

PROFILUL GENETIC DE RISC LA PACIENTELE CU CANCER MAMAR

GENETIC RISK PROFILE IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

*Alfred Redalf Alain Gheorghiu^{1,2}, Aurel Mironescu¹, Călin Pavel Cobelschi^{1,2},
Adrian Maier², Iulian Andrei Toader^{1,2}, Mircea Hogeă¹*

¹Universitatea Transilvania din Braşov

²Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţă Braşov

Autor corespondent: Mircea Hogeă, email mircea.hogeă@unitbv.ro

Abstract:

In recent years, remarkable progress has been made in the understanding, diagnosis and treatment of patients with hereditary breast cancer, studies demonstrating the usefulness of genetic testing in these patients. Between 2009 and 2014, 255 patients with malignant breast tumors were hospitalized and operated in our clinic; 50 patients were selected for our genetic study. In the 50 cases tested with the BRCA1 / 2 panels, 42 cases (84%) with mutations on the two genes were detected and 8 cases (16%) were negative in BRCA1 / 2 panel testing. The purpose of this genetic study is to show that genetic factors that are involved in breast cancer have an important role in screening the disease, avoiding the diagnostic in an advanced stage of illness.

Rezumat

În ultimii ani, s-au înregistrat progrese remarcabile în înţelegerea, diagnosticul şi tratamentul pacienţilor cu cancer de sân ereditar, demonstrându-se astfel, utilitatea testării genetice la aceşti pacienţi. Între 2009 şi 2014, 255 de pacienţi cu tumori maligne ale sânelui, au fost spitalizaţi şi operaţi în Clinica Chirurgie 2 a Spitalului Clinic Judeţean de Urgenţă Braşov, dintre aceştia, 50 de pacienţi au fost selectaţi pentru studiul genetic. În cele 50 de cazuri testate cu panelul pentru BRCA1 / 2, au fost detectate 42 de cazuri (84%) cu mutaţii pe cele două gene şi 8 cazuri (16%) au fost negative la testarea BRCA1 / 2. Scopul acestui studiu genetic este de a arăta că factorii genetici, care sunt implicaţi în cancerul de sân, au un rol important în screeningul bolii, evitând diagnosticul într-un stadiu avansat de boală.

Key-words: *mutations on the genes BRCA 1 and BRCA2, breast cancer.*

Cuvinte cheie: *mutaţii pe genele BRCA 1 şi BRCA2, cancer de sân*

Introducere

În ultimii ani s-a realizat un progres remarcabil în înţelegerea, diagnosticarea şi tratamentul pacienţilor cu cancer mamar ereditar, studiile demonstrând utilitatea testărilor genetice la aceşti pacienţi (Chiru R., Bujor M., 2012)

Clinic şi genetic cancerul de sân este o afecţiune heterogenă, iar studiile retrospective au arătat că 80% din cazurile de cancer de sân sunt sporadice (apărând la persoane cu istoric familial negativ pentru această afecţiune), iar 20% din cazurile de cancer de sân apar în condiţiile existenţei unei predispoziţii familiale (adică fie în contextul unor mutaţii patogene preexistente familial, fie în contextul acţiunii unor alţi factori cancerigeni comuni). (Chiru R., Bujor M., 2012; Levy-Lehan E., 2007)

În urma studiilor efectuate, s-a observat că aproximativ 40 – 45% din cazurile de cancer de sân ereditar, se datorează existenţei unor mutaţii puternic penetrante, cu transmitere autosomal dominantă, apărute la nivelul liniilor germinale BRCA1 şi BRCA2 repartizate astfel:

- la nivelul genei BRCA1, pe braţul lung al cromozomului 17, ce conţine 24 exoni, ce incryptează o proteină care este formată din 1863 aminoacizi. (Chiru si Bujor, 2012)
- la nivelul genei BRCA2, pe braţul lung al cromozomului 13, ce conţine 27 exoni, ce incryptează o proteină care este formată din 3418 aminoacizi. (Chiru R., Bujor M., 2012)

Aceste mutaţii apărute la nivelul liniilor germinale ale genelor BRCA1/2, vor determina pierderea funcţionalităţii normale a acestor

gene, cu apariția instabilității genomice, rezultând astfel o mare probabilitate de transformare malignă la acest nivel. (Chiru R., Bujor M., 2012)

Aceste mutații pot determina pe lângă cancerul de sân și alte tipuri de cancere, care pot apărea singure, sau asociate cu cancerul de sân astfel:

- mutațiile pe gena BRCA1 pot determina la femei cancer de ovar sau de trompă uterină, iar la bărbați: cancer de prostată, testicular sau pancreatic.
- mutațiile pe gena BRCA2 pot determina cancer de ovar, de prostată, pancreatic și melanom malign. (Ali R. et al, 2011; Chiru R., Bujor M., 2012)

Se estimează astfel, că riscul de apariție a cancerului de sân, este mai mare la populațiile care prezintă mutații la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2. (Ali R. et al., 2011; Amir E. et al., 2010, Antoniu A. et al., 2003; Chiru R., Bujor M., 2012; Lindor N.M. et al., 2008).

Au fost descoperite recent și alte tipuri de mutații genetice, apărute la nivelul altor gene, care par a fi și ele implicate în dezvoltarea cancerului de sân, reprezentate de mutații pe genele TP53, STK11, PTEN/MMAC1, arătând astfel că avem de-a face cu o afecțiune, heterogenă, unde există încă multe necunoscute. (Ali R. et al, 2011; Chiru R., Bujor M., 2012; Lindor N.M. et al., 2008)

Scopul prezentării factorilor genetici, ce sunt implicați în apariția cancerului de sân, este de a sublinia faptul că, această boală trebuie investigată corect și minuțios, trebuie să se facă un screening corect și la timp, pentru a se putea evita situațiile în care, pacientul se prezintă la medicul specialist, într-un stadiu avansat de boală, în care terapiile de care dispunem, pot fi ineficiente. Aceste metode de screening trebuie efectuate începând de la medicul de familie, care trebuie să se adreseze atât populației generale, dar mai ales familiilor în care există membrii cu mutații ale genelor pentru cancerul de sân (BRCA1 și BRCA2), pentru a se putea depista din timp indivizii cu factor de risc. (Ali R. et al, 2011; Amir E. et al., 2010; Antoniu A. et al., 2003; Chiru R., Bujor M., 2012; Lindor N.M. et al., 2008).

Cercetările recente, au adus la iveală noi metode de studiere a cancerului, prin

identificarea celulelor stem canceroase, care pot transmite către moștenitori mutații genetice, ajungându-se astfel la identificarea subtipurilor tumorale ale sânului, reprezentate de:

- subtipul luminal A, cu ER+, PR+, HER2-
 - subtipul luminal B, cu ER+, PR+, HER2+
 - tipul bazal, cu ER-, PR-, HER2-
 - subtipul HER2+/ER-, cu ER-, PR-, HER2+.
- (Ali R. et al, 2011; Chiru R., Bujor M., 2012)

În cazurile în care, în urma screeningului destinat populației generale, o persoană este depistată cu cancer de sân, trebuie luat în discuție, dacă acest cancer a apărut ca urmare a existenței unei predispoziții genetice /ereditară. În acest caz se apelează la istoricul familial al pacientului, care poate sugera o patologie tumorală ereditară sau nu. În ambele situații, pacientul trebuie să beneficieze de consiliere genetică, explicându-i-se pacientului natura afecțiunii, modul de transmitere ereditar al bolii la descendenți, riscul apariției bolii și la alți membrii ai familiei. De asemenea, în aceste condiții, se discută de comun acord cu pacientul, dacă este necesară testarea genetică a pacientului și a membrilor familiei, pentru depistarea mutațiilor genetice pentru cancerul de sân. (Ali R. et al, 2011; Amir E. et al., 2010; Chiru R., Bujor M., 2012; Lindor N.M. et al., 2008)

În această situație am luat în considerare efectuarea de testări genetice la paciente, prin panelul pentru genele BRCA1/BRCA2 și panelul multigenic, pentru alte 25 de gene responsabile de apariția cancerului de sân: ATM, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, FAM175A, MEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2. (Cavanagh H., Rogers KM, 2015; Daly MB et al., 2016; Easton DF et al., 2015, Norum J. et al., 2018; Valencia OM et al., 2017)

2. Material și metoda:

În perioada 2009 – 2014 în Secția Chirurgie II a Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov, au fost internate și operate 375 paciente cu tumori de sân; dintre acestea, 255 de paciente au avut tumori maligne de sân în diferite stadii, iar pentru studiul genetic au fost selecționate 50 de paciente, care ulterior au fost operate. De asemenea s-a folosit și un chestionar, care a fost aplicat tuturor celor 50 de

paciente ce au fost selecționate pentru studiul genetic. Acest chestionar, se referă la existența, în familia pacientelor cu cancer de sân, a antecedentelor familiare de cancer de sân.

Aceste paciente au fost considerate eligibile pentru studiul nostru în baza unor criterii recomandate de NCCN-2016 (National Comprehensive Cancer Network), de screening pentru cancerul de sân. (Daly MB et al., 2016),

Criteriile recomandate sunt reprezentate de:

1. Pacient diagnosticat cu carcinom mamar care îndeplinește oricare din următoarele criterii:
 - o mutație implicată în cancerul de sân, prezentă în familie
 - cancerul de sân ce a debutat precoce
 - două carcinoame de sân la același individ
 - carcinom de sân diagnosticat la orice vârstă dacă:
 - are o rudă apropiată diagnosticată cu cancer de sân sub 50 de ani,
 - are o rudă apropiată diagnosticată cu cancer ovarian la orice vârstă,
 - una sau mai multe rude apropiate au fost diagnosticate cu cancer pancreatic la orice vârstă,
 - provine dintr-o populație cu risc crescut. (Daly MB et al., 2016),
2. Carcinom de sân la bărbați. (Daly MB et al., 2016),
3. Istoric familial sau personal de cancer care include trei sau mai multe din următoarele:
 - debut precoce al cancerului de sân,
 - multiple cancere primitive la același individ: sân, pancreas, prostată, melanom, sarcom, tumori cerebrale, leucemie, endometru, colon, tiroidă,
 - macrocefalie, polipi intestinali, hamartoame. (Daly MB et al., 2016),
4. Antecedente personale de cancer ovarian. (Daly MB et al., 2016),
5. Un alt criteriu destul de important, care nu este inclus în ghidurile NCCN 2016, a fost și cel financiar.

S-a recoltat sânge venos periferic 5 ml, de la subiecții selecționați, în vacutainer ce conține EDTA ca anticoagulant, iar probele au fost trimise și analizate la Laboratoarele Gral Medical din Sibiu, pentru toate cele 50 de cazuri, selecționate pe baza criteriilor de mai sus.

Testul BRCA a inclus testarea mutațiilor pe genele BRCA1/2. ADN-ul genomic, care s-a

extras din proba studiată, a fost supus PCR, prin folosirea kitului BRD MASTER Dx CE IVD și utilizat apoi, pentru determinarea mutațiilor pe genele BRCA1/2, folosindu-se platforma de secvenție MiSeq. (Antoniou A. et al., 2003; Cavanagh H, Rogers KM, 2015; Kuchenbaecker KB et al., 2017; Hall MJ et al., 2009).

Testarea panoului multigenic, include testarea a 25 de gene, care sunt incriminate în apariția cancerului de sân; recoltarea de probe s-a făcut de asemenea din sânge venos periferic 5 ml, de la subiecții selecționați, în vacutainer ce conține EDTA ca anticoagulant; stabilitate probei – 7 zile la 2-8°C, timp în care a fost trimis spre analiză. ADN-ul genomic din proba analizată, este îmbogățit pentru cele 25 de oncogene, folosind tehnologia Illumina. Criteriile sunt aliniate la secvența de referință (GRCh37), iar modificările de secvență sunt identificate și interpretate din punct de vedere clinic. Rearanjările genomice mari, sunt interpretate folosind tehnica MLPA. (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) (Antoniou A. et al., 2003; Cavanagh H., Rogers KM, 2015, Easton DF et al., 2015; Li Y. et al., 2017; Norum J. et al., 2018, Valencia OM et al., 2017).

3. Rezultate:

Chestionarul reprezentat de antecedentele familiale de cancer de sân pe lotul de 50 de paciente supuse studiului genetic a avut următoarele rezultate:

- din cele 50 de cazuri testate cu panelul BRCA1/2, au fost depistate 42 de cazuri (adică 84%) cu mutații pe cele două gene, iar 8 cazuri, (adică 16%) au fost negative la testarea cu panelul BRCA1/2.
- cele 8 cazuri depistate negativ, la testarea cu panelul BRCA1/2, au fost supuse testării cu panelul multigenic, întrucât toate cazurile (cele 50 testate genetic) au fost diagnosticate în prealabil, cu cancer mamar, prin puncție biopsie și examen histopatologic.

La cele 42 de cazuri testate pozitiv, pentru BRCA1/2, au fost descoperite următoarele mutații:

- 38 de cazuri (adică 90%) cu mutații pe gena BRCA1,
- 4 cazuri (adică 10%) cu mutații pe gena BRCA2.

La cele 38 de cazuri cu mutații pe gena BRCA1 avem următoarele:

- în 28 de cazuri (adică 74%) avem mutație de tip c.3067.C>T,
- în 7 cazuri (adică 18%) avem mutație tip c.5266dupC,
- în 3 cazuri (adică 8%) avem mutație tip c.4035delA.

La cele 4 cazuri cu mutații pe gena BRCA2:

- în 3 cazuri (adică 75%) avem mutație tip c.9371.A>T,
- într-un caz (adică 25%) avem mutație tip c.8755-1G>A/.

În cele 8 cazuri testate negativ, pentru BRCA1/2 și supuse testării cu panelul multigenic, au fost descoperite următoarele mutații:

- în 3 cazuri (adică 38%) avem mutații la nivelul genei CHEK2,
- în 2 cazuri (adică 25%) avem mutații la nivelul genei PALB2,
- în 2 cazuri (adică 25%) avem mutații de tip VUS (mutații cu semnificație necunoscută) la nivelul genei STK11,
- într-un caz (adică 12%) avem mutație pe gena TP53.

În ceea ce privește mutațiile pe gena BRCA1, cel mai frecvent tip de mutație a fost c.3067.C>T, acest tip de mutație fiind asociat cu cancerul mamar triplu negativ (ER-, PR-, HER2-), ce corespunde tipului bazal de cancer mamar, întâlnit în 28 de cazuri supuse testării, mutația c.5266dupC a fost întâlnită în 7 cazuri și a fost asociată cu subtipul luminal A de cancer de mamar (ER+,PR+, HER2-, 4 cazuri și cu tipul bazal de cancer mamar ER-,PR-,HER2-, 3 cazuri), iar mutația c.4035delA a fost asociată cu un cancer mamar HER2+, fiind reprezentată de 2 cazuri încadrate în subtipul luminal B de cancer mamar (ER+,PR+, HER2+) și 1 caz încadrat în subtipul de cancer mamar (ER-, PR-, HER2+).

În cazul acestor mutații genetice descoperite la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2, s-a asociat frecvent cancer mamar moderat diferențiat G2.

Pentru cele 3 cazuri cu mutații la nivelul genei CHEK2, s-a observat că a fost vorba de un cancer mamar bilateral, moderat diferențiat G2, în cele 2 cazuri cu mutații pe gena PALB2, a fost vorba de un carcinom mamar nediferențiat G3, în cele 2 cazuri cu mutații de tip VUS pe gena STK11, a fost vorba de un cancer mamar

moderat diferențiat G2, iar într-un caz cu mutație pe gena TP53, a fost vorba de un cancer mamar bine diferențiat.

În cazul lotului de 50 de paciente supuse studiului genetic, toate cele 50 de paciente au fost operate, prin chirurgie conservatoare.

Astfel la cele 50 de cazuri cu mutațiile genetice descrise, s-a făcut următoarea asociere a lor cu stadiul evolutiv al cancerului:

- pentru mutațiile pe gena BRCA1:
 - a. din cele 28 de cazuri cu mutația c.3067.C>T sunt 10 cazuri în stadiul II și 18 cazuri în stadiul IIIA,
 - b. din cele 7 cazuri cu mutația c.5266dupC, sunt 2 cazuri în stadiul I și 5 cazuri în stadiul II,
 - c. cele 3 cazuri cu mutația c.4035delA sunt toate în stadiul IIIA;
- pentru mutațiile pe gena BRCA2 avem toate cazurile în stadiul II,
- pentru mutațiile din panelul multigenic avem:
 - a. din cele 3 cazuri cu mutație pe gena CHEK2 sunt 2 cazuri în stadiul I și 1 caz în stadiul II,
 - b. cele 2 cazuri cu mutație pe gena PALB2 sunt ambele în stadiul II,
 - c. din cele 2 cazuri cu mutație pe gena STK11 un caz este în stadiul II și un caz în stadiul IIIA,
 - d. cazul cu mutație pe gena TP53 corespunde stadiului IIIA.

4. Discuții:

Scopul acestui studiu genetic, este de a arăta faptul că, factorii genetici, care sunt implicați în apariția cancerului de sân, au un rol important în screeningul bolii, ajutând astfel la o diagnosticare mai minuțioasă și corect efectuată, a pacientelor cu cancer mamar, evitând situațiile în care pacienta s-ar putea prezenta la medic, într-un stadiu avansat de boală, în care metodele de tratament de care dispunem în prezent, ar fi inutile pentru evoluția ulterioară a bolii și pentru prognosticul supraviețuirii la distanță. (Easton DF et al., 2015; Li Y. et al., 2017; Norum J. et al., 2018; Valencia OM et al., 2017).

Din acest motiv, studiul genetic realizat prin testarea genetică, pentru genele BRCA1/2 și panelul multigenic, ar trebui să facă parte din pachetul de investigații obligatorii, pentru depistarea cancerului de sân, atât la populația

generală, dar mai ales la membrele familiilor cu antecedente familiale (Valencia OM et al., 2017).

Studiul a arătat că toate pacientele care au fost incluse în lotul studiat, au o încărcare familială genetică, pentru cancerul mamar, transmiterea ereditară, făcându-se în cea mai mare parte pe line maternă. (Norum J et al., 2018)

S-a observat de asemenea că testarea cu panelul multigenic, a avut o importanță deosebită, întrucât testarea cu panelul pentru genele BRCA1/2, în unele cazuri a fost negativ, dar testarea ulterioară cu panelul multigenic, a relevat prezența de mutații la alte gene și în acest fel nu au fost scăpate mutații, care nedescoperite, ar duce la depistarea tardivă, în stadii în care metodele de tratament de care dispunem nu ar fi eficiente. (Easton DF et al., 2015; Li Y et al., 2017).

Concluzii:

1. Testarea genetică trebuie să devină și la noi în țară o parte integrantă a sceningului pentru cancerul mamar.
2. În România, datorită costurilor ridicate, testele genetice și managementul cancerului în familiile cu încărcare genetică, nu sunt frecvent utilizate, dar acest lucru s-ar putea îmbunătăți prin reducerea costurilor și prin creșterea a gradului de conștientizare a pacienților, în ceea ce privește consilierea genetică.
3. Cele două tipuri de testări genetice cu panelul pentru BRCA1/2 și cu panelul multigenic, se completează unul pe celălalt.
4. Cele mai frecvente mutații genetice, conform studiului nostru, au apărut la nivelul genei BRCA1, iar din aceste mutații, cea mai frecventă a fost reprezentată de c.3067.C>T. Nu am găsit nici un studiu care să arate că această mutație pe gena BRCA1 ar fi caracteristică pentru România, dar acest lucru ar putea fi un început, pentru stabilirea unui tipar al mutațiilor genetice, pe genele BRCA1 în România, în cazul cancerului de sân.
5. Toate cazurile supuse studiului, au fost descoperite în stadiile I, II și IIIA al bolii și au beneficiat toate de tratament chirurgical conservator, urmat de chimio- și radioterapie, iar evoluția a fost favorabilă la distanță, pe perioada de 4 ani în care au fost urmărite.
6. Au fost descoperite și mutații pe alte gene, ca

urmare a studierii unor cazuri cu panelul multigenic, aceste mutații putând fi asociate pe lângă prezența cancerului mamar și cu alte tipuri de cancer cum ar fi:

- sindromul cancerului ereditar de sân și ovar (HBOC), când avem mutații pe genele BRCA1 și BRCA2, la care se mai poate adăuga și cancer de trompă uterină.
 - sindromul LiFraumeni, care apare ca urmare a unor mutații pe gena TP53 și se manifestă prin tumori primare multiple, apărute în premenopauza (tumoră de sân, tumori cerebrale, leucemie).
 - sindromul Peutz-Jeghers, care se datorează unei mutații pe gena STK11 și care asociază, hamartoame intestinale, macule melanocitice mucocutanate și cancer de sân.
7. În aceste cazuri, pe lângă rezolvarea cancerului de sân, pacienții vor trebui supravegheați și supuși screeningului, pentru tumorile asociate, care s-ar putea dezvolta în continuare.
 8. Studiul nostru a mai arătat și o asociere a mutațiilor genetice în cancerul de sân cu subtipurile tumorale ale acestuia, asocierea cea mai frecventă fiind mutația c.3067.C>T-cu cancerul mamar triplu negativ, (ER-, PR-, HER2-), ce corespunde tipului bazal de cancer mamar, întâlnit în 28 de cazuri supuse testării, adică peste jumătate din cazurile studiate, ceea ce ar putea reprezenta un etalon în acest tip de mutație, în cancerul de sân, pentru România.

Bibliografie

- [1] Ali R, Dawson S.J. , Breast Cancer Resources 2011; 13:1-15
- [2] Amir E., Freedman O.C., Seruga B., et al. – Assessing women at high risk of breast cancer: a review of risk assessment models. J. Natl. Cancer Inst. 102 (10): 680 -91, 2010.
- [3] Antoniou, A, Pharoah, PD, Narod, S. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet. 2003;72(5):1117–30.
- [4] Cavanagh H, Rogers KM. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. Hereditary Cancer in Clinical

- Practice 2015; 13(1):16.
- [5] Chiru R., Bujor Moraru M. Cancerul de sân o perspectivă genetică, Practica Medicala, vol. II, Nr 4(28) (2012),
- [6] Daly M.B., Pilarski R., Axilbund J.E., Berry M., Buys S.S., Crawford B., et al. Genetic/ Familial High risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. J. Natl. Compr. Canc. Netw. 2016; 14(2):15362
- [7] Easton, DF, Pharoah, PD, Antoniou, AC. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. N Engl J Med. 2015;372(23):2243–57.
- [8] Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. Cancer 2009; 115(10): 2222-2233.
- [9] Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA 2017; 317(23):2402-2416
- [10] Li, Y, Arellano, AR, Bare, LA, Bender, RA, Strom, CM, Devlin, JJ. A multigene test could cost-effectively help extend life expectancy for women at risk of hereditary breast cancer. Value Health. 2017;20(4):547–55.
- [11] Lindor N.M., McMaster M.L., Lindor C.J., et al. – Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes- second edition. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (38): 1-93, 2008
- [12] Levy-Lehan E. Breast Journal Cancer, 96, 11-5. (2007)
- [13] Norum, J, Grindedal, EM, Heramb, C. BRCA mutation carrier detection. A model-based cost-effectiveness analysis comparing the traditional family history approach and the testing of all patients with breast cancer. ESMO Open. 2018;3(3):e000328.
- [14] Valencia, OM, Samuel, SE, Viscusi, RK, Riall, TS, Neumayer, LA, Aziz, H. The role of genetic testing in patients with breast cancer: a review. JAMA Surg. 2017;152(6):589–94.
- Contribuția autorilor: conceptualizare: **G.A.R.A;** metodologiei **A.M., C.C., C.M;** culegerea datelor **G.A.R.A,** analiza datelor și / sau interpretarea datelor: **G.A.R.A;** scriere-pregătirea textului inițial **M.A., T. I;** revizuire și editare: **G.A.R.A**
- Conflict de interese: Nu există conflict de interese