
TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

Markeri moleculari, serologici și parametri ecografici pentru transformarea malignă a leziunilor endometrioizice

Doctorand: **Adriana-Maria-Ioana Gaia (Oltean)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Endometrioza	5
1.1. Epidemiologie și etiologie	5
1.2. Fiziopatologie	6
1.3. Clasificarea endometriozei	7
1.4. Manifestări clinice. Durerea în endometrioză	8
1.5. Aspecte histologice	8
2. Leziuni maligne	11
2.1. Transformarea malignă a endometriozei	11
2.2. Endometrioza Asociată Cancerului Ovarian (EACO)	11
2.3. Cancerul ovarian	12
3. Evaluarea moleculară	15
3.1. Expresia genică	15
3.2. mi ARN-uri	17
3.3. Metilarea ADN-ului	19
4. Markeri serologici	21
4.1. Markerul CA125	21
4.2. Markerul HE4	22
4.3. Markerul CA72-4	22
5. Diagnosticul imagistic	23
5.1. Parametri ecografici	23
5.2. Parametri de Imagistica prin Rezonanță Magnetică	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	29
2. Metodologie generală	31
3. Studiul 1 - Evaluarea alterărilor genetice la pacientele cu endometrioză ovariană și cancer ovarian	33
3.1. Introducere	33
3.2. Scop și obiective	35
3.3. Material și metodă	35
3.4. Rezultate	39
3.5. Discuții	52
3.6. Concluzi	55

4. Studiul 2 - Evaluarea serologică a leziunilor endometrioze ovariene	57
4.1. Introducere	57
4.2. Scop și obiective	58
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	70
5. Studiul 3 - Evaluarea performanței ultrasonografiei și a IRM-ului în diagnosticul preoperator al endometriozei	71
5.1. Introducere	71
5.2. Scop și obiective	71
5.3. Material și metodă	71
5.4. Rezultate	79
5.5. Discuții	82
5.6. Concluzii	84
6. Discuții generale	87
7. Concluzii generale	89
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	91
REFERINȚE	93

Cuvinte cheie: endometrioză, transformare malignă, alterări genetice comune, CA125, evaluare imagistică, actualizare protocol

INTRODUCERE

Endometrioza este o boală ginecologică cu impact semnificativ asupra calității vieții. Este descrisă clinic ca o patologie cu simptome polimorfe iar din punct de vedere molecular endometrioza este caracterizată printr-o instabilitate genetică semnificativă. Asocierea endometriozei și a cancerului ovarian, cu precădere cel endometrioid și cu celule clare, este atestată de mai multe studii. Perspectiva de a fi folosi biomarkeri moleculari, serologici și parametri imagistici ca și instrumente diagnostice și de monitorizare contribuie la identificarea pacientelor cu endometrioza precum și la evaluarea riscului prezent în evoluția acestei boli.

Cercetarea acestei teze de doctorat a avut în vedere o viziune complexă a temei propuse care s-a concretizat printr-o abordarea multidisciplinară și internațională.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Endometrioza, definită ca prezența și creșterea țesutului de tip endometrial în afară cavității uterine, este una dintre cele mai frecvente boli ginecologice cronice, estrogen-dependență. Ca o estimare, prevalența endometriozei este 20-30% raportată la femeile cu infertilitate și până la 40-60% la femeile cu dureri pelvine cronice.

Patologia endometrioică este considerată o țintă ideală pentru științele genomice. Endometrioza benignă din punct de vedere histologic poate ascunde anomalii moleculare, care în timp pot duce la o transformare malignă. Date în curs de dezvoltare prezintă posibilitatea implicării unor dereglări în expresia miARN-urilor. miARN-urile par să fie reglatori puternici ai expresiei genelor în endometrioza, crescând astfel perspectiva de a fi utilizați ca biomarkeri și instrumente terapeutice. Metilarea ADN-ului aberant, care este semnificativ implicată în carcinogeneza umană, reprezintă de asemenea un posibil mecanism responsabil pentru această boală.

La nivel serologic, în patologia ginecologică unul din cei mai utilizați markeri este CA125. Valoarea markerului este crescută atât în endometrioza cât și în contextul altor patologii ginecologice. Asocierea CA125 cu alți markeri precum HE4 și CA72-4 crește precizia diagnostică.

Investigațiile imagistice reprezintă prima etapă de conștientizarea paraclinică a diagnosticului. Acestea contribuie semnificativ la orientarea spre o anumită atitudine terapeutică. Cartografierea și evaluarea preoperatorie a leziunilor endometrioice prezintă o importanță aparte pentru consilierea pacientelor cât și pentru alegerea abordării terapeutice optime. Diagnosticul imagistic al leziunilor endometrioice ca prima linie se face cu precădere cu ajutorul ultrasonografiei iar ca linia a 2-a se menționează Imagistica prin Rezonanță Magnetică (IRM).

CONTRIBUȚIA PERSONAL

Studiu 1. Evaluarea alterărilor genetice la pacientele cu endometrioză ovariană și cancer ovarian

Introducere, scop și obiective. Asocierea endometriozei și a cancerului ovarian a fost documentată de mai multe studii care au demonstrat că cele două subtipuri principale de carcinom ovarian care pot fi dezvoltate din endometrioză sunt carcinomul endometrioid și cel cu celule clare. Studiul își propune corelarea profilurilor genetice al pacientelor cu endometrioză și carcinomul ovarian endometrioid, analizând genele *BRCA1* și *BRCA2*, profilul de metilare al ADN-ului și mutațiile identificate într-un subset specific de gene corelate cu cancerul.

Material și metodă. Am inclus în studiu 50 de paciente cu endometrioză și 20 de paciente cu carcinom ovarian endometrioid. Pacientele au fost diagnosticate și tratate în cadrul Institutului de Oncologie „Prof. dr. Ion Chiricuta” Cluj-Napoca și al Clinicii „Dominic Stanca”. Prelucrarea probelor a constat în: extracția ADN-ului din țesutul fixat în formol și apoi inclus în parafina, secvențierea de nouă generație (SNG), analiza datelor SNG, validarea mutațiilor, evaluarea profilului de metilare, realizarea profilului de metilare al pacientelor cu cancer ovarian în bazele de date TCGA, realizarea profilului mutațional al pacientelor cu cancer ovarian în baza de date TCGA și analiza statistică.

Rezultate. În acest studiu am observat mai multe gene mutante care au fost comune pentru ambele grupuri: *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT* și *KDR*. De asemenea, au fost identificate gene mutante care au fost caracteristice pentru fiecare grup: *JAK3*, *KRAS* și *RB1* pentru endometrioză; și *PTPN11*, *RET*, *ALK*, *ATM*, *BRAF*, *HNF1A*, *HRAS*, *NOTCH1*, *NRAS*, *SMARCB1*, *SMO*, *STK11*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2* și *FGFR2* pentru carcinomul ovarian endometrioid. Au fost, de asemenea, identificate gene care sunt hipermetilate numai în probe de endometrioză, cum ar fi *PYCARD*, *RARB*, *RB1*, *IL2*, *CFTR*, *CD44* și *CDH13*. Alte gene precum *MLH3* au fost metilate numai în probe de carcinom endometrioid. Pentru grupul de cancer, a fost menționată o corelație între stadiul tumoral, aberațiile numărului de copii și prezența metastazelor. Mai mult, prezența variantelor patogene *BRCA1* a fost corelată cu gradul de diferențiere tumorală, numărului de copii aberante și variantele *TP53*. Pacientele cu endometrioză nu au prezentat nici o mutație patogenă *BRCA1 / 2*, dar au prezentat unele mutații *BRCA1 / 2* a căror semnificație clinică nu este încă cunoscută. În schimb, la pacientele cu cancer ovarian endometrioid, au existat 4 eșantioane (20%) care au prezentat mutații *BRCA1* patogene, dintre care un eșantion a prezentat două mutații. S-a arătat că hipometilarea *GATA2*, hipermetilarea *ATM*, hipometilarea *CREM*, gradul mai mare de diferențiere al tumorii sau stadiul tumoral avansat sunt asociate cu un prognostic slab la pacientele cu carcinom ovarian

endometrioid. Analiza ontologiei genelor pentru diferite gene mutante la pacientele cu cancer ovarian endometrioid și endometrioză a concluzionat că în ambele au fost prezente aceleași procese biologice și funcții moleculare.

Concluzii. Acest studiu a putut demonstra prezența unor căi similare care sunt modificate atât în cancerul ovarian endometrioid cât și în endometrioză, ceea ce ar putea însemna că un diagnostic de endometrioză ar putea reprezenta un marker precoce pentru diagnosticul de cancer.

Studiu 2. Evaluarea serologică a leziunilor endometrioze ovariene

Introducere, scop și obiective. Abordarea biomarkerilor biologici neinvazivi reprezintă o direcție utilă în diagnosticul endometriozei ovariene. Prezentul studiu își propune măsurarea concentrațiilor serice ale markerilor CA125, HE4 și CA72-4 la pacientele cu EndoOv comparativ cu patologia ovariană benignă precum și cu un lot control pentru a evalua valoarea prognostică.

Material și metodă. În acest studiu au fost incluse 29 paciente cu EndoOv, 21 cu ACB și 25 au fost CTR. Pacientele cu endometrioză ovariană (EndoOv) și alte chisturi benigne (ACB) înrolate au fost tratate în Clinica „Dominic Stanca”, Cluj-Napoca. Pacientele aparținând lotului control (CTR) au fost selectate din baza de evidență a Centrului Regional de Transfuzii, Cluj-Napoca, România. Patologiile au fost evaluate prin intervenție chirurgicală. Toate diagnosticele chirurgicale au fost validate prin rezultate histopatologice. Concentrațiile markerilor CA125, HE4 și CA72-4 au fost analizate din probe de ser cu ajutorul testului ELISA.

Rezultate. În cazurile de EndoOv concentrațiile serice ale markerilor au fost: pentru CA125 media=13.1, mediana=9.02 U/ml, deviația standard (DS) =14.4 U/ml; pentru HE4 media=7.8 ng/ml, mediana= 6.5 ng/ml, DS= 6.6 ng/ml iar pentru CA72-4 media=6.1 U/mL, mediana =4.9 U/mL, DS=4.7 U/mL. Analiza comparativă a lotului EndoOv cu lotul CTR pentru markerul CA125 a evidențiat o valoare $p = 0.0491$, semnificativă statistic cu un interval de încredere de 95%. Pentru markerul HE4 $p=0.0001$ a fost înalt semnificativ statistic cu un interval de încredere de 99.9% . Analizând OBC versus CTR pentru markerul HE4, $p = 0.0005$ a fost înalt semnificativ, cu un interval de încredere de 99.9%. Aria de sub curba ROC din grupul EndoOv a evaluat o valoare predictivă pozitivă pentru markerii CA72-4, CA125 și HE4. S-a observat o corelație puternică între HE4 și CA72-4 cu $p < 0.0001$ foarte semnificativă statistic iar coeficientul de corelație Spearman $r=0.74$ a evidențiat o asociere pozitivă semnificativă. Corelația dintre CA125 și CA72-4, HE4 a evidențiat o valoare p de 0.18 și respectiv 0.1 ne semnificativă statistic și coeficientul de corelație Spearman $r=0.17$ și 0.18 a sugerat o asociere slabă.

Analiza rețelei interconectate CA125 / HE4-miRNA a arătat că gena *MUC16* care codifică proteina CA125 și gena *WFDC2* care codifică proteina HE4 sunt țintite de unele

miARN-uri cunoscute ca fiind disregulate în endometrioză. Acestea sunt miR-1-3p, miR-125b-5p, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5 pentru *MUC16* și respectiv miR-155-5p pentru *WFDC2*.

Concluzii. Concentrațiile serice ale markerului CA125 au fost moderat crescute în EndoOv. Concentrațiile serice a markerilor HE-4 și CA72-4 nu au fost crescute la pacientele cu EndoOv. Endometrioza ovariană poate fi suspectată ori de câte ori nivelul markerului CA125 este crescut, în timp ce nivelul markerului HE4 rămâne în limite normale.

Studiu 3. Evaluarea performanței ultrasonografiei și a IRM-ului în diagnosticul preoperator al endometriozei e

Introducere, scop și obiective. În endometrioză ultrasonografia reprezintă examinarea de linia întâi în diagnosticul imagistic. IRM-ul reprezintă examinarea de linia a doua și investigația imagistică de referință în formele profunde. Obiectivele studiului au fost reprezentate de evaluarea performanțelor diagnostice ale ecografiei în cazul endometrioamelor, interpretate de un specialist în obstetrică-ginecologie, precum și ale IRM-ului pentru endometrioame, endometrioză profundă și adenomioză, interpretate de un radiolog generalist.

Material și metodă. Studiul a înrolat 2 loturi de paciente. Primul lot a inclus 48 de paciente diagnosticate ecografic cu o formațiune chistică ovariană/paraovariană. Analiza imaginilor a fost realizată de un număr de 10 medici cu specializarea obstetrică-ginecologie. Cel de-al doilea lot a inclus un număr de 36 de paciente diagnosticate cu endometrioză ovariană, profundă și adenomioză care au fost evaluate prin IRM. Ultrasonografia și IRM-ul s-au definit ca teste diagnostice raportate la examenul histopatologic, desemnat "gold standard". Parametrii statistici analizați au fost sensibilitatea (Se) și specificitate (Sp).

Rezultate. Evaluarea prin tehnica ultrasonografică în cazurile de endometrioză ovariană au evidențiat o Se=5% și o Sp=65%, valori mai mici decât cele citate în literatură. Evaluarea prin IRM în cazurile de endometrioză ovariană au evidențiat o Se=95% și o Sp=84%, valori comparabile cu cele din literatură. Pentru evaluarea endometriozei profunde s-au obținut în funcție de localizări: recto-sigmoidiană Se=75% și o Sp=84%, pentru LUS Se=63% și Sp=85%, pentru vagin +spațiu recto-vaginal Se=65% și Sp=92%, pentru vezică Se=60% și Sp=93%. În toate cazurile de endometrioză profundă Se și Sp au prezentat valori inferioare celor din literatură. În cazul adenomiozei Se=64% mai mică iar Sp=95% mai mare decât în literatură.

Concluzii. Diferența semnificativă obținută referitor la utilizarea ultrasonografiei ca test diagnostic raportate la literatura, atât pentru Se cât și pentru Sp, are ca substrat major variabilitate interindividuală a examinătorilor. Evaluând IRM-ul, valorile Se și Sp obținute pentru endometrioza ovariană sunt asemănătoare celor descrise în literatură. Provocarea imagistica o reprezintă endometrioza profundă și cea

cu localizări multiple. Studiul sugerează că radiologii trebuie să beneficieze de un training special în lecturarea IRM-ului de endometrioză profundă.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Subiectul acestei teze de doctorat are ca scop o abordare diagnostică cât mai riguroasă în intervalul evolutivității leziunilor endometrioze. Aspectul asocierii leziunilor endometrioze cu leziuni cu caracter premalign sau malign nu dispune în momentul de față de un protocol cu aspecte clar punctate și susținute științific. Precizarea unui diagnostic care are la bază elemente suficiente validate clinic, paraclinic și molecular și care să conducă spre un moment optim al acțiunii terapeutice, reprezintă conduita ideală de urmat. Determinarea markerilor serologici (CA125, HE4, CA72-4), realizarea examinărilor imagistice (ultrasonografie, IRM) și analiza moleculară (selectarea genelor de interes, secvențierea propriu-zisă, analiza bioinformatică a datelor) sunt esențiale în aplicabilitate susținută și un management corect al acestei patologii.

Datorită complexității evaluărilor și a selecționării riguroase a pacientelor, studiul a fost realizat într-o colaborare internațională. Astfel în cadrul Centrului de Cercetare pentru Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină Translațională al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca au avut loc prelucrarea markerilor moleculari și ai parametrilor serologici. Selectarea pacientelor a avut loc în cadrul Institutului Oncologic „Prof. dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca și al Clinicii de Obstetrică-Ginecologie "Dominic Stanca " Cluj-Napoca, Romania, și din cadrul Centrului de Endometrioză "Charles Nicolle ", Rouen Franța. Acest fapt a asigurat posibilitatea reală a atingerii obiectivelor propuse în teza de doctorat, datorită abordării transdisciplinare și internaționale a subiectului, cu aplicabilitate complexă, clinică și științifică, precum și datorită infrastructurii performante pe care o dețin unitățile medicale menționate.

Prin natura ei, cercetarea are o structura amplă. Aceasta implică utilizarea de tehnici de ultimă generație, precum secvențierea de nouă generație, care i-a adus cercetării o remarcare semnificativă, iar concluziile ei doresc să fie susținute atât teoretic cât și practic, cu o dovedită aplicabilitate a cercetării.

Contribuțiile inovative au ca și scop final dezvoltarea unui protocol de diagnostic care să permită o stadializare preoperatorie cât mai corectă, optimizarea timpului de diagnostic și stabilirea unor criterii pentru deciderea momentului operator, optimizarea și dezvoltarea unui protocol în vederea conduitei medicale în patologia leziunilor endometrioze.

PhD THESIS (ABSTRACT)

Molecular, serological markers and ultrasound parameters for malignant transformation of endometriotic lesions

PhD Student: **Adriana-Maria-Ioana Gaia (Oltean)**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABEL OF CONTENT

INTRODUCTION	1
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Endometriosis	5
1.1. Epidemiology and etiology	5
1.2. Pathophysiology	6
1.3. Classification of endometriosis	7
1.4. Clinical manifestations. Pain in endometriosis	8
1.5. Histological aspects	8
2. Malignant lesions	11
2.1. Malignant transformation of endometriosis	11
2.2. Ovarian Cancer Associated Endometriosis	11
2.3. Ovarian cancer	12
3. Molecular evaluation	15
3.1. gene expression	15
3.2. mi RNAs	17
3.3. DNA methylation	19
4. Serological markers	21
4.1. The CA125 markerul	21
4.2. The HE4 marker	22
4.3. The CA73-4 marker	22
5. Imagistic diagnosis	23
5.1. Ultrasound parameters	23
5.2. Magnetic Resonance Imaging Parameters	25
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Study hypothesis/objectives	29
2. General methodology	31
3. Study 1 - Evaluation of genetic alterations in patients with ovarian endometriosis and ovarian cancer	33
3.1. Introduction	33
3.2. Study hypothesis and objectives	35
3.3. Material and method	35
3.4. Results	39
3.5. Discussions	52

3.6. Conclusions	55
4. Study 2 - Serological evaluation of ovarian endometriotic lesions	57
4.1. Introduction	57
4.2. Study hypothesis and objectives	58
4.3. Material and method	58
4.4. Results	60
4.5. Discussions	69
4.6. Conclusions	70
5. Study 3 - Evaluation of the performance of ultrasonography and MRI in the preoperative diagnosis of endometriosis	71
5.1. Introduction	71
5.2. Study hypothesis and objectives	71
5.3. Material and method	71
5.4. Results	79
5.5. Discussions	82
5.6. Conclusions	84
6. General discussions	87
7. General conclusions	89
8. Originality and innovative contributions of the thesis	91
REFERENCES	93

Keywords: endometriosis, malignant transformation, common genetic alterations, CA125, imagistic evaluation, protocol update

INTRODUCTION

Endometriosis is a gynecological disease with a significant impact on the quality of life. Clinically it is described as a pathology with polymorphic symptoms and from a molecular point view endometriosis is characterized by a significant genetic instability. The association of endometriosis and ovarian cancer, especially endometrioid and clear cell cancer, is evidenced by several studies. The perspective of using molecular, serological biomarkers and imaging parameters as diagnostic and monitoring tools contributes to the identification of patients with endometriosis and to the assessment of the risk present in the evolution of this disease.

The research of this thesis took into account a complex vision of the proposed topic which was materialized through a multidisciplinary and international approach.

THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Endometriosis, defined as the presence and growth of endometrial tissue outside the uterine cavity, is one of the most common chronic, estrogen-dependent gynecological diseases. As an estimate, the prevalence of endometriosis is 20-30% reported in women with infertility and up to 40-60% in women with chronic pelvic pain.

Endometriotic pathology is considered an ideal target for genomic sciences. Histologically benign endometriosis can hide molecular abnormalities, which over time can lead to a malignant transformation. Developing data show the possibility of involving a dysregulation in the expression of miRNAs, which appear to be strong regulators of gene expression in endometriosis. The perspective of using miRNAs as biomarkers and therapeutic tools is a promising option. Aberrant DNA methylation, which is significantly involved in human carcinogenesis, is also a possible mechanism responsible for this disease.

At the serological level, in gynecological pathology one of the most used markers is CA125. The value of the marker is increased both in endometriosis and in other gynecological pathologies. Combining CA125 with other markers such as HE4 and CA72-4 increases diagnostic accuracy.

Imagistic investigations are the first stage of paraclinical awareness of the diagnosis. They contribute significantly to the orientation towards a certain therapeutic attitude. A good mapping and preoperative evaluation of endometriotic lesions is very important for patient counseling and for choosing the optimal therapeutic approach. The imagistic diagnosis of endometriotic lesions as the first line is made mainly using ultrasonography and as the second line is mentioned Magnetic Resonance Imaging (MRI).

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1 - Evaluation of genetic alterations in patients with ovarian endometriosis and ovarian cancer

Introduction, hypothesis and objectives. The association of endometriosis and ovarian cancer has been documented by several studies which showed that two main subtypes of ovarian carcinoma that can develop from endometriosis are endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma. This study proposes to correlate the genetic profile of patients with endometriosis and patients with endometrioid ovarian cancer, analyzing the *BRCA1* and *BRCA2* genes, DNA methylation profile and mutations identified in a specific subset of cancer-related genes.

Material and method. The study included 50 patients with endometriosis and 20 patients with endometrioid ovarian cancer. The patients were diagnosed and treated at Institute of Oncology „Prof. dr. Ion Chiricuta ”Cluj-Napoca and “ Dominic Stanca ”Clinic. The processing of the samples consisted in: extraction of DNA from tissue fixed in formalin and then included in paraffin, next generation sequencing (SNG), SNG data analysis, validation of mutations, evaluation of the methylation profile, achieving the methylation profile of ovarian cancer patients in TCGA databases, conducting the mutational profile of ovarian cancer patients in the TCGA database and statistical analysis.

Results. In this study I observed several mutated genes that were common for both types of patients: *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT* and *KDR*. They were also identified mutated genes that were characteristic for each group: *JAK3*, *KRAS* and *RB1* for endometriosis; and *PTPN11*, *RET*, *ALK*, *ATM*, *BRAF*, *HNF1A*, *HRAS*, *NOTCH1*, *NRAS*, *SMARCB1*, *SMO*, *STK11*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2* and *FGFR2* for ovarian endometrioid cancer. Genes that are highly methylated only in endometriosis samples like *PYCARD*, *RARB*, *RB1*, *IL2*, *CFTR*, *CD44* and *CDH13* were also identified. Other gene like *MLH3* was methylated only in endometrioid ovarian carcinoma samples. For the cancer group, a correlation between tumor stage, copy number aberrations and the presence of metastases was mentioned. Further, the presence of *BRCA1* pathogenic variants was correlated with tumor differentiation degree, copy number aberrations and *TP53* variants. Patients with endometriosis did not present any pathogenic *BRCA1* / 2 mutation, but did present some *BRCA1* / 2 mutations whose clinical significance is not yet known. In contrast, in patients with endometrioid ovarian cancer, there were 4 samples (20%) that showed pathogenic *BRCA1* mutations, of which one sample showed two mutations. It was showed that *GATA2* hypomethylation, *ATM* hypermethylation, *CREM* hypomethylation, higher tumor differentiation degree or higher tumor stage is associated with a poor prognosis in patients with ovarian endometrioid carcinoma. The analysis of gene ontology for different mutated genes in patients with endometrioid ovarian cancer and

endometriosis concluded that in both were present the same biological processes and molecular functions.

Conclusions. The study was able to demonstrate the presence of similar pathways being altered in both endometriosis and ovarian endometrioid carcinoma, which could mean that a diagnosis of endometriosis could be an early marker for cancer diagnosis.

Study 2 - Serological evaluation of ovarian endometriotic lesions

Introduction, hypothesis and objectives. The approach of non-invasive biological biomarkers is a useful direction in the diagnosis of ovarian endometriosis. The present study aims to measure the serum concentrations of the markers CA125, HE4 and CA72-4 in patients with EndoOv compared to benign ovarian pathology as well as with a control group in order to evaluate the prognostic value.

Material and method. This study included 29 patients with ovarian endometriosis (OvEndo), 21 with other benign cysts (OBC) and 25 were controls (CTR). Patients with OvEndo and OBC enrolled were treated in the "Dominic Stanca" Clinic, Cluj-Napoca. The patients belonging to the CTR group were selected from the evidence base of the Regional Transfusion Center, Cluj-Napoca, Romania. The pathologies were evaluated by surgery. All surgical diagnoses were validated by histopathological results. Concentrations of markers CA125, HE4 and CA72-4 were analyzed from serum samples by ELISA technique.

Results. In OvEndo group the serum concentrations of the markers were: for CA125 mean = 13.1, median = 9.02 U / ml, standar deviation (SD)= 14.4 U / ml; for HE4 mean = 7.8 ng / ml, median = 6.5 ng / ml, SD = 6.6 ng / ml and for CA72-4 mean = 6.1 U / mL, median = 4.9 U / mL, SD = 4.7 U / mL. The comparative analysis of the OvEndo group with the CTR group for the CA125 marker showed a p value = 0.0491, statistically significant with a 95% confidence interval. For the HE4 marker p = 0.0001 was statistically significant high with a confidence interval of 99.9%. Analyzing OBC versus CTR for the HE4 marker, p = 0.0005 was significantly high, with a confidence interval of 99.9%. The area under the ROC curve in the OvEndo group evaluated a positive predictive value for the markers CA72-4, CA125 and HE4. A strong correlation was observed between HE4 and CA72-4 with $p < 0.0001$ very statistically significant and the Spearman correlation coefficient $r = 0.74$ showed a significant positive association. The correlation between CA125 and CA72-4, HE4 showed a statistically insignificant p value of 0.18 and 0.1, respectively, and the Spearman correlation coefficient $r = 0.17$ and 0.18 suggested a weak association.

Analysis of the CA125 / HE4-miRNA interconnected network showed that *MUC16* gene encoding CA125 protein and *WFDC2* gene encoding HE4 protein are targeted by some miRNAs known to be dysregulated in endometriosis. These are miR-1-3p, miR-125b-5p, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5 for *MUC16* and miR-155-5p for *WFDC2*.

Conclusions. Serum concentrations of the CA125 marker were moderately elevated in OvEndo. Serum concentrations of HE-4 and CA72-4 markers were not increased in patients with OvEndo. Ovarian endometriosis may be suspected whenever the level of CA125 marker is increased, while the level of HE4 marker remains within normal limits.

Study 3. Evaluation of the performance of ultrasonography and MRI in the preoperative diagnosis of endometriosis

Introduction, hypothesis and objectives. In endometriosis, ultrasonography represent the first line examination of the imaging diagnosis. MRI is the second-line examination and the most common imaging investigation in deep forms. The objectives of this study were to evaluate the diagnostic performance of ultrasound in endometriomas, interpreted by a physician in obstetrics-gynecology, as well as MRI for endometriomas, deep endometriosis and adenomyosis, interpreted by a general radiologist.

Material and method. The study enrolled 2 groups of patients. The first group included 48 ultrasound-diagnosed patients with ovarian / paraovarian cysts. The images analysis was performed by a number of 10 physicians in obstetrics-gynecology. The second group included a number of 36 patients diagnosed with ovarian endometriosis, deep and adenomyosis who were evaluated by MRI. Ultrasonography and MRI were defined as diagnostic tests related to histopathological exam, considered "gold standard". The statistical parameters analyzed were sensibility (Se) and specificity (Sp).

Results. The ultrasonographic evaluation in ovarian endometriosis group showed Se = 5% and Sp = 65%, lower values compared to the literature. MRI evaluation of ovarian endometriosis cases showed Se = 95% and Sp = 84%, values similare to those presented in literature. For the deep endometriosis evaluation of each localisation I obtaiend: recto-sigmoid Se = 75% and Sp = 84% , LUS Se = 63% and Sp = 85%, vagina + recto-vaginal space Se = 65% and Sp = 92%, bladder Se = 60% and Sp = 93%. In all cases of deep endomeriosis, Se and Sp presented lower values compared to the literature. In the case of adenomyosis Se = 64% was lower and Sp = 95% higher comparing to literature.

Conclusions. The significant difference obtained regarding the use of ultrasonography as a diagnostic test, compared to the literature, for both Se and Sp, has as major substrate the interindividual variability of examiners. Se and Sp values obtained for MRI in ovarian endometriosis are similar to those described in literature. The imaging challenge is represented by deep endometriosis and multiple endometriosis localisation. The study suggests that radiologists should benefit from a special training in deep endometriosis MRI evaluation.

Originality and innovative contributions of the thesis

The subject of this thesis aims a diagnostic approach as rigorous as possible regarding to the evolution of endometriotic lesions. The association of endometriotic lesions with premalignant or malignant lesions does not currently have a protocol with clearly punctuated and extended scientifically supported aspects. A diagnosis with sufficient criterias validated clinically, paraclinically and molecularly leads to an optimal time of therapeutic action. The correlation of serological markers (CA125, HE4, CA72-4), imaging examinations (ultrasonography, MRI) and molecular analysis (selection of specific genes, sequencing technique, bioinformatics analysis of data) are essential in a sustained applicability and a proper management of this pathology.

Due to the complexity of the evaluations and the rigorous selection of patients, the study was accomplished in an international collaboration. Thus, within the Research Center for Functional Genomics, Biomedicine and Translational Medicine of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca were performed the processing of molecular markers and serological parameters. The selection of patients took place within the Oncological Institute „Prof. dr. Ion Chiricuță ”Cluj-Napoca and of the Obstetrics-Gynecology Clinic“ Dominic Stanca ”Cluj-Napoca, Romania, and within the Endometriosis Center“ Charles Nicolle ”, Rouen France. This fact ensured the real possibility of achieving the objectives proposed in this thesis, due to the transdisciplinary and international approach of the subject, with complex, clinical and scientific applicability, as well as due to the efficient infrastructure of the mentioned medical units.

By it's nature, the research has a complex structure. This involves the use of state-of-the-art techniques, such as next-generation sequencing, which has brought significant remark to the research. The conclusions of the thesis want to be supported both theoretically and practically, with a proven applicability of the research.

The innovative contributions have as final goal the development of a diagnostic protocol that allows a correct preoperative staging, optimizing the diagnosis time and establishing criteria for deciding the operative moment in the pathology of endometriotic lesions.