

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**„Aspecte genetice în cazul cuplurilor cu eșecuri reproductive”**

**- REZUMAT –**

Doctorand  
**Radu Anghel Popp**

Conducător științific  
**Prof. Univ. Dr. Ioan Victor Pop**

**CUPRINS**

<b>INTRODUCERE</b>	11
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	13
<b>1. Infertilitatea de cuplu</b>	15
<b>2. Avortul spontan</b>	17
2.1. Aspecte generale. Dimensiunea problemei	17
2.2. Cauzele avortului spontan	18
2.2.1. Cauzele non-genetice ale avortului spontan	18
2.2.2. Cauzele genetice ale avortului spontan	18
2.2.3. Avortul spontan idiopatic	19
<b>3. Infertilitatea masculină</b>	21
3.1. Aspecte generale. Dimensiunea problemei	21
3.2. Cauzele infertilității masculine	21
3.2.1. Cauze non-genetice ale infertilității masculine	22
3.2.2. Cauze genetice ale infertilității masculine	22
3.2.3. Infertilitatea masculină idiopatică	24
<b>4. Implicațiile folaților și a homocisteinei în reproducerea umană</b>	25
4.1. Aspecte generale	25
4.2. Acidul folic, homocisteina și avortul spontan	26
4.3. Acidul folic, homocisteina și infertilitatea masculină	27
4.4. Variante genice și modificările metabolismului acidului folic și al homocisteinei	28
<b>5. Trombofiiliile ereditare și avortul spontan</b>	31
5.1. Aspecte generale	31
5.2. Variante genice asociate cu trombofiiliile ereditare și avortul spontan	33
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	35
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	37
<b>2. Metodologie generală</b>	39
2.1. Tehnici de evidențiere a cromosomilor umani	39
2.1.1. Evidențierea cromosomilor din culturi de limfocite prin metodă indirectă	39
2.1.2. Tehnici de bandare. Bandarea G.	40
2.1.3. Cariotiparea	41

2.2. Izolarea și purificarea ADN genomic	41
2.3. Tehnica PCR-RFLP	43
2.3.1. Amplificarea fragmentelor ADN	44
2.3.2. Digestia ADN cu enzime de restricție	46
2.3.3. Separarea fragmentelor de ADN	46
2.3.4. Detecția fragmentelor de ADN	46
2.4. Tehnica ARMS - PCR	46
<b>3. Studiul a două mutații cu efect protrombotic și a unor polimorfisme genice la paciente cu avort spontan idiopatic</b>	49
3.1. Introducere	49
3.2. Obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.3.1. Lotul de studiu	50
3.3.2. Variante genice analizate	51
3.3.3. Analiza statistică	51
3.3.4. Descrierea metodelor utilizate pentru genotipare	52
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	70
<b>4. Studiul microdelețiilor cromosomului Y și a unor polimorfisme genice la bărbați cu infertilitate idiopatică</b>	89
4.1. Introducere	89
4.2. Obiective	90
4.3. Material și metodă	90
4.3.1. Lotul de studiu	90
4.3.2. Variante genice analizate	91
4.3.3. Analiza statistică	91
4.3.4. Descrierea metodelor de genetică moleculară	92
4.4. Rezultate	96
4.5. Discuții	107
<b>5. Concluzii generale</b>	119
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	121
<b>REFERINȚE</b>	123

Cuvinte cheie: avort spontan, azoospermie, mutații, polimorfism, gene, folați, homocisteină, trombofilii ereditare, asociere, microdeleții

Cunoașterea problemelor pe care le ridică sănătatea reproducerii reprezintă un element de importanță deosebită în medicina actuală. Infertilitatea, ridică probleme majore cuplurilor implicate, medicilor de diverse specialități și societății, ținând cont de faptul că, în statele dezvoltate ale lumii, afectează aproximativ 1 din 7 cuplurile care doresc să procreze. Cauzele eșecurilor de reproducere sunt diverse, astfel încât interesul diagnosticului etiologic corect este justificat, iar cercetarea medicală pe această temă se află în plină expansiune. Astăzi conform ghidurilor de investigație și terapie, după un an de relație în care un cuplu dorește un copil și nu reușeste obținerea unei sarcini, acel cuplu poate fi declarat ca steril. Aceasta poate avea la bază imposibilitatea unuia dintre parteneri de a genera gameți viabili. Pe de altă parte, în unele dintre cazurile de infertilitate de cuplu, se obțin sarcini, însă acestea sunt pierdute prin avort spontan. Cele două situații sunt privite ca entități distincte ca și cauze posibile cât și

ca mod de abordare a investigațiilor și eventual a terapiei. Având în vedere cauzele care generează eșecurile de reproducere, acestea sunt multiple: anatomice, endocrine, imunologice, infecțioase, mezologice, genetice sau combinații ale acestora. Avorturile spontane reprezintă una din cele mai întâlnite complicații ale sarcinii, care apare în aproximativ 15-20% din totalul sarcinilor, deși procentul poate fi chiar mai mare. Aproximativ 1 din 5 sarcini se va termina astfel, cu un avort spontan, frecvent până la vârsta de 12-14 săptămâni, iar 1-2% vor fi reprezentate de către avorturile recurente. Cauzele pot fi multiple, greu de identificat și de sistematizat și fac parte din două mari categorii: non-genetice și genetice. Nu rareori aceste cauze nu pot fi identificate cu certitudine, iar avortul declarat ca idiopatic este estimat astăzi, cu toate progresele medicale, la aproximativ 50% din cazuri.

Un alt aspect important al infertilității de cuplu este reprezentat de anomaliile gametogenezei. Între cele mai comune cauze ale infertilității de cuplu se numără cauzele masculine, studiile indicând că un bărbat din 20 are o problemă de fertilitate. După stabilirea diagnosticului clinic, investigarea mecanismelor care au generat anomaliile spermatogenezei constituie următorul pas, în funcție de care se realizează și terapia și se stabilesc eventual șansele cuplului de a procrea. Există încă multe necunoscute privind factorii etiologici, felul în care intervin factorii genetici și cei de mediu, multe aspecte rămânând a fi clarificate. Se estimează că în 30 până la 50% dintre cazurile de infertilitate de cuplu de cauză masculină se constată imposibilitatea precizării etiologiei, după parcurgerea tuturor etapelor de diagnostic clinic și paraclinic.

Diverse variante genice - mutații sau polimorfisme cu efecte funcționale, unele încă incomplet elucidate, sunt intens studiate și ar putea explica infertilitatea în unele cazuri declarate ca "idiopatic". Variante ale unor gene ce codifică compuși implicați în metabolismul foliaților și homocisteinei sau vitaminelor precum B12, zincului sau a altor micronutrienți reprezintă căi de abordare a etiologiei în cazul avortului spontan sau infertilității masculine. De asemenea mutații sau polimorfisme genice cu rol în trombofiliile ereditare, constituie subiect de dezbateră în literatura de specialitate.

Partea lucrării intitulată „Stadiul actual al cunoașterii” este structurată în 5 capitole care trec succint în revistă datele din literatură referitoare la infertilitatea de cuplu, avorturile spontane și infertilitatea masculină, cauzele genetice și non-genetice ale acestora. Capitolul 4 se referă la impactul foliaților și homocisteinei, precum și variantelor unor gene ce codifică proteine cu rol în metabolismul acestora în reproducerea umană, avortul spontan și infertilitatea masculină. Trombofiliile ereditare, unele mutații cu rol important în producerea acestora și relația cu avortul spontan reprezintă subiectul tratat în ultimul capitol al acestei părți.

Partea de contribuție personală include două studii care încearcă să stabilească frecvența unor variante alelice și genotipuri în două grupuri de pacienți cu probleme de fertilitate – avort spontan și respectiv infertilitate masculină - din populația din țara noastră și posibila asociere a acestor variante cu patologia investigată, prin raportare la grupuri de control constituite din subiecți sănătoși.

**Studiul 1** - Studiul a două mutații cu efect protrombotic și a unor polimorfisme genice la paciente cu avort spontan idiopatic.

**Introducere** - Avorturile spontane constituie una din componentele importante ale eșecului reproductiv la specia umană. Literatura de specialitate, arată că între 40 și 60% dintre cazuri, cu toate investigațiile efectuate, avortul este declarat, în final, idiopatic. În acest

context, cercetarea medicală își îndreaptă atenția în ultimii ani spre diverse mecanisme care ar putea să conducă la elucidarea cauzelor avortului spontan. Unele din aceste mecanisme vizează dezvoltarea și funcționarea placentei, vascularizația acesteia, sau alterarea altor procese fiziologice și moleculare care pot influența în sens negativ dezvoltarea produsului de concepție. Metabolismul folaților și homocisteinei fiind condiționate nu doar de aportul extern de folați, dar aflându-se și sub influența modului în care funcționează o serie de proteine și enzime implicate, expresia genelor ce codifică aceste proteine este subiect important de studiu. Variantele alelice ale unor gene ce codifică compuși implicați în metabolismul folaților și homocisteinei, au fost cercetate, în încercarea de a găsi eventuali factori de risc genetici ce se pot asocia cu avortul spontan. Alte variante genice au fost puțin studiate sau chiar nu au fost studiate deloc, în relație cu patologia amintită. În populația din România, studiile de genetică sunt puține, efectuate sporadic, iar în relație cu avortul spontan, studiile unor posibile variante de risc genetic sunt aproape absente.

**Obiective** – Studiul urmărește genotiparea a două mutații cu efect pro-trombotic – mutația G1691A la nivelul genei factorului V al coagulării (Leiden) și mutația G201210A la nivelul genei ce codifică factorul II al coagulării (protrombina), precum și a polimorfismelor C677T, A1298C și G1793A la nivelul genei *MTHFR* (metilentetrahidrofolat-reductaza), G1958A la nivelul genei *MTHFD1* (metilentetrahidrofolat-dehidrogenaza1), A2756G la nivelul genei *MTR* (*MS*) (metioninsintetaza), G66A la nivelul genei *MTRR* (*MSR*) (metionin sintetaza reductaza), G80A la nivelul genei Reduced Folate Carrier 1- *RFC1*, C776G la nivelul genei Transcobalaminei 2 – *TC2*, C1561T la nivelul genei Glutamat carboxipeptidaza II – *GCPII*, 844ins68 la nivelul genei Cistationin Beta Sintetaza – *CBS*, polimorfismul 3'UTR 1494del6 la nivelul genei Timidilat Sintetaza - *TYMS* și polimorfismul G742A la nivelul genei Betain-Homocistein S-metiltransferaza – *BHMT* la paciente cu avort spontan. Consecutiv am dorit analiza posibilei asocieri dintre variantele genice investigate și avortul spontan idiopatic și identificarea genotipurilor care ar putea constitui factori de risc asociați cu avortul spontan idiopatic în populația studiată.

**Material și metodă** - Studiul actual a fost realizat ca un studiu observațional de tip caz-control, la care au participat 266 de femei caucaziene din populația română. Participantele la studiu au fost recrutate din rândul pacientelor care s-au prezentat pentru consult, investigații și sfat genetic în Laboratorul de Explorări genetice II, Spitalul Clinic de Urgență pentru Adulți Cluj-Napoca în perioada 2007 – 2009, precum și femei recrutate pe bază de voluntariat din populația generală. Cele 266 de femei au fost împărțite în două loturi: 131 de femei au constituit lotul de paciente au fost femei de vârstă fertilă, cu cel puțin un avort spontan de prim trimestru (< 14 săptămâni), în antecedente, declarat ca idiopatic în urma anamnezei, investigațiilor clinice și paraclinice – imagistice, hormonale, dozarea anticorpilor antifosfolipidici, investigații pentru complexul TORCH și analiza cariotipului prin marcajul cromosomal cu benzi G. Anomaliile cromosomiale au fost excluse la aceste paciente și în cazul partenerului prin aceeași tehnică de cariotipare. Celelalte 135 de femei au avut cel puțin o sarcină necomplicată soldată cu nașterea unui copil sănătos, fără antecedente de avort spontan și au constituit lotul de control. Genotipurile au fost introduse într-o bază de date de tip Excel. Frecvențele alelice și ale genotipurilor au fost calculate pentru ambele grupuri și testul  $\chi^2$  a fost aplicat pentru a stabili dacă distribuția genotipurilor este în echilibru Hardy-Weinberg. A fost realizată compararea frecvențelor variantelor genice între cele două grupuri și testul Fisher a fost aplicat pentru a vedea dacă diferențele sunt semnificative statistic. Riscul

este prezentat ca și Odds ratio, pentru un interval de confidență de 95%. Rezultatele au fost considerate statistic semnificative la o valoare  $p < 0,05$ . Am utilizat analiza comparativă pentru două modele ipotetice: modelul dominant în care am comparat genotipurile homozigot pentru alela majoră + genotip heterozigot *versus* genotipul homozigot pentru alela minoră. În al doilea model ipotetic utilizat, am analizat modelul recesiv, adică posibilitatea ca doar genotipul homozigot să constituie factor de risc pentru avortul idiopatic. Întrucât în abordarea actuală al avortului spontan se acordă o atenție aparte cazurilor cu mai mult de trei avorturi consecutive (avort spontan recurent), am efectuat analize comparative cu lotul de control a subgrupului de paciente ( $n = 46$ ) cu avort spontan recurent ( $\geq 3$  avorturi) și pentru subgrupul de paciente ( $n = 85$ ) cu avort spontan non-recurent ( $< 3$  avorturi). Pentru a testa care sunt asocierile de genotipuri cele mai frecvente în populația studiată, am utilizat analiza factorială care explorează modelele de corelație/asociere dintre cele 14 variante genice în interiorul lotului de paciente cu avort spontan. Regresia logistică a fost utilizată pentru a testa asocierea celor mai frecvente haplotipuri în cazul polimorfismelor genice analizate.

### **Concluzii :**

În cazul avortului spontan există o mare heterogenitate privind vârsta la care se efectuează investigațiile genetice (citogenetice și/sau moleculare). Din punctul de vedere al numărului de avorturi după care se realizează aceste investigații, majoritatea pacientelor cu avort spontan încep investigațiile genetice pentru diagnosticul unor posibile cauze după pierderea a două sarcini.

În lotul de paciente cu avort spontan idiopatic mutația G20210A la nivelul genei protrombinei se corelează semnificativ cu riscul pentru această patologie, rezultatele fiind obținute pe seama genotipului heterozigot (modelul dominant).

Există o asociere cu avortul spontan idiopatic la limita semnificației statistice, pentru polimorfismul genei *MTHFR* C677T însă doar pentru genotipul 677TT (modelul recesiv) și doar în cazul avortului spontan recurent.

Asociere poate fi constatată și pentru polimorfismul *MTHFR* G1793A, în interiorul subgrupului avort recurent, în cazul în care considerăm prezența în genotip a alelei variante A ca factor de risc și analizăm genotipurile 1793 (GA + AA) *versus* 1793GG.

Pentru gena *MTHFR* haplotipurile rezultate din combinația genotipurilor *MTHFR* 1298 (AC+CC)/ *MTHFR* 1793 (GA+AA), manifestă o tendință de asociere cu avortul spontan în populația studiată.

Polimorfismul *MTRR* se asociază cu avortul spontan în populația studiată, genotipurile 66GA și 66AA analizate împreună (modelul dominant) fiind semnificativ asociate atât în cazurile de avort non-recurent, cât și în cazurile de avort recurent.

Aceeași variantă *MTRR* a fost genotipată mai frecvent împreună cu polimorfismul *GCPII* C1561T, haplotipurile rezultate din combinația acestor variante genice fiind statistic semnificativ asociate cu patologia investigată.

Alela 80A a genei *RFC1* este asociată cu un risc semnificativ în lotul de paciente analizat (modelul dominant), aspectul fiind constatat în subgrupul cu avort non-recurent.

Investigarea polimorfismului *CBS* constând în inserția 844ins68, arată că această variantă, analizată după un model dominant, manifestă o tendință spre asocierea cu avortul spontan, asocierea fiind aproape de semnificația statistică.

**Studiul 2** - Studiul microdelețiilor cromosomului Y și a unor polimorfisme genice la bărbați cu infertilitate idiopatică

**Introducere** - Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), în aproximativ 40% dintre cazurile cu probleme de fertilitate cauza este masculină, iar în aproximativ 20% dintre cazuri cauza este una combinată, atât feminină cât și masculină. Astfel, factorul masculin este implicat în mai mult de jumătate dintre cazuri la eșecul reproductiv al cuplurilor. Într-un procent ridicat de cazuri cauza exactă a infertilității masculine nu este identificată, iar cercetarea medicală este orientată spre identificarea mecanismelor încă neelucidate care generează problemele de fertilitate masculină. Anomaliile citogenetice numerice sau structurale mari cât și microdelețiile cromosomului Y, în regiunile AZF sunt cel mai bine cercetate ca și cauze ale infertilității sau subfertilității masculine. Legătura între sterilitatea sau subfertilitatea masculină și folați, nu este nouă. Cu toate acestea studiile care investighează posibilele asocieri între polimorfisme ale genelor ce codifică proteine cu rol major în metabolismul folaților, homocisteinei sau al vitaminei B12, sunt destul de puține. De asemenea rezultatele sunt departe de a fi ajuns la o concluzie unanimă. În plus, unele variante genice nu au fost încă deloc investigate în asocierie cu problemele de fertilitate masculină. În populația din România nu există aproape deloc studii de genetică în infertilitatea masculină, exceptând câteva studii sporadice citogenetice și de analiză a microdelețiilor Yq.

**Obiective** – Prin acest studiu am dorit analiza microdelețiilor regiunilor AZF a, b și c la nivelul cromosomului Y la pacienții cu azoospermie și oligozoospermie severă idiopatică, de natură non-obstructivă și compararea rezultatelor obținute la analiza microdelețiilor Yq cu un set de 6 markeri STS și respectiv 18 markeri STS. Am realizat apoi genotiparea și analiza distribuției a 12 polimorfisme genice: C677T, A1298C și G1793A la nivelul genei *MTHFR* (metilentetrahidrofolat-reductaza), G1958A la nivelul genei *MTHFD1* (metilentetrahidrofolat-dehidrogenaza1), A2756G la nivelul genei *MTR (MS)* (metioninsintetaza), G66A la nivelul genei *MTRR (MSR)* (metionin sintetaza reductaza), G80A la nivelul genei Reduced Folate Carrier 1- *RFC1*, C776G la nivelul genei Transcobalaminei 2 – *TC2*, C1561T la nivelul genei Glutamat carboxipeptidaza II – *GCPHII*, 844ins68 la nivelul genei Cistationin Beta Sintetaza – *CBS*, polimorfismul 3'UTR 1494del6 la nivelul genei Timidilat Sintetaza - *TYMS* și polimorfismul G742A la nivelul genei Betain-Homocistein S-metiltransferaza – *BHMT*, în populația masculină investigată. Ulterior, am urmărit analiza posibilelor asocieri a genotipurilor investigate, cu infertilitatea masculină idiopatică.

**Material și metodă** – La acest studiu au participat 134 de bărbați caucazieni din populația română, dintre care 67 au fost pacienți cu sterilitate sau subfertilitate (azoospermie non-obstructivă respectiv oligozoospermie severă), iar 67 au fost bărbați fertili. Participanții la studiu au provenit dintre pacienții care s-au prezentat pentru consult, investigații și sfat genetic în Laboratorul de Explorări genetice II, Cluj-Napoca în perioada 2007 – 2009, precum și subiecți voluntari recrutați pe bază de invitație de participare la studiu. La toți pacienții cu infertilitate, au fost consemnate toate datele referitoare la antecedentele personale patologice și la antecedentele heredocolaterale. Varicocelul, infecțiile urogenitale, patologia endocrină, criptorhidia sau alte anomalii morfologice congenitale ca posibilă cauză a problemelor de fertilitate au fost excluse prin examene de specialitate. Anomaliile cromosomiale și microdelețiile cromosomului Y au fost testate și excluse la 66 de pacienți, în urma investigațiilor citogenetice și moleculare, un pacient cu oligozoospermie severă fiind diagnosticat cu microdeleții ale cromosomului Y și exclus din studiul caz-martor. Microdelețiile cromosomului Yq au fost analizate prin tehnici de genetică moleculară, de tipul PCR simplex și multiplex utilizând amplificarea a 6 respectiv 18 markeri STS. Participanții la

studiul de asociere vizând polimorfismele genice, au fost împărțiți în două loturi: 66 de bărbați care au constituit lotul de pacienți au fost bărbați de vârstă fertilă, declarați cu infertilitate idiopatică în urma investigațiilor clinice și paraclinice (54 cu azoospermie non-obstructivă și 12 cu oligozoospermie severă). Lotul martor a fost format din 67 de bărbați fără probleme de fertilitate, care au avut cel puțin un copil sănătos. Au fost genotipate prin tehnici moleculare cele 12 polimorfisme genice. Frecvențele alelice și ale genotipurilor au fost calculate pentru ambele grupuri și testul  $\chi^2$  a fost aplicat pentru a stabili dacă distribuția genotipurilor este în echilibru Hardy-Weinberg. A fost realizată compararea frecvențelor polimorfismelor între grupuri și testul Fisher a fost aplicat pentru a verifica dacă diferențele sunt semnificative statistic. Pentru a testa care sunt asocierile de genotipuri cele mai frecvente în populația studiată, am utilizat analiza factorială. Regresia logistică a fost utilizată pentru a verifica asocierea celor mai frecvente haplotipuri. Riscul este prezentat ca și Odds ratio, pentru un interval de confidență de 95%. Rezultatele au fost considerate statistic semnificative la o valoare  $p < 0,05$ .

### **Concluzii:**

Frecvența microdelețiilor AZF Yq în populația studiată se află la limita inferioară a intervalului din literatură, ceea ce poate indica o eventuală problemă de selecție a cazurilor trimise curent spre investigație.

Analiza microdelețiilor Yq prin amplificarea cu setul minim acceptat (6 markeri STS), este concordantă cu analiza cu 18 markeri STS, rezultând că setul minim este suficient pentru diagnosticul corect al acestor anomalii.

Polimorfismul *BHMT* G742A, prezintă o asociere semnificativă în lotul de pacienți cu infertilitate masculină, aspect care poate fi observat și la analiza subgrupului de pacienți cu azoospermie.

Analiza genotipurilor *RFC1* 80GA și 80 AA arată o tendință de asociere inversă cu infertilitatea masculină, iar genotipul homozigot pentru alela comună 80G este cel puternic asociat cu riscul pentru această patologie.

Pentru gena *MTHFD1* rezultatele actualului studiu indică o asociere la limita semnificației statistice a genotipului homozigot pentru alela variantă 1958AA.

O singură combinație a variantelor genice investigate poate fi luată în considerare și anume *MTHFD1* 1958 (GA+AA)/*BHMT* 742 (GA+AA), însă aceste haplotipuri vor trebui investigate suplimentar ca potențiali factori de risc în infertilitatea masculină.

Pentru realizarea tezei au fost utilizate 180 de titluri bibliografice din literatura de specialitate.

## **Curriculum vitae Europass**

### **Informații personale**

Nume / Prenume Radu Anghel Popp  
Adresă Cluj-Napoca, str. Hateg, nr. 4, ap.28  
E-mail radupopp2001@yahoo.com  
Naționalitate Română  
Data nașterii 6 Iunie 1971  
Sex Masculin

### **Experiența profesională**

Perioada 10/2007-prezent  
Funcția sau postul ocupat Șef lucrări  
Activități și responsabilități principale Învățământ și activitate de diagnostic molecular și cercetare în patologia mendeliană și poligenică – Disciplina Genetică medicală, Laborator genetică  
Numele și adresa angajatorului Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” str. Victor Babeș nr. 8, Cluj-Napoca, România  
Tipul activității sau sectorul de activitate Învățământ, sănătate

Perioada 02/2007-prezent  
Funcția sau postul ocupat Biolog  
Activități și responsabilități principale Diagnostic molecular  
Numele și adresa angajatorului Laboratorul de genetică, Compartiment genetică, Clinica pediatrie I, Spitalul Clinic Județean de Urgență pentru Copii, Cluj-Napoca, str. Moșilor, nr. 33, Cluj-Napoca România  
Tipul activității sau sectorul de activitate Sănătate

Perioada 10/2002-10/2007  
Funcția sau postul ocupat Asistent  
Activități și responsabilități principale Învățământ și activitate de diagnostic citogenetic, molecular și cercetare în patologia cromosomală mendeliană și poligenică – Catedra Genetică medicală, Laborator disciplină Investigații genetice II  
Numele și adresa angajatorului Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, str. Victor Babeș nr. 8, Cluj-Napoca, România  
Tipul activității sau sectorul de activitate Învățământ, sănătate



Perioada 10/1999-10/2002  
 Functia sau postul ocupat Preparator  
 Activitati si responsabilitati principale Învățământ și activitate de diagnostic citogenetic, molecular și cercetare în patologia cromosomală mendelienă și poligenică – Catedra Genetică medicală, Laborator disciplină Investigații genetice II  
 Numele si adresa angajatorului Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, str. Victor Babeș nr. 8, Cluj-Napoca, România  
 Tipul activității sau sectorul de activitate Învățământ, sănătate

Perioada 09/1996-11/1997  
 Functia sau postul ocupat Biolog  
 Activitati si responsabilitati principale Cercetare, biochimie, culturi țesuturi  
 Numele si adresa angajatorului Laboratorul Biochimie cercetare, Institutul Oncologic “Ion Chiricuță” Cluj-Napoca, str. Ion Creangă, Cluj-Napoca România  
 Tipul activității sau sectorul de activitate Sănătate, cercetare

### **Educație**

Perioada 1991-1996  
 Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite Biolog  
 Biolog specialist  
 Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare Universitatea Babeș-Bolyai, Facultatea de Biologie, Geografie și geologie, Cluj-Napoca, România

Perioada 1996-2002  
 Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite Medicină  
 Medic  
 Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină, Cluj-Napoca, România

Perioada 11/2003-prezent  
 Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite Program de studii doctorale  
 Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România

## Cursuri și specializări

Perioada	02/2004-02/2010
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Program de formare în rezidențiat, specialitatea Genetică medicală Medic specialist Genetică medicală
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină, Cluj-Napoca, România
Perioada	10/2005-01/2006
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Bursier, stagiu în genetică judiciară, genetică moleculară
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Laborator de Biochimie, Toxicologie și Genetică, Hopital Raymond Poincaree, Garche, Franța, Bursă Asociația Pont Neuf, Paris, Franța
Perioada	18-20 septembrie 2006
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Curs post-universitar: “Impactul Geneticii în Patologia Umană”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

**Apartenența la societăți profesionale** European Society of Human Genetics (ESHG)  
Asociația Română de Medicină de Laborator (ARML)  
Societatea Națională de Biologie Celulară (SNBC)  
Societatea Română de Genetică Medicală (SRGM)

Limba maternă Română

Limbi străine cunoscute

Autoevaluare <i>Nivel european</i> (*)	Înțelegere		Vorbit		Scris
	Ascultare	Citire	Conversație	Discurs	Exprimare scrisă
<b>Franceza</b>	Utilizator independent	Utilizator independent	Utilizator independent	Utilizator independent	Utilizator independent
<b>Engleza</b>	Utilizator independent	Utilizator independent	Nivel de bază	Nivel de bază	Nivel de bază

<b>Competențe și aptitudini organizatorice</b>	<p><b>Membru în Comitetul de organizare al manifestărilor științifice:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conferința Anuală a Societății Române de Genetică Medicală, Cheile Grădiștei, județul Brașov, 25-27 mai, 2007</li> <li>- Al II-lea Congres Național de Genetică Medicală cu participare internațională, Cluj-Napoca, 20-23 septembrie, 2006</li> </ul> <p><b>Organizator a 2 workshop-uri, în cadrul unor manifestări științifice:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- “JAK2 p.V617F mutation in myeloproliferative neoplasms: one mutation, two detection techniques”, în cadrul 10<sup>th</sup> International Congress for Medical Students and Young Doctors Medicalis, Cluj-Napoca, 14-17 mai 2009</li> <li>- “Genetic aspects of infertility”, în cadrul 9<sup>th</sup> International Congress for Medical Students and Young Doctors Medicalis, Cluj-Napoca, 8-11 mai 2008</li> </ul>
<b>Competențe și aptitudini tehnice</b>	<p>Tehnici de citogenetică și genetică moleculară:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- cariotip cu benzi G</li> <li>- extracția acizilor nucleici</li> <li>- tehnici bazate pe reacția PCR: simplex și multiplex PCR, PCR-RFLP, ARMS-PCR, tetra-primer PCR, secvențare ADN</li> <li>- electroforeza acizilor nucleici</li> <li>- Implementarea studiului a peste 100 de mutații și polimorfisme diferite, implicate în diverse patologii monogenice și multifactoriale/poligenice</li> </ul> <p>Laboratorul de Genetică al Disciplinei de Genetică Medicală, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca și Laboratorul Compartimentului de Explorări Genetice, Clinica Pediatrie I, Cluj-Napoca.</p>

## ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

### Lucrări științifice relevante publicate în extenso:

#### ISI

1. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Coadă CA, Urian LG, Militaru MS, Bănescu C, Dima D, Farcas MF, Crisan TO, Petrov L, Gug C, Pop IV. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. Leuk Lymph.2012; in-press.
2. Kacso IM, Trifa AP, Popp RA, Kacso G. Association of 276G>T adiponectin gene polymorphism to plasma adiponectin and albuminuria in type 2 diabetic patients. Int Urol Nephrol. 2012 Jan 6. [Epub ahead of print].
3. Crișan TO, Farcas MF, Trifa AP, Plantinga TS, Militaru MS, Pop IV, Netea MG, Popp RA. TLR1 polymorphisms in Europeans and spontaneous pregnancy loss. Gene. 2012; 494(1):109-11.

4. Crișan TO, Trifa A, Farcaș M, Militaru M, Netea M, Pop I, Popp R. The MTHFD1 c.1958 G>A polymorphism and recurrent spontaneous abortions. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24(1):189-92.
5. Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Militaru CF, Bocsan CI, Farcas MF, Pop IV. Screening for *CYP2C19*\*2, \*3 and \*4 gene variants in a Romanian population study group. *Farmacologia.* 2010; 58(6):806-17.
6. Trifa AP, Crișan S, Popp RA, Cucuianu A, Buzoianu AD. JAK2 46/1 haplotype seems not to be associated with lower limb deep venous thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Oct 15;45(3):199-200.
7. Militaru MS, Popp RA, Trifa AP. Homozygous G320V mutation in the *HJV* gene causing juvenile hereditary haemochromatosis type A. A case report. *J Gastrointest Liver Dis.* 2010 Jun;19(2):191-3.
8. Trifa AP, Cucuianu A, Petrov L, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 2010 Oct;89(10):979-83.
9. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crisan TO, Popp RA. Association of methionine synthase A2756G SNP, methionine synthase reductase G66A and male infertility. *Rom Rev Med Lab.* 2010;17(4):17-25.
10. Lazăr C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, Figan I, Grigorescu-Sido P. Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the *GJB2* gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 ;74(4):351-5.
11. Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA. Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the *JAK2* rs10974944 SNP, which might predispose to the acquisition of somatic mutation *JAK2*(V617F). *Acta Haematol.* 2010;123(2):84-7.
12. Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru C, Bocsan IC, Pop IV. Analysis of the *CYP2C19*\*2 and \*3 gene variants in a Romanian population. Proceedings of the 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics – EACPT Edinburgh, 2009:47-55.
13. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Patiu M, Pop IV. JAK2 p.V617F mutation-tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in MPN. *Rom Rev Med Lab.* 2009; 14(1):25-30.
14. Dima D, Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA, Patiu M, Petrov L. Monitoring T315I mutation in chronic myeloid leukemia by amplification refractory mutation system PCR. *Rom Rev Med Lab.* 2008;13(4):17-20.
15. Hotoleanu C, Popp R, Trifa AP, Nedelcu L, Dumitrascu DL. Genetic determination of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2008;14(43):6636-40.
16. Konig EA, Koves I, Rasinariu A, Popp AR, Kusser WC, Soyonki K, Koves A, Glickman BW, Jenei A, Marcsek ZL. Alterations of *k – ras* and *p53* mutations in colorectal cancer patients in Central Europe, *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 2001; 62(5):333 – 47.

## **BDI**

1. Popp RA, Farcas MF, Trifa AP, Militaru MS, Crisan TO, Pop IV, The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (*MTHFD1*) gene G1958A polymorphism and idiopathic male infertility in a romanian population group, *Clujul Medical.* 2012; 85(1): 54-8.
2. Popp RA, Crisan TO, Trifa AP, Militaru MS, Rotar IC, Farcas MF, Pop IV, The C677T Variant in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Spontaneous Abortion in a Romanian Population Group, *Notulae Scientia Biologicae.* 2012; 4 (1): *in press.*

3. Popp R, Crisan T, Rotar I, Farcas M, Trifa A, Militaru M, Pop I. Cystathionine  $\beta$ -synthase 844ins68 Genetic Polymorphism in Spontaneous Abortion Susceptibility. *Applied Medical Informatics*. 2011; 29(4): 34-40.
4. Popp RA, Trifa AP, Rotar I, Farcaș MF, Crișan TO, Pop IV, Polimorfismele A1298C și G1793A la nivelul genei *MTHFR* într-un grup de paciente cu avort spontan idiopatic, *Obstetrica și Ginecologia*. 2011; LIX (3): 193-9.
5. Catana A, Popp RA, Pop M, Trifa AP, Porojan M, Petrisor F, Farcas M, Pop IV. Genetic Polymorphism of Glutathione S Transferase and Lung Cancer Risk in Northern Romania. *Clujul Medical*. 2011; 84(4): 520-23.
6. Buzoianu A, Bocsan IC, Maier C, Trifa AP, Popp RA, Perju Dumbrava L, Sabin O, Militaru FC, Brusturean E, Major Z, Popescu C. Genotype-phenotype correlations between the alleles of the *MDR1* C3435T polymorphism and pharmacokinetic parameters in Romanian epileptic patients. *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology*, 2011;1:40-4.
7. Catana A, Popp R, Pop M, Porojan M, Trifa A, Petrisor F, Hancu BD, Pop IV. Alpha1 Antitrypsin Deficiency and Lung Cancer Risk, *Clujul Medical*. 2011; 84(suppl 1): 20-3.
8. Trifa AP, Patiu M, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Pop IV, Popp RA, Systemic Mastocytosis Associated with the *C-Kit* D816v Mutation—Importance of Molecular Diagnosis and Therapeutic Implications. *Case Report. Timisoara Med Journal*, 2010; 2-3: 241-43.
9. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crișan T, Pop IV, Popp RA. Methylenetetrahydro folate reductase G1793A polymorphism and male infertility in a Romanian population group. *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții* 2010;20( 1):31-5.
10. Rotar I, Bolboacă S, 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.
11. Hoțoleanu C, Popp R, Dumitrașcu DL. Genetic polymorphism of SERT receptors. 2010; 83 (suppl 2): 31-32.
12. Farcas MF, Trifa AP, Popp RA, Crisan TO, Militaru MS, Pop IV, Lazar C. Screening for 35delG and W24X in the *GJB2* gene in a Romanian population group. *Annals of RSBC*.2010;XV(1):304-10.
13. Bocsan IC, Major ZZs, Maier C, Pop R, Iuga C, Trifa A, Militaru Florentina FC, Buzoianu AD. Study of the phenotypic variation expression in the metabolizing status of romanian epileptic patients. *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology*, 2010;3:224-28.
14. Popp RA, Trifa AP, Militaru M, Crisan TO, Petrisor F, Farcas MF, Csernik FA, Pop IV, Methioninesynthase reductase (*MTRR*) gene 66G>A polymorphism as a possible risk factor for recurrent spontaneous abortion, *Annals of RSCB*. 2009; 14(1): 28-32.
15. Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Farcas MF, Crisan T, Petrisor F, Pop IV. Prevalence of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A mutations among a group of women with recurrent spontaneous abortions. *Annals of RSCB*. 2009;14(2):42-6.
16. Coldea C, Popp RA, Trifa AP, Zimmermann A, Al-Khzouz C, Craciun A, Grigorescu – Sido P. Polimorfismul Apoproteinei E la pacienții cu boală Gaucher tip I. *Clujul Medical*. 2009;82(4):586-90.
17. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crisan T, Pop IV, Popp RA. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism and male infertility in a Romanian population group. *Maedica - A Journal of Clinical Medicine*. 2009;4(4):294-99.
18. Stamatian F, Caracostea G, Mureșan D, Bartok I, Militaru M, Procopciuc L, Popp R, Trifa A. The evaluation of inherited thrombophilic conditions in patients with bleeding in the first trimester of pregnancy. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. 2009;1(1):9-17.

19. Popp RA, Badea M, Hedesiu M, Trifa AP, Serbanescu A, Farcas MF, Crisan TO, Tosa F, Petrisor F, Badea AF, Militaru MS. The -799C/T polymorphism of the matrixmetaloproteinase 8 (*MMP8*) gene in periodontal disease – a case-control study. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(2):67-72.
20. Farcas MF, Antonesei M, Trifa AP, Popp RA, Crisan TO, Petrisor F, Pop IV. Molecular diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia in a Romanian population group. *Annals of RSCB*. 2009;XIV (2): 28-32.
21. Crisan TO, Trifa AP, Farcas MF, Csernik FA, Petrisor F, Militaru M, Pop IV, Popp RA. The C936T polymorphism of the *VEGF* gene in Romanians–distribution analysis in healthy volunteers and in recurrent spontaneous abortion patients. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(1);91-97.
22. Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Crisan TO, Farcas MF, Csernik FA, Petrisor F, Pop IV. Buzoianu AD. The C and T alleles of the *MDR1* C3435T polymorphism share similar frequencies in the Romanian population. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(1):68-73.
23. Farcas MF, Csernik FA, Popp RA, Trifa AP, Crisan T, Petrisor F, Pop IV, Militaru M. The Interleukin 4 VNTR polymorphism frequency in a Romanian population group. *Annals of RSCB*. 2009; XIV(1):97-102.
24. Trifa AP, Popp RA, Mariela M, Ioana P, Tania C, Pop IV. Frecventa mutatiilor C282Y si H63D de la nivelul genei *HFE* intr-un grup din populatia romana. *Analele Societatii de Biologie Celulara*. 2008;XII:218-22.
25. Popp RA, Trifa AP, Militaru M, Crisan T, Patrascoiu I, Pop IV, Studiul polimorfismelor C776G în gena *TC2* și C1561T în gena *GCPII* la cupluri cu avorturi spontane recurente, *Analele SRBC*. 2007; 12(1): 227-32.
26. Crisan T, Popp RA, Trifa AP Militaru M, Patrascoiu I, Pop IV, Polimorfismul A2756G de la nivelul genei Metionin sintetazei si avortul spontan recurent, *Analele Societății Naționale de Biologie Celulară*. 12(1); 2007: 223-6.
27. Hotoleanu C, Popp R, Trifa A, Andercou A. Tromboflebita profunda la un pacient dublu heterozigot pentru factorul V Leiden si 1298A>C metilen tetrahidrofolat reductaza. *Clujul Medical*. 2007;4:916-21.
28. Popp RA, Militaru M, Trifa AP, Pop IV. Analiza clinică, citogenetică și moleculară într-un caz de sterilitate masculină cu constituție cromosomală 46,XX- sindrom De La Chapelle SR Y pozitiv. *Analele Societății de Biologie Celulară*. 2006;11(1):325-29.

## **Experiența dobândită în proiecte de cercetare**

### Proiecte internaționale

1. COST Action BM0902: Rețea de experți în diagnosticul neoplasmelor mieloproliferative (MPD), proiect PC7, coordonator Dr. Sylvie Hermouet, Nantes, Franța, perioada de desfășurare 2009-2013 - funcția în cadrul proiectului: membru supleant din partea României în Comitetul de Management al proiectului.

### Proiecte naționale

1. Metode si tehnici noi in depistarea precoce a anomaliilor cromosomiale la fat”- Program National C-D Orizont 2000; U.M.F. Cluj-Napoca. Director proiect - Prof. Dr. F. Stamatian, perioada de desfășurare: 2002 –2003 - membru al echipei de cercetare.
2. Polimorfismul genelor *ABCG5/G8*, *ABCB4* si *ABCB11* la pacienții cu litiază biliară colesterolică și în populația generală. Grant CNCSIS tip A. Director de proiect: Prof Dr. Monica Acalovschi, perioada de desfășurare: 2005 –2007 - membru al echipei de cercetare.

- 3.** Bioinformatica secvențelor genice implicate în diviziunea celulară la procariote”, Contract CEx-05-D11-52/07.10.2005, consorțiu cu U.B.B. Cluj-Napoca (coordonator), U.T. Cluj-Napoca (P-1), I.C.B. Cluj-Napoca (P-2), U.M.F. Cluj-Napoca (P-3), I.N.T.I.M. Cluj-Napoca (P-4) director grant Prof. Dr. Octavian Popescu, perioada de desfășurare: 2005 –2008 - membru al echipei de cercetare.
- 4.** Elaborare de standarde-cuantificări imagistice privind atrofia cerebrală fiziologică și patologică, corelate cu date clinico-morfo-genetice. Implicații în recuperarea/integrarea socio-profesională, RADINDEX. Proiect CeEX 132/2006. Director proiect: Prof Dr. Sfrangeu Silviu Andrei, perioada de desfășurare: 2006 –2009 - membru al echipei de cercetare.
- 5.** Diagnostic molecular al epidermolizelor buloase. Tehnici moderne de cercetare, diagnostic, tratament și prevenire a epidermolizelor buloase. Realizarea unui registru național al genozelor dermatozelor, proiect CeEX 126/2006. Director proiect : Prof Dr. Rodica Cosgarea, perioada de desfășurare: 2006 –2009 - membru al echipei de cercetare.
- 6.** Implicarea polimorfismelor genetice în dezvoltarea, și evoluția parodontopatiilor. Definierea rolului tehnicilor imagistice în depistarea, evaluarea și monitorizarea acestei afecțiuni, grant PNCDI II - Idei, director de proiect Prof. Dr. Badea Mîndra Eugenia, perioada de desfășurare: 2007 –2010 - membru al echipei de cercetare.
- 7.** Implicațiile adiponectinei și polimorfismului genei *ADIPOQ* în progresia nefropatiei din diabetul zaharat tip 2 și în patologia cardiovasculară asociată. Studiu clinic și experimental, grant PNCDI II , Idei, Director proiect Prof. dr. Nicolae Hancu, perioada de desfășurare: 2008 –2011 - membru al echipei de cercetare.
- 8.** Ateroscleroza și osteoporoza- de la observația clinică la studiul genetic. Evaluarea factorilor de risc comuni, a statusului vitaminei K și a unor gene implicate în etiopatogeneza celor două boli, ATEROST, grant PNCDI II Parteneriate, coordonator proiect Conf. Dr. Daniela Fodor, perioada de desfășurare: 2008-2011- membru al echipei de cercetare.
- 9.** Impactul farmacogenomic al determinării polimorfismelor genelor *VKORC1* și *CYP2C9* asupra eficacității, siguranței și costurilor tratamentului anticoagulant oral, TROMBOGEN, grant PNCDI II Parteneriate, coordonator proiect Prof Dr. Anca Buzoianu, perioada de desfășurare: 2008-2011 - membru al echipei de cercetare.
- 10.** Implicații farmacogenomice ale polimorfismelor genelor *CYP2C9*, *CYP2C19* și *MDR1* în aprecierea eficacității terapeutice a medicamentelor antiepileptice în epilepsia idiopatică, FARMACYP, grant PNCDI II tip Parteneriate, coordonator proiect Prof. Dr. Anca Buzoianu, perioada de desfășurare: 2007-2010 - membru al echipei de cercetare.
- 11.** Investigarea unor cauze genetice ale tulburărilor de reproducere în populația din România, utilizând metode citogenetice și moleculare, cu impact asupra ameliorării sfatului genetic și a profilaxiei, proiect CNCSIS tip A, coordonator proiect Prof Dr. Ioan Victor Pop, perioada de desfășurare: 2007-2009 - membru al echipei de cercetare.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

**DOCTORAL THESIS**

**„Genetic aspects in couples with reproductive failures”**

**- ABSTRACT -**

PhD student  
**Radu Anghel Popp**

Scientific coordinator  
**Prof. Univ. Dr. Ioan Victor Pop**

**TABLE OF CONTENTS**

<b>INTRODUCTION</b>	11
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	13
<b>1. Couple infertility</b>	15
<b>2. Spontaneous abortion</b>	17
2.1. General aspects. The dimension of the problem	17
2.2. The causes of spontaneous abortions	18
2.2.1. Non-genetic causes of spontaneous abortions	18
2.2.2. Genetic causes of spontaneous abortions	18
2.2.3. Idiopathic spontaneous abortions	19
<b>3. Male infertility</b>	21
3.1. General aspects. The dimension of the problem	21
3.2. The causes of male infertility	21
3.2.1. Non-genetic causes of male infertility	22
3.2.2. Genetic causes of male infertility	22
3.2.3. Idiopathic male infertility	24
<b>4. The implications of the folates and homocysteine in human reproduction</b>	25
4.1. General aspects	25
4.2. The folic acid, homocysteine and spontaneous abortions	26
4.3. The folic acid, homocysteine and male infertility	27
4.4. Genes variants and the folates and homocysteine metabolism changes	28
<b>5. The hereditary thrombophilia and spontaneous abortions</b>	31
5.1. General aspects	31
5.2. Genetic variants associated with hereditary thrombophilia and spontaneous abortions	33
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	35
<b>1. Working hypothesis</b>	37
<b>2. General methodology</b>	39
2.1. Techniques for human chromosomal diagnostic	39
2.1.1. Indirect method for chromosomal diagnostic	39
2.1.2. Chromosomal banding techniques. G banding.	40
2.1.3. Karyotyping	41
2.2. Genomic DNA isolation and purification	41



2.3. PCR-RFLP technique	43
2.3.1. DNA fragments amplification	44
2.3.2. DNA digestion with restriction enzymes	46
2.3.3. DNA fragments separation	46
2.3.4. DNA fragments detection	46
2.4. ARMS - PCR technique	46
<b>3. The study of two thrombophilic mutations and some genic polymorphisms in patients with idiopathic spontaneous abortions</b>	49
3.1. Introduction	49
3.2. Objectives	50
3.3. Material and methods	50
3.3.1. The studied population	50
3.3.2. Genic variants analysed	51
3.3.3. Statistical analysis	51
3.3.4. The methods used for genotyping	52
3.4. Results	59
3.5. Discussions	70
<b>4. The study of Y chromosome microdeletions and some genic polymorphisms in males with idiopathic infertility</b>	89
4.1. Introduction	89
4.2. Objectives	90
4.3. Material and methods	90
4.3.1. The studied population	90
4.3.2. Genic variants analysed	91
4.3.3. Statistical analysis	91
4.3.4. The molecular methods used	92
4.4. Results	96
4.5. Discussions	107
<b>5. General conclusions</b>	119
<b>6. The original elements of thesis</b>	121
<b>REFERENCES</b>	123

Keywords: spontaneous abortion, azoospermia, mutations, polymorphism, gene, folates, homocystein, hereditary thrombophilia, association, microdeletions

The knowledge of the problems brought up to surface in the field of reproductive health is of significant importance in nowadays' medicine. Infertility is one major concern affecting couples, medical doctors and society in general, as it reaches approximately 1 in 7 couples willing to procreate. The causes of reproductive failure are diverse, therefore the interest to determine the right etiologic diagnoses is justified and medical research in this direction is continuously expanding. Today, according to clinical and therapeutic guidelines, one couple can be declared sterile after one year of unsuccessful attempts to conceive. On the one hand, this situation could be determined by one of the partners' inability to produce viable gametes. On the other hand, as occurring in other infertile couples, pregnancies can be achieved, but they are lost through spontaneous abortion. These two situations are treated as distinct entities in what concerns their causes, investigation protocols and therapy. The causes

involved in reproductive failure are numerous: anatomical, endocrine, immunological, infectious, environmental, genetic or combinations of these. Spontaneous abortions are one of the most frequent pregnancy disorders, observed in approximately 15-20% of total pregnancies, although this proportion could even be higher. Roughly 1 in 5 pregnancies would, thus, end in spontaneous abortion, the majority until the gestational age of 12-14 weeks, and 1-2% would account for recurrent spontaneous abortions. The etiologies of spontaneous abortions can be multiple, not easy to identify and systematize, and belong to two major categories: non-genetic and genetic. Not infrequently, despite all medical advances, these causes cannot be identified with certainty, and the abortion declared idiopathic remains the final diagnosis in approximately 50% of cases.

One other important side of the couple infertility problem is represented by the gametogenic anomalies. Among the commonest infertility causes are those of male origin, studies showing that 1 man in 20 has fertility problems. After the clinical diagnosis is complete, the mechanisms generating the spermatogenic anomalies are subsequently investigated. This will determine future therapy and chances to conceive. It is estimated that in 30-50% of couples confronting male infertility, no responsible cause is determined upon all clinical and para-clinical diagnosis attempts.

Diverse gene variants – mutations or polymorphisms with functional effects, some not completely elucidated – are intensely studied and could explain infertility in some of the cases declared „idiopathic”. Variations of some genes encoding products involved in the metabolism of folates, homocysteine, B12, zinc or other micro-nutrients are directions of research in the etiology of spontaneous abortions and male infertility. In line with these stand also the mutations and polymorphisms involved in hereditary thrombophilias, as subjects of debate in the scientific literature.

The first section of this work, under the name „Current state of knowledge”, is structured in 5 chapters that succinctly review the literature data referring to couple infertility, spontaneous abortion and male infertility, and their genetic and non-genetic causes. Chapter 4 describes the impact of folates and homocysteine, as well as gene variants related to their metabolism, on human reproduction, spontaneous abortion, male infertility. Hereditary thrombophilias, some mutations with important role in their determination, and their relation to spontaneous abortions are subject to the last chapter of this section.

The personal contribution section of this work includes two studies that aimed at establishing the frequency of some allelic variants and genotypes in two groups of Romanian patients with infertility problems (spontaneous abortion and male infertility). Moreover, the possible correlation between these genetic variations and the studied pathologies were analyzed by reference to healthy volunteer control groups.

**Study no. 1** – The study of two mutations with pro-thrombotic effect and several other gene polymorphisms in patients with idiopathic spontaneous abortions and control volunteers.

**Introduction** - Spontaneous abortions are one of the most important determinants of reproductive failure in humans. The scientific literature shows that in 40-60% of cases, after all investigations, the abortion is declared idiopathic. In this context, recent years' medical research has been directed towards mechanisms that could elucidate the causes of spontaneous abortions. Some of these mechanisms involve the development and function of the placenta, its vascularization, or other physiological and molecular processes that could negatively alter the development of the embryo. The folate and homocysteine metabolism is

not only conditioned by external folate intake, but also by internal functioning of specific proteins and enzymes, thus, the variation of genes coding for these proteins is an important subject of study. Some allelic variants of these genes have been previously investigated as putative risk factors associated with spontaneous abortions. Other gene variants have to a lesser degree, or not at all, been considered in relation to this pathology. In the Romanian population, genetic studies are few, sporadically undertaken, and, in relation to spontaneous abortions, they are almost non-existent.

**Objectives** – This study aims to genotype spontaneous abortion patients for the following gene variations: two pro-thrombotic mutations – the Leiden mutation (G1691A) in coagulation factor V and the G20210A mutation in coagulation factor II (prothrombin) – and several gene polymorphisms – *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase) C677T, A1298C and G1793A, *MTHFD1* (methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 1) G1958A, *MTR (MS)* (methionine synthase) A2756G, *MTRR (MSR)* (methionine synthase reductase) G66A, *RFC1* (reduced folate carrier 1) G80A, *TC2* (transcobalamin 2) C776G, *GCP2* (glutamate carboxy peptidase II) C1561T, *CBS* (cystathionine  $\beta$ -synthase) 844ins68, *TYMS* (thymidilate synthase) 3'UTR 1494del6, *BHMT* (betain-homocysteine S-methyl transferase) G742A. Subsequently, the objective of this study is to analyse the possible association between these gene variants and idiopathic spontaneous abortions and to identify the genotypes that correlate with higher spontaneous abortion incidence.

**Materials and method** – The present study was designed as an observation case-control study, including 266 Caucasian women from the Romanian population. Participants were recruited from patients presenting for consultations, investigations or genetic counseling at the Genetic Explorations II Laboratory, Clinical Emergency Hospital for Adults Cluj-Napoca, during the timeframe 2007-2009. Controls have also included healthy volunteers from the general population. The 266 women were divided in two groups. The case group was formed by 131 patients of fertile age, with a history of at least one first trimester spontaneous abortion (<14 weeks) declared idiopathic after history taking, clinical investigations, imagery, hormonal dosage, antiphospholipid antibody dosage, TORCH serology, G-band karyotyping. Chromosomal anomalies were excluded in these patients and their partners. The control group was formed by the remaining 135 women, with a history of at least one successful and uncomplicated pregnancy and with negative history of spontaneous abortion. Allele and genotype frequencies were calculated for both groups and the  $\chi^2$  test for deviation was applied to determine the consistency with the Hardy-Weinberg equilibrium. Differences in the two groups were tested for significance using Fisher's exact test and results were considered statistically significant at  $p$ -value < 0.05. Approximate risk is presented as Odds Ratios with 95% confidence intervals. Comparative analyses have been conducted using two hypothetical models: the dominant model in which the risk is attributed to both heterozygotes and homozygotes for the variant allele and the recessive model in which the risk is attributed only to the homozygous genotype for the variant allele. As in the current management of spontaneous abortions special attention is given to patients with three or more consecutive abortions (recurrent spontaneous abortions), separate analyses have been performed for this category of patients ( $n=46$ ) and the subgroup of remaining patients ( $n=86$ ) with non-recurrent abortions. The most frequent associations of genotypes in the studied population were determined using the factorial analysis which explores the correlation/association models

among the 14 gene variants inside the patients group. Logistic regression was conducted to test the association of the most frequent haplotypes with spontaneous abortions.

### **Conclusions :**

In the case of spontaneous abortions, there is a high heterogeneity concerning the age at which cytogenetic and molecular investigations are performed. The majority of patients with spontaneous abortions start their genetic investigations for the diagnosis of a possible cause after the loss of two pregnancies.

In the patients group, the G20210A mutation in the prothrombin gene is significantly correlated with this pathology, the results depending on the high frequency of the heterozygous genotype (dominant model).

An association at the limit of the significance level was observed for the *MTHFR* C677T polymorphism (recessive model) only in the case of recurrent spontaneous abortions.

An association is seen also for the *MTHFR* G1793A polymorphism when the risk is attributed to the 1793A allele containing genotypes (AA+GA versus GG).

For the *MTHFR* gene, the haplotypes resulting from the combination of *MTHFR* 1298 (AC+CC)/ *MTHFR* 1793 (GA+AA) depict a tendency to an association with spontaneous abortions in the studied population.

The *MTRR* polymorphism is significantly associated with both recurrent and non-recurrent spontaneous abortions according to the dominant hypothetical risk model.

The same *MTRR* 66A variant was more frequently identified in *GCP11* 1561T carriers. The haplotypes resulting from the combination of these gene variants are significantly associated with the investigated pathology.

The 80A allele of the *RFC1* gene is associated with a higher risk for spontaneous abortions (dominant model), relation observed for the non-recurrent abortions subgroup.

The investigation of the *CBS* 844ins68 polymorphism reveals that this variant, under the dominant model, shows a tendency towards an association with spontaneous abortions, very close to the level of statistical significance.

**Study no. 2** – The study of the Y chromosome microdeletions and some gene polymorphisms in men with idiopathic infertility and control volunteers.

**Introduction** - According to the World Health Organisation (WHO), in approximately 40% of fertility problems, the cause is of male origin and in approximately 20% of cases, the cause is combined, of both male and female origin. Therefore, the male origin is involved in more than half of reproductive failures. In a high proportion of cases, the exact cause of male infertility is not known and medical research is directed towards identifying the mechanisms generating male infertility problems. Numerical and structural cytogenetic anomalies as well as Y chromosome microdeletions of the AZF region are the most investigated causes of male infertility and subfertility. The link between sterility or male subfertility and folates is not new. Nevertheless, the studies investigating the polymorphisms of genes coding for agents of the folate, homocysteine and B12 metabolism are quite few. The results are also far from reaching one unanimous conclusion. Moreover, some of the gene variants have not yet been investigated in association with male infertility. In the Romanian population there are almost no studies in the genetics of male infertility, except some sporadic Yq microdeletions and cytogenetic studies.

**Objectives** – In this study we aimed at analysing the Y chromosome microdeletions in the a, b and c AZF regions in patients with idiopathic non-obstructive azoospermia and severe

oligozoospermia. The analysis was performed twice, using a first set of 6 STS markers and second set of 18 STS markers, which allowed the comparison of the two methods. Subsequently, we performed the genotyping and distribution analysis of 12 gene polymorphisms: *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase) C677T, A1298C and G1793A, *MTHFD1* (methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 1) G1958A, *MTR (MS)* (methionine synthase) A2756G, *MTRR (MSR)* (methionine synthase reductase) G66A, *RFC1* (reduced folate carrier 1) G80A, *TC2* (transcobalamin 2) C776G, *GCPH* (glutamate carboxy peptidase II) C1561T, *CBS* (cystathionine  $\beta$ -synthase) 844ins68, *TYMS* (thymidilate synthase) 3'UTR 1494del6, *BHMT* (betain-homocysteine S-methyl transferase) G742A. Furthermore, we analyzed the possible associations of the investigated genotypes with idiopathic male infertility.

**Materials and method** – In the present study 134 Caucasian men from the Romanian population were enrolled: 67 patients with non-obstructive azoospermia or subfertility (severe oligozoospermia) and 67 fertile males. Participants were recruited from patients presenting for consultations, investigations or genetic counseling at the Genetic Explorations II Laboratory, Clinical Emergency Hospital for Adults Cluj Napoca, during the timeframe 2007-2009. Controls have also included healthy volunteers from the general population responding to the invitations of participation to this study. Data concerning personal or familial pathological history were obtained from all patients. The varicocele, urogenital infections, endocrine pathologies, cryptorchidism and other morphological anomalies were excluded through specific examinations. Chromosomal anomalies and Y chromosome microdeletions were tested and excluded in 66 of the patients through cytological and molecular analyses. Yq chromosome microdeletions were analyzed through molecular genetics techniques, such as Simplex PCR and Multiplex PCR based on the amplification of 6 and 18 STS markers, respectively. One severe oligozoospermia patient was diagnosed with Y chromosome microdeletions and was excluded from the case-control study investigating the genetic polymorphisms. The participants to the association study were divided in 2 groups. The patients group was formed by 66 men of fertile age, diagnosed with idiopathic infertility after clinical and paraclinical investigations (54 with non-obstructive azoospermia and 12 with severe oligozoospermia). The control group was made of 67 men without fertility problems, having at least one healthy child. The 12 gene polymorphisms were determined using molecular genetics techniques. Allele and genotype frequencies were calculated for both groups and the  $\chi^2$  test for deviation was applied to determine the consistency with the Hardy-Weinberg equilibrium. Differences in the two groups were tested for significance using Fisher's exact test. The factorial analysis was used to determine which were the most frequent associations of genotypes inside the study group. Logistic regression was conducted to test the association of the most frequent haplotypes with male infertility. Approximate risk is presented as Odds Ratios with 95% confidence intervals. Results were considered statistically significant at  $p$ -value  $< 0.05$ .

### **Conclusions:**

The frequency of the AZF Yq microdeletions in the studied population is at the lower limit of the frequency interval described in literature, which might imply a possible problem in the selection of cases currently sent for investigation.

The analysis of the Yq microdeletions through the amplification of the minimal set accepted (6 STS markers) showed consistent results with those obtained using 18 STS

markers. This suggests that the minimal set is sufficient for the correct diagnosis of these anomalies.

The *BHMT* G742A polymorphism shows a significant association with male infertility and this is also observed by analyzing the subgroup of azoospermia patients.

The analysis of the *RFC1* 80GA and 80AA show a tendency to a negative association with male infertility, and the homozygous genotype for the common 80G allele is strongly associated with a higher risk for this pathology.

For the *MTHFD1* gene, the results show an association for the 1958AA genotype at the limit of the statistical significance level.

A single combination of the investigated gene variants, namely *MTHFD1* 1958 (GA+AA)/*BHMT* 742 (GA+AA), could be considered relevant in this scenario for male infertility. However, these haplotypes need further analysis to reveal their possible involvement in the risk for male infertility.

In the process of putting together this thesis, 180 references were cited from the literature.

## **Curriculum vitae**

### **Europass**

#### **Personal informations**

First name / Surname	Radu Anghel Popp
Address	Cluj-Napoca, str. Hateg, nr. 4, ap.28
E-mail	radupopp2001@yahoo.com
Nationality	Romanian
Date of birth	6 June 1971
Gender	Male

#### **Work experience**

Dates	10/2007-onwards
Occupation or position held	Lecturer
Main activities and responsibilities	Teaching & molecular genetics diagnosis and research in Mendelian disorders and polygenic traits - Genetics Laboratory, Department of Medical Genetics
Name and address of employer	“Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy, 8, Victor Babes St, 400012, Cluj-Napoca, Romania
Type of business or sector	Teaching, Health, Scientific research
Dates	02/2007-onwards
Occupation or position held	Biologist
Main activities and responsibilities	Molecular genetic diagnosis

Name and address of employer Genetics Laboratory, First Paediatrics Clinic, Children  
Emergency Hospital, 68 Motilor St., Cluj-Napoca,  
Romania

Type of business or sector Health

Dates 10/2002-10/2007

Occupation or position held Assistant

Main activities and responsibilities Teaching & cytogenetic & molecular genetics diagnosis  
and research - Genetics Laboratory, Department of  
Medical Genetics, 2<sup>nd</sup> Genetic Investigations  
Laboratory, Cluj-Napoca

Name and address of employer ““Iuliu Hatieganu” University of Medicine and  
Pharmacy, 8, Victor Babes St, 400012, Cluj-Napoca,  
Romania

Type of business or sector Teaching, Health, scientific research

Dates 10/1999-10/2002

Occupation or position held Junior assistant

Main activities and responsibilities Teaching & cytogenetic & molecular genetics diagnosis  
and research - Genetics Laboratory

Name and address of employer ““Iuliu Hatieganu” University of Medicine and  
Pharmacy

Type of business or sector Teaching, health, scientific research

Dates 09/1996-11/1997

**Occupation or position held** Biologist

Main activities and responsibilities Research, biochemistry, cell culture

Name and address of employer “Ion Chiricuta” Oncological Institute, Ion Creanga St.,  
Cluj-Napoca, Romania

Type of business or sector Health, research

### **Education and training**

Dates 1991-1996

Title of qualification awarded Biologist

Principal subjects/occupational skills covered Medical laboratory

Name and type of organisation Faculty of Biology, “Babes-Bolyai” University, Cluj-  
providing education and training Napoca, Romania

Dates 1996-2002  
Title of qualification awarded MD  
Principal subjects/occupational skills covered Medical School  
Name and type of organisation providing education and training Faculty of Medicine, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, Romania.

Dates 11/2003-onwards  
Title of qualification awarded/ PhD  
Principal subjects/occupational skills covered Human reproductive failure  
Name, type of organisation providing education and training "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, Romania

Dates 02/2004-02/2010  
Title of qualification awarded Fellow in Medical Genetics  
Principal subjects/occupational skills covered Medical Genetics  
Name and type of organisation providing education and training "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, Romania.  
Cluj Emergency County Hospital, Cluj-Napoca, Romania

Dates 10/2005-01/2006  
Title of qualification awarded Bursary Recipient  
Principal subjects/occupational skills covered Training in molecular and forensic DNA analysis  
Name and type of organisation providing education and training Pont Neuf Association, Paris, France, Laboratoire de Biochimie, Toxicologie et Genetique, Hopital Raymond Poincaree, Garche, France

Dates 18-20 sept 2006  
Title of qualification awarded Cours: "Impact of genetics in Human Pathology"  
Principal subjects/occupational skills covered  
Name and type of organisation providing education and training "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,

**Scientific and professional societies** European Society of Human Genetics (ESHG)  
Romanian Association of Laboratory Medicine (ARML)  
National Society for Cell Biology (SNBC)  
Romanian Society of Medical Genetics (SRGM)



Language	Romanian									
Foreign languages										
Self-assessment	<b>Understanding</b>				<b>Speaking</b>				<b>Writing</b>	
European level (*)	Listening		Reading		Spoken interaction		Spoken production			
<b>French</b>	B2	Independent user	B2	Independent user	B2	Independent user	B2	Independent user	B2	Independent user
<b>English</b>	B1	Independent user	B1	Independent user	A2	Basic user	A2	Basic user	A1	Basic user

- Organisational skills and competences
- Organisation team member:**
- Annual Conference of Romanian Society of Medical Genetics, Cheile Grădiștei, Brasov, 25-27 may, 2007
  - The second National Congress of the Romanian Society of Medical Genetics with international participation Cluj-Napoca, 20-23 sep, 2006
- Organizer of two workshops:**
- “JAK2 p.V617F mutation in myeloproliferative neoplasms: one mutation, two detection techniques”, during 10<sup>th</sup> International Congress for Medical Students and Young Doctors Medicalis, Cluj-Napoca, 14-17 may 2009
- “Genetic aspects of infertility”, during 9<sup>th</sup> International Congress for Medical Students and Young Doctors Medicalis, Cluj-Napoca, 8-11 may 2008

- Technical skills and competences
- Cytogenetic and molecular techniques:
- G banding karyotype
  - nucleic acids isolation and purification
  - PCR based techniques: PCR simplex and multiplex, PCR-RFLP, ARMS-PCR, tetra-primer PCR, DNA sequencing
  - nucleic acids electrophoresis
  - study, protocols for over 100 different mutations and polymorphisms, for different forms of monogenic or polygenic/multifactorial traits - Genetic Laboratory of Medical Genetics Discipline UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca and Molecular Genetics Laboratory of Genetic Compartment, First Pediatric Clinic, Cluj-Napoca, Romania.

## SCIENTIFIC ACTIVITY

### Scientific papers published:

#### ISI

1. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Coadă CA, Urian LG, Militaru MS, Bănescu C, Dima D, Farcas MF, Crisan TO, Petrov L, Gug C, Pop IV. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. *Leuk Lymph.*2012; in-press.
2. Kacso IM, Trifa AP, Popp RA, Kacso G. Association of 276G>T adiponectin gene polymorphism to plasma adiponectin and albuminuria in type 2 diabetic patients. *Int Urol Nephrol.* 2012 Jan 6. [Epub ahead of print].
3. Crișan TO, Farcaș MF, Trifa AP, Plantinga TS, Militaru MS, Pop IV, Netea MG, Popp RA. TLR1 polymorphisms in Europeans and spontaneous pregnancy loss. *Gene.* 2012; 494(1):109-11.
4. Crișan TO, Trifa A, Farcaș M, Militaru M, Netea M, Pop I, Popp R. The MTHFD1 c.1958 G>A polymorphism and recurrent spontaneous abortions. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24(1):189-92.
5. Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Militaru CF, Bocsan CI, Farcas MF, Pop IV. Screening for *CYP2C19*\*2, \*3 and \*4 gene variants in a Romanian population study group. *Farmacia.*2010; 58(6):806-17.
6. Trifa AP, Crișan S, Popp RA, Cucuianu A, Buzoianu AD. JAK2 46/1 haplotype seems not to be associated with lower limb deep venous thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Oct 15;45(3):199-200.
7. Militaru MS, Popp RA, Trifa AP. Homozygous G320V mutation in the *HJV* gene causing juvenile hereditary haemochromatosis type A. A case report. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010 Jun;19(2):191-3.
8. Trifa AP, Cucuianu A, Petrov L, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 2010 Oct;89(10):979-83.
9. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crisan TO, Popp RA. Association of methionine synthase A2756G SNP, methionine synthase reductase G66A and male infertility. *Rom Rev Med Lab.* 2010;17(4):17-25.
10. Lazăr C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, Figan I, Grigorescu-Sido P. Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the *GJB2* gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 ;74(4):351-5.
11. Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA. Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the *JAK2* rs10974944 SNP, which might predispose to the acquisition of somatic mutation *JAK2*(V617F). *Acta Haematol.* 2010;123(2):84-7.
12. Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru C, Bocsan IC, Pop IV. Analysis of the *CYP2C19*\*2 and \*3 gene variants in a Romanian population. Proceedings of the 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics – EACPT Edinburgh, 2009:47-55.
13. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Patiu M, Pop IV. JAK2 p.V617F mutation-tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in MPN. *Rom Rev Med Lab.* 2009; 14(1):25-30.
14. Dima D, Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA, Patiu M, Petrov L. Monitoring T315I mutation in chronic myeloid leukemia by amplification refractory mutation system PCR. *Rom Rev Med Lab.* 2008;13(4):17-20.
15. Hotoleanu C, Popp R, Trifa AP, Nedelcu L, Dumitrascu DL. Genetic determination of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2008;14(43):6636-40.

16. Konig EA, Koves I, Rasinariu A, Popp AR, Kusser WC, Soyonki K, Koves A, Glickman BW, Jenei A, Marcsek ZL. Alterations of *k-ras* and *p53* mutations in colorectal cancer patients in Central Europe, *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2001; 62(5):333 – 47.

### **BDI indexed**

1. Popp RA, Farcas MF, Trifa AP, Militaru MS, Crisan TO, Pop IV, The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (*MTHFD1*) gene G1958A polymorphism and idiopathic male infertility in a romanian population group, *Clujul Medical*. 2012; 85(1): 54-8.
2. Popp RA, Crisan TO, Trifa AP, Militaru MS, Rotar IC, Farcas MF, Pop IV, The C677T Variant in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Spontaneous Abortion in a Romanian Population Group, *Notulae Scientia Biologicae*. 2012; 4 (1): *in press*.
3. Popp R, Crisan T, Rotar I, Farcas M, Trifa A, Militaru M, Pop I. Cystathionine  $\beta$ -synthase 844ins68 Genetic Polymorphism in Spontaneous Abortion Susceptibility. *Applied Medical Informatics*. 2011; 29(4): 34-40.
4. Popp RA, Trifa AP, Rotar I, Farcas MF, Crişan TO, Pop IV, The *MTHFR* A1298C and G1793 polymorphisms in a patients group with idiopathic spontaneous abortions, *Obstetrica și Ginecologia*. 2011; LIX (3): 193-9.
5. Catana A, Popp RA, Pop M, Trifa AP, Porojan M, Petrisor F, Farcas M, Pop IV. Genetic Polymorphism of Glutathione S Transferase and Lung Cancer Risk in Northern Romania. *Clujul Medical*. 2011; 84(4): 520-23.
6. Buzoianu A, Bocsan IC, Maier C, Trifa AP, Popp RA, Perju Dumbrava L, Sabin O, Militaru FC, Brusturean E, Major Z, Popescu C. Genotype-phenotype correlations between the alleles of the *MDR1* C3435T polymorphism and pharmacokinetic parameters in Romanian epileptic patients. *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology*, 2011;1:40-4.
7. Catana A, Popp R, Pop M, Porojan M, Trifa A, Petrisor F, Hancu BD, Pop IV. Alpha1 Antitrypsin Deficiency and Lung Cancer Risk, *Clujul Medical*. 2011; 84(suppl 1): 20-3.
8. Trifa AP, Patiu M, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Pop IV, Popp RA, Systemic Mastocytosis Associated with the *C-Kit* D816v Mutation—Importance of Molecular Diagnosis and Therapeutic Implications. *Case Report. Timisoara Med Journal*, 2010; 2-3: 241-43.
9. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crişan T, Pop IV, Popp RA. Methylenetetrahydro folate reductase G1793A polymorphism and male infertility in a Romanian population group. *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții* 2010;20( 1):31-5.
10. Rotar I, Bolboacă S, 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.
11. Hoţoleanu C, Popp R, Dumitraşcu DL. Genetic polymorphism of SERT receptors. 2010; 83 (suppl 2): 31-32.
12. Farcas MF, Trifa AP, Popp RA, Crisan TO, Militaru MS, Pop IV, Lazar C. Screening for 35delG and W24X in the *GJB2* gene in a Romanian population group. *Annals of RSBC*.2010;XV(1):304-10.
13. Bocsan IC, Major ZZs, Maier C, Pop R, Iuga C, Trifa A, Militaru Florentina FC, Buzoianu AD. Study of the phenotypic variation expression in the metabolizing status of romanian epileptic patients. *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology*, 2010;3:224-28.
14. Popp RA, Trifa AP, Militaru M, Crisan TO, Petrisor F, Farcas MF, Csernik FA, Pop IV, Methioninesynthase reductase (*MTRR*) gene 66G>A polymorphism as a possible risk factor for recurrent spontaneous abortion, *Annals of RSCB*. 2009; 14(1): 28-32.

15. Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Farcas MF, Crisan T, Petrisor F, Pop IV. Prevalence of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A mutations among a group of women with recurrent spontaneous abortions. *Annals of RSCB*. 2009;14(2):42-6.
16. Coldea C, Popp RA, Trifa AP, Zimmermann A, Al-Khzouz C, Craciun A, Grigorescu – Sido P. The Apolipoprotein E polymorphism in type I Gaucher disease patients. *Clujul Medical*. 2009;82(4):586-90.
17. Farcas MF, Trifa AP, Militaru M, Csernik FA, Crisan T, Pop IV, Popp RA. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism and male infertility in a Romanian population group. *Maedica - A Journal of Clinical Medicine*. 2009;4(4):294-99.
18. Stamatian F, Caracostea G, Mureșan D, Bartok I, Militaru M, Procopciuc L, Popp R, Trifa A. The evaluation of inherited thrombophilic conditions in patients with bleeding in the first trimester of pregnancy. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. 2009;1(1):9-17.
19. Popp RA, Badea M, Hedesiu M, Trifa AP, Serbanescu A, Farcas MF, Crisan TO, Tosa F, Petrisor F, Badea AF, Militaru MS. The -799C/T polymorphism of the matrixmetaloproteinase 8 (*MMP8*) gene in periodontal disease – a case-control study. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(2):67-72.
20. Farcas MF, Antonesei M, Trifa AP, Popp RA, Crisan TO, Petrisor F, Pop IV. Molecular diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia in a Romanian population group. *Annals of RSCB*. 2009;XIV (2): 28-32.
21. Crisan TO, Trifa AP, Farcas MF, Csernik FA, Petrisor F, Militaru M, Pop IV, Popp RA. The C936T polymorphism of the *VEGF* gene in Romanians–distribution analysis in healthy volunteers and in recurrent spontaneous abortion patients. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(1);91-97.
22. Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Crisan TO, Farcas MF, Csernik FA, Petrisor F, Pop IV. Buzoianu AD. The C and T alleles of the *MDRI* C3435T polymorphism share similar frequencies in the Romanian population. *Annals of RSCB*. 2009;XIV(1):68-73.
23. Farcas MF, Csernik FA, Popp RA, Trifa AP, Crisan T, Petrisor F, Pop IV, Militaru M. The Interleukin 4 VNTR polymorphism frequency in a Romanian population group. *Annals of RSCB*. 2009; XIV(1):97-102.
24. Trifa AP, Popp RA, Mariela M, Ioana P, Tania C, Pop IV. The *HFE* gene C282Y and H63D mutations in a group from roumanian population. *Analele Societății de Biologie Celulara*. 2008;XII:218-22.
25. Popp RA, Trifa AP, Militaru M, Crisan T, Patrascoiu I, Pop IV, The study of *TC2* C776G and *GCP11* C1561T polymorphisms in couples with recurrents spontaneous abortions, *Analele SRBC*. 2007; 12(1): 227-32.
26. Crisan T, Popp RA, Trifa AP Militaru M, Patrascoiu I, Pop IV, The Methionine shyntase A2756G gene polymorphism and the spontaneous abortion, *Analele Societății Naționale de Biologie Celulară*. 12(1); 2007: 223-6.
27. Hotoleanu C, Popp R, Trifa A, Andercou A. Profound thromboflebitis in a patient double heterozygous for factor V and Leiden and methilentetrahydrofolate reductase A1298C variants. *Clujul Medical*. 2007;4:916-21.
28. Popp RA, Militaru M, Trifa AP, Pop IV. The clinical, cytogenetic and molecular analysis in a male sterility case with 46,XX chromosomal formula-de la Chapelle SRY positive syndrome. *Analele Societății de Biologie Celulară*. 2006;11(1):325-29.

## Experience in scientific research projects

### International

1. COST Action BM0902: Network of experts in diagnosis of mieloproliferative disorders (MPD), PC7 project, coordinator Dr. Sylvie Hermouet, Nantes, France, 2009-2013 - Substitute Member for Romania in the Management Project Committee.

### National

1. New methods and techniques for early detection of chromosomal abnormalities in fetus-Orizont National Program C-D 2000; U.M.F. Cluj-Napoca. Project manager – Prof. Dr. F. Stamatian, period: 2002-2003 - research team member.

2. *ABCG5/G8*, *ABCB4* and *ABCB11* genetic polymorphisms in patients with cholesterol gallstone and in general population, Type-A CNCSIS Grant. Project manager – Prof. Dr. Monica Acalovsci, period: 2005-2007 - research team member.

3. Bioinformatics of gene sequences involved in prokaryotes cell division, Contract Cex-05-D11-52/07.01.2005, consortium with U.B.B. Cluj-Napoca (P-3), I.N.T.I.M. Cluj-Napoca (P-4). Grant manager – Prof. Dr. Octavian Popescu, period: 2005-2008 - research team member.

4. Development of imagistic and quantification standards in physiological and pathological brain atrophy, correlated with clinical and morpho-genetic data. Social and professional recovery implications, RADINDEX. Project CeEX 132/2006. Project manager – Prof. Dr. Sfrangeu Silviu Andrei, period: 2006-2009 - research team member.

5. Molecular diagnosis of Epidermolysis bullosa. Modern techniques for research, diagnosis, treatment and prevention of Epidermolysis bullosa. Starting a national register of genodermatoses project CeEX 126/2006. Project manager – Prof. Dr. Rodica Cosgarea, period: 2006-2009 - research team member.

6. Involvement of genetic polymorphisms in periodontitis development and evolution. The role of imagistic techniques in detecting, assessing and monitoring of periodontitis, Grant PNCDI II- Ideas, Project manager – Prof. Dr. Badea Mîndra Eugenia, period: 2007-2010 - research team member.

7. The role of adiponectin and *ADIPOQ* gene polymorphism in the progression of nephropathy in type 2 diabetes and associated cardiovascular pathology. Clinical and experimental study, PNCDI II- Ideas, Project manager – Prof. dr. Nicolae Hancu , period: 2008-2011 - research team member.

8. Atherosclerosis and osteoporosis—from clinical observation to genetic study. Evaluation of common risk factors, vitamin K and genetic contribution in the etiopathogenesis of both diseases, ATEROST, grant PNCDI II partnership, Project manager – Conf. Dr, Daniela Fodor, period: 2008-2011 - research team member.

9. Pharmacogenomics impact of gene polymorphisms *VKORC1* and *CYP2C9* regarding efficiency safety, and costs in oral anticoagulant treatment. TROMBOGEN, grant PNCDI II partnership, Project manager – Prof. Dr. Anca Buzoianu, period: 2008-2011 - research team member.

10. Pharmacogenomics impact of gene polymorphisms *CYP2C9*, *CYP2C19* and *MDR1* in idiopathic epilepsy and the therapeutic efficacy of antiepileptic drugs, FARMACYP, grant PNCDI II partnership, Project manager – Prof. Dr. Anca Buzoianu, period: 2007-2011 - research team member.

**11.** Genetic causes of reproductive disorders in the population from Romania, using cytogenetic and molecular methods. Improvement of genetic counseling and prevention. Type A CNCSIS project, Project manager – Prof. Dr. Ioan Victor Pop, period: 2007-2009 - research team member.