rotar I.**, Lewis C., Pestaner J.P. Role of HERV-W in placentation and maintenance of human pregnancy. Society for Maternal-Fetal Medicine: 2008 28th Annual Meeting, Texas, USA publicat în *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 197, Issue 6, Supplement 1, December 2007, pg S163
10. Lewis C., **Rotar I.**, Știr A., Pastener J. The Role of Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) in the Occurrence of Habitual Spontaneous Abortion. HBCU–UP, 7th National research conference, 2007, Washington DC, USA
11. Mureșan D., Ona D., Pușcas M., Caracostea G., **Rotar I.** The Use of Doppler Ultrasound on Uterine Arteries as a Predictable Factor for Pregnancy-Induced Hypertension (PIH). The 19th European Congress of Perinatal Medicine, Atena, 2004

12. Pușcaș M., Ona D., Mureșan D., **Rotar I.** Genetic aspects of preeclampsia. The 19th European Congress of Perinatal Medicine, Athens, 2004

Congrese naționale:

1. D. Mureșan, **Rotar I.** – Particularități ale conduitei obstetricale la gravidele obeze Al 6-lea Congres Național de Obezitate 13-15 Octombrie 2011, Cluj-Napoca

2. **Rotar I.**, Mureșan D., Bolboacă S., Popp R., Petrișor F., Apostol S., Coroiu G., Butuza C., Stamatian F. Polimorfismele IL 6-174 G>C Infectia HPV si Neoplazia cervicala intraepiteliala, Zilele UMF “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2010

3. **Rotar I.** Aspecte particulare ale infectiei HPV si neoplaziei intraepiteliale cervicale la adolescenti Zilele UMF “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2010

4. Mureșan D., Ona D., **Rotar I.**, Caracostea G., Adam L., Matis C., Butuza C., Stamatian F. Impactul macrosomiei fetale asupra atitudinii obstetricale, Al 8-lea Congres National de Medicina Perinatala, 2009, Cluj Napoca, Romania.

5. Mureșan D., **Rotar I.**, Apostol S., Coroiu G., Ona D., Caracostea G., Stamatian F. Impactul tehnicilor moleculare in diagnosticul lezionilor intraepiteliale cervicale. A 9-a Conferinta Nationala a Societatii Romane de Obstetrica si Ginecologie, Cluj Napoca, Romania, 2008

6. Caracostea G., Stamatian F, Mureșan D., Kovacs T., **Rotar I.**, Cucu R. Electrocardiograma fetala in sarcinile prelungite. A 9-a Conferinta Nationala a Societatii Romane de Obstetrica si Ginecologie, Cluj Napoca, Romania, 2008

7. Mureșan D., Ona D., Ona V., **Rotar I.** Utilizarea beta-mimeticelor in tratamentul travaliului prematur. Al 6-lea Congres National de farmacologie clinica si toxicologie terapeutica, Cluj-Napoca, Romania, 2005.

8. Mureșan D., Stamatian F., Ona D., **Rotar I.** Abordarea laparoscopica a sarcinii ectopice. Congresul National de Chirurgie , Cluj Napoca, Romania, 2004

9. Mureșan D., Ona D., Pușcaș M., Caracostea G., **Rotar I.** Rolul ecografiei Doppler ca metoda de screening in preeclampsie . Zilele UMF “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2004

Membru in Comitetul de Organizare al:

1. Al 8-lea Congres National de Medicina Perinatala, Diabetul si sarcina, Cluj Napoca, Romania, 2009

2. A 9-a Conferinta Nationala a Societatii Romane de Obstetrica si Ginecologie, Cluj Napoca, Romania, 2008

3. Al 8-lea Congres National de Medicina Perinatala, Bucharest, Romania, 2007

Zilele UMF “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2010

„Infecția HPV la adolescenți”

Participant la:

Programe naționale:

- “Ghiduri clinice pentru Spitalele de Obstetrica si Ginecologie”, Cluj, Romania, 2010 – trainer – program de implementare a ghidurilor clinice in practica
- “ Ghiduri clinice pentru Spitalele de Obstetrica si Ginecologie”, Sinaia, Romania, adunarea trainer-ilor, 2009
- Aplicarea Medicinii bazata pe dovezi in Obstetrica si – adunarea trainer-ilor, Targu Mures, Romania, 2009
- Imbunatatirea metodologiei profesioniste de analiza confidentiala a deceselor materne in Romania- reuniune de lucruwork, Fondul ONU pentru Populatie, Bucuresti, Romania, 2008

Programe internationale:

Cervical Cancer Education project - 1st International Coordination Meeting, organised by European Cervical Cancer Association, 2011, London, UK

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

**IMMUNE PARTICULARITIES IN PATIENTS WITH
INTRAEPITHELIAL CERVICAL NEOPLASIA
- Abstract of the PhD thesis -**

SCIENTIFIC COORDINATOR

PROF. STAMATIAN FLORIN, MD, PHD

PHD STUDENT

ROTAR IOANA CRISTINA, MD

CLUJ-NAPOCA

2011

Table of content

Table of content	2
Abbreviations	4
Part one. Data from the literature	6
I. INTRODUCTION	6
I.1. The importance of the problem. Argument	6
I.2. Epidemiology	7
II. CERVICAL ANATOMY, EMBRIOLOGY AND HYSTOLOGY	8
III. CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA	10
III.1. Definition	10
III.2. Risk factors	10
III.3. History. Classification. Natural history	12
III.4. Screening. The methods used in the cervical screening	18
III.5. Actual recommendation regarding the cervical screening	23
III.6. Methods of treatment	24
III.7. Prognosis after treatment	28
IV. CERVICAL INFECTION WITH HUMAN PAPILOMA VIRUS	29
IV.1. HPV infections and cervical intraepithelial neoplasia	29
IV. 2. HPV types	29
IV.3. HPV genome	30
IV.4. Viral DNA detection methods	32
IV.5. Actual clinical use of HPV testing	34
IV.6. HPV infection: natural history and cervical carcinogenesis	35
IV.7. The role of HPV in non-cervical carcinomas	36
IV.8. HPV vaccines	36
V. THE REACTIONS OF THE IMMUNE SYSTEM IN HPV INFECTION AND CERVICAL CARCINOGENESIS	38
V.1. The structure of the immune system	38
V.2. The immune system response to HPV infection	38
V.3. The relationship immune system –carcinogenesis in the case of HPV infection and cervical cancer	43
VI. GENETIC POLYMORFISM	46
VI.1. Definition	46
VI.2. Genetic polymorphisms classification	46
VI.3. Interleukin gene polymorphisms and cervical intraepithelial neoplasia	47
PART TWO. PERSONAL CONTRIBUTIONS	49
VII. GOALS AND OBJECTIVES	49
VIII. MATERIAL AND METHODS	50
VIII.1. Study design. Inclusion and exclusion criteria for cases and controls	50
VIII.2. Data collection	51
VIII.3. The analysis of cervical probes	53
VIII.4. Genomic DNA extraction. DNA analysis	56
VIII.5. The methods used for statistical analysis	57

IX. CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS	59
X. IL4 POLYMORFISMS	64
X.1. IL4 -590C>T polymorphism	64
X.2. IL4 intron 3 70 bp repeated polymorphism	82
X.3. Integrate analysis of IL4 polymorphisms	99
XI. IL1 β -511C>T POLYMORFISM	101
XI.1. Introduction	101
XI.2. Material and methods	102
XI.3. Results	103
XI.4. Discussions	109
XI.5. Conclusions	119
XII. IL6-174 G>C POLYMORFISM	121
XII.1. Introduction	121
XII.2. Material and methods	121
XII.3. Results	123
XII.4. Discussions	129
XII.5. Conclusions	138
XIII. IL-10 -1082 G>A POLYMORFISM	141
XIII.1. Introduction	141
XIII.2. Material and methods	142
XIII.3. Results	143
XIII.4. Discussions	149
XIII.5. Conclusions	162
XIV. THE INTEGRATED ANALYSIS OF THE STUDY POLIMORFISMS, CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND HPV INFECTION	164
XV. FINAL CONCLUSIONS	172
XVI. GENERAL DISCUSSIONS	174
XVII. PERSONAL CONTRIBUTIONS	176
REFERENCES	177

KEYWORDS: HPV, cervical intraepithelial neoplasia, IL 4, IL 1 β , IL 6, IL10, genetic polymorphism, PCR-RFLP, PCR

INTRODUCTION

HPV infection represents the most frequent sexual transmitted disease. The estimated risk for a woman to catch an HPV infection during her lifetime is about 50-80%. Nevertheless the percentage of patients that will develop cervical intraepithelial neoplasia is incomparable smaller that heeds to the idea of the existence of a predisposal factor probably a component of the host immune system. Professor zur Hausen has received the Nobel Prize for Medicine by proving the essential role of HPV in cervical carcinogenesis. Recent researches are focusing on the potential factors capable to favor the spontaneous HPV clearance.

More than 100 HPV type are known in the present; 40 of them having a genital tropism. Once the virus had entered at the level of squamous epithelium usually by microabrasions generated by the sexual contact it can persist either in an episomal state either in more advanced lesions integrated in the nucleus where it can interfere with cellular cycle control mechanisms.

The accessibility of the cervix has allowed the use of exfoliative cytology as a screening method at population level with important consequences upon cervical cancer related mortality and morbidity. Now more than ever the possibility of retiring Pap smear testing is discussed; some voices claiming that it would be better to use HPV HR testing as a screening tool and cytology only for HPV HR positive patients. As a result of the use of the screening programs at population level the percentage of cervical intraepithelial lesion had a significant raise. The studies on HPV natural history have showed that almost 40% of HSIL lesions have a spontaneous resolution, the percentage being higher up to 80% in adolescents. The treatment of high grade lesions can lead to important obstetrical complications such as: preterm birth, small for gestational age or preterm rupture of membrane. No difference has been found between all known therapeutic options.

HPV life cycle can partially escape to Langerhans and dendritic cells. The absence of the cytopathic effect, the ability of viral replication in the absence of proinflammatory signals or cellular death favors the viral persistence. By this mechanism inactivated or partially activated dendritic cells have a limited capacity to migrate in the regional lymph nodes. The immune tolerance phenomenon appears in the conditions of partial activation of antigen presenting cells with the absence of the initiation by the lymphocytes of an antigen specific response. The tolerant lymphocytes are therefore unable to respond to later exposure at HPV antigens.

A second mechanism that helps the virus to escape from the innate immune system is represented by the strict control of viral replication. The expression in low amounts of viral proteins, mostly E6 and E7, at the level of basal and intermediate levels leads to a suboptimal activation of Langerhans cells. Moreover the synthesis of highly immunogenic virions takes place in apical layers privileged from immune point of view. The resulted virions in particular do not lead to the activation of Langerhans cells. Also at the level of the transformation zone in the conditions of HPV infection during the process of cervical neoplasia the number of Langerhans cells are reduced and their phenotype is modified.

Interleukins are molecules that allow the communication between different components of the immune system. The activation of the immune system as a response to an infection by example HPV infection has as an effect a modulation of interleukin production. Mai studies have shown a shift of Th1/Th2 balance towards Th2 in HPV infected patients.

The presence of a genetic polymorphism of a particular gene can influence its secretion, different genotypes associating different secretion level: reduced, intermediate or high.

Previous studies have analyzed the relationship between interleukin gene polymorphism; even they have been realized on a small number of patients they have created the prerequisites of the present research.

MATERIALS AND METHODS

The present research was conceived as a case-control study that took place in the First Clinic of Obstetrics and Gynecology Cluj Napoca between 1st of February and 30th of June. The cases were represented by patients with cervical intraepithelial neoplasia based on cytology and positive on HR-HPV testing. The following abnormal cervical categories have been included: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL and in situ carcinoma, totalizing 128 patients. All the controls (111 patients) had a result of negative for malignant intraepithelial lesion and also HPV-HR negative. A common exclusion criterion was the expressed desire of the patient to not participate at the study.

Each patient had a general clinical examination followed by gynecologic examination, colposcopy and cervical sampling. At the end of the visit 2 ml of blood had been drawn. From the cervical vial both cytology and HPV testing had been performed. The results of cytology

were expressed respecting Bethesda system. For HPV testing an immunohistochemistry HR-HPV kit Viroactiv from Virofem® had been used.

From blood samples DNA was extracted using Wizzard Genomic DNA Purification Kit from Promega®. The DNA sample were later stored in the freezer at -20°C and latter used for genotyping.

IL 4 POLYMORFIMS

IL4 as a part of Th2 response pays an important role in the humoral immune response and it induces the antibodies synthesis. After the stimulation of laboratory animal with VLP L1 HPV 16 particles similar to those that are used in commercial HPV vaccines a mixed Th1/Th2 response has been obtained with high levels of IL4 that suggests that this particular interleukin might play an important role in HPV natural history. Two IL 4 genetic polymorphism have been analyzed: -590 C>T promoter polymorphism and 70 bp intron 3 repeated polymorphism.

The polymorphisms have been detected using PCR-RFLP and respectively PCT technique following protocols described by Pontes CC and respectively Mout R. No linear association has been found between the two polymorphisms and HPV infection. No significant differences have been detected between the two polymorphisms and HPV infection while comparing allelic frequency. IL 4 C/C -590 C/C genotype respectively 3R/3R were significantly more frequently encountered in patients with in situ carcinoma compared to HSIL (p=0.0422).

IL1 β – 511 C>T polymorphism

Interleukin 1 β exerts a proinflammatory effect being studied in relation with many neoplasias, in the particular case of ovarian cancer playing a prognostic role. Previous studies have showed an elevated level of this interleukin in the lavage fluid from patients with cervical cancer. T/T genotype is associated with a maximal secretion level, C/T- intermediate level respectively a minimal level for C/C genotype.

IL-1 β -511 genotyping has been realized following a PCR-RFLP protocol described by Ishii T et al. No linear association has been found between IL1 β -511 genetic polymorphism and intraepithelial neoplasia. No significant differences have been detected for allelic or genotype

frequencies for the global comparison case-controls and also for the details analysis on cervical intraepithelial neoplasia categories.

IL6-174 G>C polymorphism

Interleukin 6 is known to have a proinflammatory effect playing a central role in host defense central mechanisms. In both HPV infection and tumor cervical cancer cells IL6 level are elevated. IL-6 -174 polymorphism is located in promoter region, a key region for gene transcription. Data from the literature sustain the association of a low IL6 level for C/C genotype, intermediate level for – C/G genotype, the maximum level being reached in the presence of G/G genotype.

IL 6 -174 G>C polymorphism has been detected using a PCR-RFLP protocol described by Kristiansen OP. No linear association has been found between cervical intraepithelial neoplasia and IL6 -174 G>C polymorphism. No significant differences have been found between particular classes of cervical intraepithelial neoplasia and controls. For the study group the homozygous C/C genotype represents a protector factor for cervical neoplasia (C/C genotype OR –0.48 in situ carcinoma/controls).

IL10-1082 G>A polymorphism

Interleukin 10 has an inhibitory action upon the proinflammatory cytokines by exerting an inhibitory action on the activity of Th1 cells but also upon antigen presenting cells with a possible positive effect on cervical carcinogenesis. Their syntheses by the keratinocytes, the site of HPV infection suggest a possible role in cervical carcinogenesis.

IL 10 - G>A was determined using a PCR-RFLP protocol after Guo W et al. No linear association has been found between the polymorphism and cervical neoplasia. The differences regarding genotype frequency between cases and controls were not significant with the exception of A/A genotype that was significant more frequently encountered in CIS compared to LSIL (p=0.0494), respectively in CIS and HSIL compared to LSIL (p=0.0396). In the study patients the detection of at least one variant allele A was a risk factor for neoplasia (OR=2.75 - CIS/controls).

DISCUSSIONS

Present research had tried to realize a risk profile for the response to HPV infection and cervical neoplasia. The results obtained for each individual polymorphism have not shown a linear association with cervical neoplasia nor has the integrated analysis of all five polymorphism. These data are concordant to the physiopathology context of HPV infection that determines a cascade of interleukins that interact with one another. Moreover there have been described other local factors that can significantly modify the interleukins level.

The present study has determined neither the serum nor the cervical level of the interleukin taken into consideration mainly due to cost limitations. Even in the situation where both level are assessed, they might suffer variations caused by different factors such as menstrual cycle or alimentation, therefore the statistic analysis has to take in consideration all these factors and eliminate the entire possible error factor. Supplementary studies are necessary, preferable multicentric that will determine both local and seric level and also a complete sequencing of interleukins genes that will reveal all the possible genetic polymorphisms. Moreover apart from interleukins all factors that might interfere with gene transcription will be considered.

The thesis creates optimistic possibilities: three genotypes are significantly more frequent associated to CIS lesions (IL 4 -590 C/C genotype, IL4 T/T-590 IL4 genotype and respectively IL10-1082 A/A genotype), but in order to be included in a prognostic score scale that might justify a more aggressive therapy there are important steps to be done.

FINAL CONCLUSIONS

1. All the studied polymorphisms had been present in the study group.
2. No linear association had been proved between the studied polymorphisms and cervical intraepithelial neoplasia
3. The logistic regression had showed no association between all the five polymorphism and cervical intraepithelial neoplasia
4. IL 4 -590 C/C genotype was more frequent encountered in patients with in situ carcinoma than in HSIL
5. IL4 -590 T/T genotype represents in the present study a risk factor for LSIL (OR 4.95).

6. The variant allele consisting in three repeats of 70 bp from the structure of intron 3 of IL4 is significantly more frequently detected in patients with in situ carcinoma than in HSIL.
7. The presence of the variant allele of IL4 VNTR represents a risk factor for LSIL in the study patients (OR=4.95).
8. For the study patients the detection of C allele at -174 IL6 represents a protective factor for in situ carcinoma (OR=0.47).
9. A/A IL10-1082 genotype is significantly more frequently encountered in patients with in situ carcinoma than in LSIL.
10. Genotype and allelic frequencies resulting from the present study are significantly different from those reported by other authors while analyzing different pathologies.
11. The two IL4 polymorphisms are in linkage disequilibrium

PERSONAL CONTRIBUTIONS

- The genotyping of IL4-590, IL4 VNTR, IL1 -511, IL6-174 and IL10-1082 was realized for the first time in patients from Transylvania aged 18 to 69. Therefore we have proved the existence of the above mentioned polymorphisms in the study group.
- Significant differences regarding genotype and allelic frequencies have been found between the present study and other study from the literature consisting of Asians, Caucasians, Africans, and Afro-Americans.
- Our study had proved globally that none of the analyzed polymorphism neither separately nor all together is associated with cervical intraepithelial neoplasia.
- A significant association has been found between specific interleukins genotypes and in situ carcinoma (genotype C/C- 590 IL4, IL4 3R/3R, IL 10 -1082-A/A). These particular genotypes might be used in the future in an integrated score system together with other markers for cervical intraepithelial neoplasia such as p16-INKa and Ki-67 as prognosis factors.
- We have proved the existence of linkage disequilibrium of the two IL4 genetic polymorphisms previously described in other population in our study group.
- Several associations had been found between certain allele of the study polymorphism. In case these association will be also proved by other authors the detection of one polymorphism

will mean that is probable that the other one is also present.

Curriculum vitae

Personal information:

Surname (s)/Last name: IOANA CRISTINA ROTAR

Telephone: 0264 - 450115

Fax: 0264 - 450115

E-mail: cristina.rotar@umfcluj.ro

Nationality: Romanian

Professional experience:

2009 – present -MD, specialist in Obstetrics and Gynecology, Emergency County Hospital, 1st

2008 – present, **teaching** assistant, 1st Department of Obstetrics and Gynecology, **University** of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Romania

2006-2007 - Postdoctoral Fellow, research, Clafin University, Orangeburg, SC, USA

2005-2008 – PhD student, University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Romania

2004 –31st august 2006+1stSeptember 2007- 2009 - resident in Obstetrics and Gynecology, Emergency County Hospital, 1st Clinic of Obstetrics and Gynecology Cluj Napoca Romania,

Education and training:

2011 - 4th Romanian Ian Donald Course Romanian Branch, Bucharest, Romania

2011 - Competence in Colposcopy, Romanian Ministry of Health

2011 - ISUOG Education 2011 - Congenital anomalies & fetal echocardiography, ISUOG – RCOG London, UK

2010-2011- Colposcopy - University of Medicine and Pharmacy, Iasi

2010 - Fetal Echocardiography - Prof. Stamatian – Cluj Napoca, Romania

2010 - Competence in Ultrasound Obstetrics and Gynecology, Romanian Ministry of Health

2009 - Ultrasound in Maternal and Fetal Medicine - Prof. Stamatian, University of Medicine and Pharmacy Cluj Napoca

2009 - 3rd Romanian Ian Donald Course Romanian Branch, Cluj Napoca, Romania

2008 - Psychopedagogy. Medical pedagogy. The methodic of teaching medical and pharmaceutical disciplines. Assoc.Prof. Muntean, University of Medicine and Pharmacy Cluj Napoca

2008 - 3D/4D versus 2D ultrasound in contemporary medicine - Prof. Stamatian

2006-2007 - Master in Biotechnology – (1 of 2 years) – no diploma, Clafin University, Orangeburg, SC USA

2006 - Doppler Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, University of Medicine and Pharmacy Cluj Napoca

2006 - First Romanian “Ian Donald School”, Bucharest, Romania

2006 - The Fetal Medicine Foundation Course on First Trimester Screening, Prof. K. Nikolaides

2004 –31st august 2006+1stSeptember 2007- 2009 - Board certificate in Obstetrics and Gynecology, Romanian Ministry of Health

2004 - Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, University of Medicine and Pharmacy Cluj Napoca

1998-2003 - Faculty of General Medicine - University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Romania

2002 - Basic Life Support - University of Medicine and Pharmacy Targu Mures, Romania

1998 - Computer assistant , Romanian Ministry of Education, “Emil Racovita” High School Cluj Napoca, Romania

1994-1998 - B.S. Degree, Romanian Ministry of Education, Computing class - “Emil Racovita” High School Cluj Napoca, Romania

Social competences and aptitudes:

2001-2003 – volunteer of SMURD (Mobile Emergency Service for Resuscitation and Extrication), Cluj Napoca

Organizing competence and aptitudes:

member in the Scientific Secretariat of:

- The Eighth National Congress Of Perinatal Medicine – Diabetes And Pregnancy, Cluj Napoca, Romania, 2009
- 3rd Romanian Ian Donald Course Romanian Branch – Cluj Napoca, Romania
- 4th Romanian Ian Donald Course Romanian Branch – Bucharest, Romania
- The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 2011, Bucharest Romania

Prizes: 2000 - Special prize of the University of Medicine and Pharmacy “Cluj Napoca”

Personal skills and competences:

Mother tongue(s): Romanian

Other language(s):	French	English	German
reading ability	B2	B2	A2
writing ability	B2	B2	A2
speaking ability	B2	B2	A2

Scientific activity:

BOOKS

Author: -

Co-Author:

Daniel Mureşan, Florin Stamatian. Guide d’étude. Module d’obstetrique et gynecologie. VIème année, 2011, Editura Medicala Universitara UMF Cluj Napoca, ISBN : 978-973-693-433-9

- chapter XII- La grossesse ectopique

- chapter XIII. Les hémorragies dans le troisième trimestre
- chapter XIV. L'accouchement prématuré
- chapter XV. La rupture prématurée des membranes
- chapter XVI. La grossesse prolongé

Papers :

First author:

ISI:

1. Noorali S, **Rotar IC**, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, Bagasra O. Role of HERV-W syncytin -1 in placentation and maintenance of human pregnancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009 Jul;17(4):319-28, ISSN 1062-3345 (both authors have contributed equally) IF-1.85, influence score 0.538, relative influence score 1.044

B+:

1. **Rotar I.**, Mureşan D. , Bolboacă SD, Popp R., Petrişor F, Fărcaş M. , Crişan T., Trifa A., Butuza C., Pop IV , Stamatian F. *The presence of IL4 C-590T in a Romanian population*. Clujul Medical 2011:nr 94: suppl1: vol 84, 2011

2. **Rotar I.**, Ona D, Micu R, Harsa R. *Morris Syndrome. Case Report and Review of the Literature*. *Obstetrica si Ginecologia*. 2010: LVIII(3):223-227, ISSN 1220-5532

3. **Rotar I**, Bolboacă SD, Mureşan D, Popp R, Fărcaş M, Petrişor F, Butuza C, Caracostea G, Stamatian F. *The Analysis of Genetic Polymorphism. The Relationship between Interleukin – 4 Polymorphisms and Intraepithelial Cervical Neoplasia*. *Applied Medical Informatics* 2010;27(3):43-52, ISSN: 1224-5593, E-ISSN: 2067–7855

4. **Rotar I**, Mureşan D, Bolboacă S, Popp R, Apostol S, Coroiu G, Farcaş M, Crişan T, Butuza C, Caracostea G, Stamatian F. *IL-4 Polymorphisms , Cervical Intraepithelial Neoplasia And HPV*. *Obstetrica si Ginecologia*. 2010: LVIII (2):127-132, ISSN 1220-5532

Co-author:

ISI:

1. Mureşan D., Stamatian F., Ona D., Cruciat Gh., Caracostea G., **Rotar I.**, Cucu R. *Current Trends in the Treatment of Ectopic Pregnancy*. *Chirurgia (Bucharest)* 2008, 103 (1): 21-26, ISSN 1221-9118.

2. Mureșan D, Ona D, Cruciat G, **Rotar I**, Stamatian F. *Recurrent intrahepatic cholestasis of pregnancy. A case report.* J Gastrointestin Liver Dis. 2008 Sep;17(3):323-5, ISSN 1842-1121.

B+:

1. Mureșan D., Stamatian F., **Rotar I.** *The use of ultrasound for the calculation of the gestational age and for fetal biometry – towards attitude standardization.* Obstetrica si Ginecologia LVII (2009) 89-95, ISSN 1220-5532

2. Caracostea G., Stamatian F., Mureșan D., Zaharie G., Kovacs T., **Rotar I.**, Cucu R. *Biochemical markers of fetal distress in the placental insufficiency.* Obstetrica si Ginecologia, nr. 2 (LVI), 2008, 87-92, ISSN 1220-5532

3. Caracostea G., Stamatian F, Mureșan D., Kovacs T., **Rotar I.**, Cucu R. *Fetal electrocardiogram in postterm gestation.* Obstetrica si Ginecologia, nr 3 (LVI), 2008, p:171-180, ISSN 1220-5532

4. Mureșan D., **Rotar I.**, Popp R., Apostol S., Coroiu G., Ona D., Caracostea G., Stamatian F. *The complex diagnosis of preinvasive disorders of uterine cervix.* Obstetrica si Ginecologia, vol (LVI), 2008 (4), p:211-218, ISSN 1220-5532

5. Cruciat Gh. Puscas M., Orosz K, **Rotar I.**, Aldes D, Bogdan C. *The association of an ovarian tumor with first trimester pregnancy – a case report.* Obstetrica si Ginecologia LV (2007), 263-267, ISSN 1220-5532

6. Mureșan D., Stamatian F., Ona D., Puscas M., Neamtu A., **Rotar I.** *Non-invasive modalities for the diagnosis of fetal immun hydrops.* Obstetrica si Ginecologia, vol.LIV, 2006, 146-147, ISSN 1220-5532

7. Mureșan D., Ona D., **Rotar I.** *The treatment of preterm birth using Gynipral®.* Preterm birth. Neonatal and obstetrical attitude, University Press, Tg. Mures, Romania, 2005, 110-113, ISBN 973-7788-69-9

8. Tifrea B., Zaharie G., Popescu A., **Rotar I.**, Andreica S. *The characteristics of preterm birth with acute fetal distress during the year 2004 in the First Clinic of obstetrics and Gynecology,* Cluj Napoca. Preterm birth. Neonatal and obstetrical attitude, University Press, Tg. Mures, 2005, 167-170, ISBN 973-7788-69-9

9. Mureșan D., Ona D., Stamatian F., Militaru M., Neamtu A., **Rotar I.** *Morphological and ultrasound correlation in cystic hygroma.* Revista de Anatomie si Embriologie Clinica, 1(1), 2005, 61-64

10. Mureșan D., **Rotar I.** *Non-immune hydrops fetalis. Anatomico-clinical correlations.* Revista de Anatomie si Embriologie Clinica, I (4), 2006, 7-12

11. Mureșan D., Stamatian F., **Rotar I.**, Radbata D. *Toxoplasmosis and pregnancy*. *Obstetrica si Ginecologia*, Vol. LIII, 2005 (2): 107-111, ISSN 1220-5532

12. Vinti D., Ona O., Lacziko-Succhiati S., **Rotar I.** *Heterotopic pregnancy*. A case report. *Obstetrica si Ginecologia* LII, 2004 (1), 65-67. ISSN 1220-5532

Oral presentations:

International congresses:

1. **Rotar I.**, Muresan D, Popp R., Bolboaca SD, Petrisor F., Butuza C, Apostol S., Coroiu G., Stamatian FV. *IL6 -174 G>C polymorphism, hpv infection and cervical intraepithelial neoplasia*. European Conference of National Strategies for Chlamydia Trachomatis and Human Papillomavirus, May 25-27, 2011, Jurmala, Latvia

2. Muresan D., Stamatian F, Levai A., **Rotar I.**, Caracostea G. , Preda A., Ona D. *Therapeutic interventions in immediate postpartum hemorrhage*. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 20-21, 2011, Bucharest Romania, published in *Obstetrica si Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 59

3. Cruciat Gh., **Rotar I.**, Stamatian F., Ona D. *Surgical acute abdomen caused by the rupture of thecal-luteinic cysts in a 11th week pregnant women with a spontaneous singleton pregnancy*. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 2011, Bucharest Romania, published in *Obstetrica si Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 95-99

4. **Rotar I.**, Mureșan D., Bolboacă S., Popp R., Petrișor F., Butuza C., Tanc M., Stamatian F. *Interleukins polymorphisms and pregnancy outcome*. The 4th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine, May 2011, Bucharest Romania, published in *Obstetrica si Ginecologia*, suppl LIX ISSN 1220-5532, pg 110

5. Mureșan D, **Rotar I.**, Stamatian F. *IL4 mutations in patients infected with high risk HPV and abnormal cervical smears*. XIX FIGO World Congress of Obstetrics and Gynecology, Cape Town, South Africa, 2009

6. Matei A., Schmidt AN, Mureșan M, **Rotar I.**, Branzaniuc K. *Anatomy of a mermaid*. 105 Annual Meeting of The Anatomische Gesellschaft, Hamburg, 2010

7. Matei A., Grigorescu-Sido Fr., **Rotar I.**, Mureșan M. *The histology of the optic nerve in cyclopia*. 105 Annual Meeting of The Anatomische Gesellschaft, Hamburg, 2010

8. Mureșan D., **Rotar I.**, Popp R., Apostol S., Coroiu G., Caracostea G., Ona D., Stamatian F. *The Complex Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia*. 1st Capital Congress of the Gynecologic Oncology of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology, Berlin, 2008

9. Bagasra O, Noorali S., **Rotar I.**, Lewis C., Pestaner J.P. *Role of HERV-W in placentation and maintenance of human pregnancy*. Society for Maternal-Fetal Medicine: 2008 28th Annual Meeting, Texas, USA published in the American Journal of Obstetrics and Gynecology, Volume 197, Issue 6, Supplement 1, December 2007, Page S163

10. Lewis C., **Rotar I.**, Stir A., Pastener J. *The Role of Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) in the Occurrence of Habitual Spontaneous Abortion*. HBCU–UP, 7th National research conference, 2007, Washington DC, USA

11. Mureșan D., Ona D., Puscas M., Caracostea G., **Rotar I.** *The Use of Doppler Ultrasound on Uterine Arteries as a Predictable Factor for Pregnancy-Induced Hypertension (PIH)*. The 19th European Congress of Perinatal Medicine, Athens, 2004

12. Puscas M., Ona D., Muresan D., **Rotar I.** *Genetic aspects of preeclampsia*. The 19th European Congress of Perinatal Medicine, Athens, 2004

National congresses:

1. Mureșan D., **Rotar I.**– *Characteristics of obstetrical conduct in obese pregnant women*, The 6th National Congress of Obesity, Cluj-Napoca ,13-15th October 2011

2. **Rotar I.**, Mureșan D., Bolboacă S., Popp R., Petrisor F., Apostol S., Coroiu G., Butuza C., Stamatian F. *C[-511]T IL1 β Polymorphism HPV Infection and Cervical Intraepithelial Neoplasia*, The Days of the Medical University of Cluj Napoca “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2010

3. **Rotar I.** *Particular Aspects of HPV Infection and Cervical Intraepithelial Neoplasia in Adolescents*, The Days of the Medical University of Cluj Napoca “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2010

4. Mureșan D., Ona D., **Rotar I.**, Caracostea G., Adam L., Matis C., Butuza C., Stamatian F. *The Impact of Fetal Macrosomia upon Obstetrical Attitude*. The Eighth National Congress of Perinatal Medicine, 2009, Cluj Napoca, Romania.

5. Mureșan D., **Rotar I.**, Apostol S., Coroiu G., Ona D., Caracostea G., Stamatian F. *The Impact of Molecular Methods in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Lesions*. The Ninth National Conference of the Romanian Society of Obstetrics and Gynecology, Cluj Napoca, Romania, 2008

6. Caracostea G., Stamatian F, Mureșan D., Kovacs T., **Rotar I.**, Cucu R. *Fetal Electrocardiogram in Postterm Pregnancies*. The Ninth National Conference of The Romanian Society of Obstetrics and Gynecology, Cluj Napoca, Romania, 2008

7. Mureșan D., Ona D., Ona V., **Rotar I.** *The Use of Betamimetics for Treating the Preterm Labor.* The Sixth National Congress of Toxicological Therapeutic and Clinic Pharmacology, Cluj-Napoca, Romania, 2005.
8. Mureșan D., Stamatian F., Ona D., **Rotar I.** *The Laparoscopic Approach of the Ectopic Pregnancy.* National Congress of Laparoscopic Surgery, Cluj Napoca, Romania, 2004
9. Mureșan D., Ona D., Pisces M., Caracostea G., **Rotar I.** *The Role of Doppler Ultrasound as a Screening Method for Preeclampsia.* The Days of the Medical University of Cluj Napoca “Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Romania, 2004

Other congresses and conferences:

- The Eighth National Congress Of Perinatal Medicine – Diabetes And Pregnancy, Cluj Napoca, Romania, 2009
- The Ninth National Conference Of The Romanian Society Of Obstetrics And Gynecology, Cluj Napoca, Romania, 2008
- The Seventh National Congress Of Perinatal Medicine, Bucharest, Romania, 2007

Invited speaker:

The days of the Univeristy of Medicine and Pharmacy Cluj Napoca, 2010

„HPV infections in adolescents”

National programs:

“Clinical Guides for Obstetrics and Gynecology Hospitals”, Cluj, Romania, 2010 – trainer – a program for the implementation of the clinical guide into the practice

“Clinical Guides for Obstetrics and Gynecology Hospitals”, Sinaia, Romania, trainers meeting, 2009

Application of Evidence Based Medicine in Obstetrics and Gynecology – trainers meeting, Targu Mures, Romania, 2009

The improvement of the professional confidential analysis methodology of maternal deaths in Romania – work meeting, the United Nations Population Fund, Bucharest, Romania, 2008

International programs:

Cervical Cancer Education project - 1st International Coordination Meeting, organised by European Cervical Cancer Association, 2011, London, UK

Scientific societies:

The Romanian Society of Obstetrics and Gynecology (member)

Clinical trials:

2008-2011 - NBI – 0703 – Elagolix – sponsor Neurocrine

Driving licence(s): I am a holder of a drivers licence. Category B vehicle