

## UTILITATEA POTENȚIALĂ A PROFILURILOR METILICE ALE ADN PENTRU PROCESUL DE PROMOVARE A MARKERILOR MOLECULAR- EPIGENETICI ÎN DIAGNOSTICUL DIFERENȚIAL AL LEUCEMIILOR ACUTE

*Victor Popescu*, dr. în biologie, cerc. șt. superior, *Ion Corcimar*, dr. hab., prof. univ., membru cor., *Cristina Butovscaia*, cerc. șt., *Sanda Buruiană*, asist. univ., *Anastasia Buza*, cerc. șt., *Andrei Țâbâră*, dr. în medicină, asist. univ. USMF „Nicolae Testemițanu”

### Introducere

În anumite celule ale persoanelor care suferă de cancer au fost înregistrate alterări ale profilurilor epigenetice și genetice [1]. Acestea includ hipometilarea la nivelul întregului genom, hipermetilarea locală a genelor supresoare de tumori sau a genelor responsabile de reparația ADN, precum și a genelor inhibitoare ale metastazării, mutații punctiforme (substituția 5-metilcitozinei cu timina) din insulițele CpG ale genei *p53*.

În cele mai multe cazuri de cancer la om este stabilită producerea unor dereglări în cadrul cascadei ciclina D / retinoblastom (Rb), implicate în reglarea ciclului celular [2]. Cu toate acestea, însă, în neoplaziile hematologice inactivarea genei *Rb* este rar întâlnită [3]. Genele *p16* și *p15* sunt gene supresoare în multe tumori solide sau neoplazii hematologice [1]. Aceste gene codifică proteine inhibitoare ale kinazelor ciclina-dependente care, la rândul lor, servesc drept reglatori ai fosforilării proteinei *pRb*.

Gena *p15* (denumirea oficială – CDKN2B), adiacentă genei *p16* în locusul 9p21, la fel se caracterizează adeseori printr-un grad avansat al metilării în neoplazmele hematopoietice umane [1, 4].

Metilarea aberantă a promotorului genei *p15* a fost stabilită de unii autori cu ajutorul MSP în proporție de 58% din cazurile de leucemie mieloidă acută, leucemie limfoblastică acută și leucemie bifenotipică acută [5]. Acești autori au identificat unele profiluri metilice ale genei *p15*, caracteristice pentru cele mai multe subtipuri morfologice care apar în diferite stadii ale diferențierii și susțin că metilarea frecventă a genei *p15* este un eveniment crucial și timpuriu în leucemiile acute. Cercetările acestor autori sugerează că metilarea *p15* survine în mod universal, *de novo*, în timpul transformării / progresiei leucemice a pro-

cursorilor hematopoietici din linia mieloidă / limfoidă sau în celulele stem primitive, pluripotente. Totuși, deocamdată nu au fost găsite diferențe semnificative între profilurile metilice ale tumorilor din diferite stadii [6], sugerându-se ideea că alterările epigenetice au loc în stadiile timpurii ale dezvoltării cancerului sau în momentul inițierii tumorilor. Dereglarea unor căi critice de transducție a semnalelor moleculare, aflate sub controlul genelor *Rb/p16* și *p53/p14/MDM2*, sau a altora pot adeseori fi cauza creșterii neoplazice [1].

Anterior au fost prezentate rezultatele unui studiu [7] privind prevalențele unor profiluri metilice ale promotorului genei *p15* la pacienții cu leucemii acute, potrivit cărora profilul metilic UM este cel mai frecvent și constituie 24/33 (72,7%), profilul metilic UU este reprezentat printr-o proporție cazuistică mai mică – 9/33 (27,3%), iar profilul metilic MM lipsește în rândurile pacienților cu leucemii acute.

**Scopul studiului** a fost stabilirea utilității potențiale a profilurilor metilice ale promotorului genei *p15* în procesul de promovare a markerilor molecular-epigenetici de diagnostic diferențial al leucemiilor acute.

### Materialul și metodele utilizate

În acest studiu a fost investigat un lot din 33 de persoane afectate de leucemii acute (diverse variante), fiind anterior diagnosticate primar și internate la Centrul Hematologic al Institutului Oncologic din Republica Moldova.

Metoda de bază utilizată în cercetarea dată a fost evidențierea metilării acidului dezoxiribonucleic (ADN) la nivelul promotorului genei *p15* prin tratarea ADN cu bisulfid de sodiu (conversia citozinei nemetilate în uracil) și amplificarea porțiunilor genice cu ajutorul perechilor de primeri nonmetil-specifici și metil-specifici prin tehnica MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) [8].

Detaliat, metodele și accesoriile utilizate în proiect au fost specifice fiecărei etape de lucru, după cum urmează: recoltarea sângelui venos la pacienții diagnosticați în prealabil cu diverse subtipuri de leucemie acută în eprubete cu anticoagulant K3EDTA; extracția ADN genomic uman din sânge (Protocol „Qiagen Blood Mini”) [9]; modificarea ADN-ului prin conversia citozinei în uracil (Protocol „Qiagen EpiTect Bisulfite Kit”) [10]; amplificarea prin tehnica MSP a ADN-ului conținând uracil a fost îndeplinită cu *termocycler Crocodile III Appligene* (Protocol „PCR Fermentas”) și primeri [12, 7] sintetizați de compania „Alpha DNA”; analiza produșilor de amplificare a fost efectuată cu aparatul pentru electroforeză orizontală „Ultra Gel XL V2” în gel de agaroză „Amresco”, tip I (2,0%) în soluție TBE (tris-borat-etilendiamintetraacetat) (1×), marker ADN pentru greutatea mole-

GGCTCCCCACTCTGCCAGAGCGAGGCGGGGCGAGTGAGGACTCCGCGACGCGTCCGCGACCTGCGGCCAGA  
P15-U-s P15-M-s P15-M-s  
 GCGGCTTTGAGCTCGGCTGCGTCCGCGCTAGGCGCTTTTCCAGAAGCAATCCAGGCGCGCCCGCTGGT  
 TCTTGAGCGCCAGGAAAAGCCCGGAGCTAACGA **CCGCGCGCTCGGCCACT**GCACGGGGCCCCAAGCCGCA  
P15-U-as P15-M-as P15-M-as  
 GAAGGACGACGGGAGGGTAATGAAGCTGAGCCAGGTCTCTAGGAAGGAGAGAGTGCGCCGGAGCAGCG  
 TGGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCTGTTAAGTTTACGGCCAACGGTGATTATCCGGGCGCTGCGCGTCTGG  
 GGGCTGCGGAATGCGCGAGGAGAACAAGGGCATGCCAGTGGGGCGGCAGCGATGAGGGTCTGGCCAGC

Figura 1. Structura primară a promotorului genei p15 și localizarea secvențelor lui complementare cu primerii U și M.

culară 98 pb (perechi de nucleotide) și 95 pb; vizualizarea produșilor de amplificare prin transiluminare (312 nanometri) și documentarea prin fotografiere.

Pentru prelucrarea statistică a datelor a fost utilizat testul „U-Fisher” (destinat evaluării loturilor mici de subiecți investigați). Valoarea  $p < 0,005$  a fost considerată indicator al diferenței statistic semnificative între grupele comparate, iar valoarea  $p \leq 0,1$  a fost interpretată ca tendință statistic semnificativă.

**Rezultate și discuții**

Pentru a putea avansa în elaborarea și implementarea unui marker ADN metil-specific candidat în diagnosticul diferențial al leucemiilor acute, este minim necesar ca în urma investigațiilor molecular-genetice o genă sau un sector al moleculei de ADN să fie reprezentat prin grupări metilice la nivelul citozinei (atomul de carbon 5) sau a altor baze azotate, care se supun detecției cu ajutorul tehnologiei MSP sau prin alte procedee [11].

În afară de aceste principii, este evident că profilul metilic (UU, UM, MM) prin care se evidențiază starea nemetilată sau metilată a celor două alele de referință este necesar să coreleze cu speciemenele analizate care provin de la persoane cu diagnosticul patologiei, în cazul dat – cu leucemii acute, dacă se propune evidențierea markerilor molecular-genetici pentru diagnosticul maladiilor ce țin de o specialitate medicală sau dacă se urmărește evidențierea markerilor molecular-genetici pentru diagnosticul diferențial pe subtipuri, aceste corelații vor fi estimate în raport cu subtipurile maladii.

În cele ce urmează, prezentăm datele obținute în urma investigațiilor unui lot din 33 de persoane afectate de leucemii acute (diverse subtipuri), fiind anterior diagnosticate primar și internate în Centrul Hematologic al Institutului Oncologic din Republica Moldova (vezi tabelul).

**Structura lotului de pacienți cu leucemie acută pe profiluri metilice ale ADN și subtipuri ale maladii**

Nr. d/o	Subtipuri de leucemie acută (LA)		Profil UU	Profil UM	Profil MM	p	OR	CI (95%)
1.	LA eritroblastică	Număr	0	1	0	-	-	-
		%	0	4,2	0	-	-	-
2.	LA limfoblastică	Număr	2	7	0	>0,1	0,701	0,057-5,135
		%	22,2	29,2	0	-	-	-
3.	LA megacarioblastică	Număr	1	0	0	-	-	-
		%	11,1	0	0	-	-	-
4.	LA mieloblastică	Număr	1	4	0	>0,1	0,633	0,011-7,85
		%	11,1	16,7	0	-	-	-
5.	LA mielomonoblastică	Număr	1	5	0	>0,1	0,485	0,009-5,456
		%	11,1	20,8	0	-	-	-
6.	LA monoblastică	Număr	3	2	0	=0,1	5,153	0,478-75,162
		%	30	8,3	0	-	-	-
7.	LA nediferențiată	Număr	0	1	0	-	-	-
		%	0	4,2	0	-	-	-
8.	LA promielocitară	Număr	1	4	0	>0,1	0,633	0,011-7,85
		%	11,1	16,7	0	-	-	-
<b>Total</b>		<b>Număr</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	-		
			<b>33</b>					
		<b>%</b>	<b>27,3</b>	<b>72,7</b>	<b>0</b>			

Aceste date relevă următoarele fenomene în rândurile pacienților cu leucemii acute eritroblastice, limfoblastice, megacarioblastice, mieloblastice, mielomonoblastice, monoblastice, nediferențiate și promielocitare: 1) În acest lot, la nivelul promotorului genei *p15*, profilul metilic UM are frecvența cea mai înaltă și constituie 24/33 (72,7%); 2) profilul metilic UU este reprezentat printr-o proporție cazuistică mai mică – 9/33 (27,3%); 3) profilul metilic MM lipsește [7].

Dacă analizăm proporțiile pacienților cu profil UM din numărul total al bolnavilor cu un subtip sau altul al leucemiei acute, găsim că ele sunt diferite. În cea mai mare proporție profilul UM se înregistrează printre pacienții cu leucemie acută eritroblastică și nediferențiată – câte 1/1 (100%) fiecare, după care urmează proporția celor cu leucemie acută mielomonoblastică – 5/6 (83,3%), LA mieloblastică și LA promielocitară – câte 4/5 (80%) fiecare, LA limfoblastică – 7/9 (77,8%), LA monoblastică – 2/5 (40%).

În numărul total al pacienților cu leucemii acute, profil UU (semnifică lipsa oricăror molecule metilate de ADN la nivelul promotorului genei *p15* din specimenul procesat) (figura 2), găsim că predomină bolnavii cu leucemie acută monoblastică – 3/9 (30%) și pacienții cu leucemie acută limfoblastică – 2/9 (22,2%), iar cei cu leucemii acute megacarioblastică, mieloblastică, mielomonoblastică și promielocitară au aceeași pondere, egală cu 1/9 (11,1%).

De aici rezultă că moleculele metilate de ADN, la nivelul promotorului genei *p15*, prezintă potențial diagnostic în calitate de marker molecular-epigenetic al leucemiei acute monoblastice.

În numărul total al pacienților cu leucemii acute, profil UM (semnifică metilarea la nivelul promotorului genei *p15* cel puțin a unei molecule de ADN din specimenul procesat) (figura 3), predomină pacienții cu leucemie acută limfoblastică, constituind 7/24 (29,2%), după care urmează bolnavii cu leucemie acută mielomonoblastică – 5/24 (20,8%), leucemie acută mieloblastică și promielocitară – câte 4/24 (16,7%), leucemie acută monoblastică – 2/24 (8,3%) și, în măsură egală, pacienții cu leucemii acute eritroblastică și nediferențiată – 1/24 (4,2%).

De aici rezultă că moleculele metilate de ADN, la nivelul promotorului genei *p15*, prezintă potențial diagnostic în calitate de marker molecular-epigenetic al leucemiei acute mielomonoblastice, mieloblastice, promielocitare, nediferențiate și eritroblastice, dar cu condiția investigării ulterioare a minim 100 de pacienți.

#### Concluzii:

1. Moleculele nemetilate de ADN, la nivelul promotorului genei *p15*, prezintă potențial de marker molecular-epigenetic al leucemiei acute monoblastice.

2. Datele obținute în acest studiu sunt preliminare privind ponderea grupelor de pacienți cu diferite

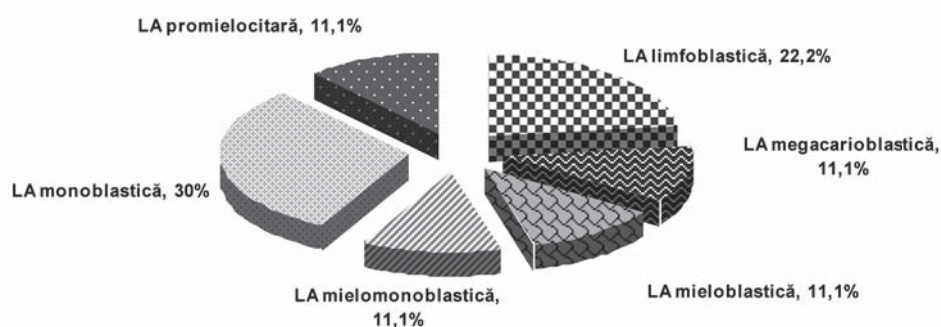


Figura 2. Ponderea grupurilor de pacienți pe subtipuri de leucemie acută în lotul de profil UU.

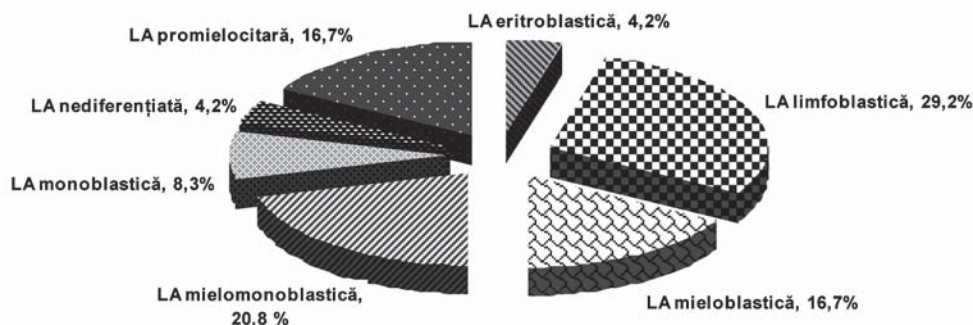


Figura 3. Ponderea grupurilor de pacienți pe subtipuri de leucemie acută în lotul de profil UM.

subtipuri de leucemii acute în lotul specific de profil metilic ADN, iar completarea lotului cu un număr mai mare de subiecți investigați ar oferi posibilitatea validării statistice a lor.

### Bibliografie

1. Wong I., *Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication (Review)*. International Journal of Oncology, 2001; 19: 1319-1324.
2. Ewen M., Sluss H., Sherr C., Matsushime H., Kato J., Livingston D., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. 1993; Cell 73: 487-497.
3. Hangaishi A., *Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies*. Blood, 1996; 87: 4949-4958.
4. Gronbaek K., Nedergaard T., Andersen M. et al., *Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: a genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb*. Leukemia, 1998; 12: 1266-1271.
5. Wong I., Ng M., Huang, D., Lee J., *Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all the morphologic subtypes: potential prognostic implications*. Blood, 2000; 95: 1942-1949.
6. Costello J., Fruhwald M., Smiraglia D., Rush L., Robertson G. et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat. Genet., 2000; 24: 132-138.
7. Popescu V., Corcimar I., Butovscaia C., Zuieva A., Buruiană S., Simionică E., *Prevalențele unor profiluri metilice ale promotorului genei p15 la persoane sănătoase și printre pacienții cu leucemii acute*. Anale Științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. 2009; 3, p. 236-243.
8. Herman J., *Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 9821-9826.
9. Protocol QIAGEN (02/2003) – DNA Blood Mini Kit (50).
10. Protocol QIAGEN (04/2006) – EpiTect Bisulfite Kit (48).
11. Sepulveda A., Jones D., Ogino S. et al., *CpG Methylation Analysis-Current Status of Clinical Assays and Potential Applications in Molecular Diagnostics*. Journal of Molecular Diagnostics. 2009; 11(4):266-278.
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Codul de identificare a secvențelor NC\_000009.11).

### Rezumat

În cadrul studiului dat au fost obținute date preliminare privind ponderea grupurilor de pacienți cu diferite subtipuri de leucemii acute în lotul specific de profil metilic ADN.

Am conchis că moleculele nemetilate de ADN, la nivelul promotorului genei *p15*, prezintă potențial de marker molecular-epigenetic al leucemiei acute monoblastice la

om. Pentru prelucrarea statistică a datelor a fost utilizat testul „U-Fisher”, iar valoarea  $p \leq 0,1$  a fost interpretată ca tendință statistică a diferențelor dintre grupurile comparate.

### Summary

In this study we have obtained preliminary results on the frequencies of various subtypes of acute leukemia with their specific DNA methylation profile.

We concluded that unmethylated DNA molecules within *p15* gene promoter have potential as molecular-epigenetic marker for acute monoblastic leukemia in human. Statistics were performed with „U-Fisher” test and  $p \leq 0,1$  was considered as tendency for differences between compared groups.

### Резюме

В данной статье мы представляем предварительные результаты частот разных форм острой лейкемии и профили метилирования ДНК при них.

Мы вывели, что неметилированные молекулы ДНК в промоторе гена *p15* представляют потенциал в качестве молекулярно-эпигенетического маркера при монобластной лейкемии у человека. Для статистической обработки данных мы использовали „U-Fisher” тест и  $p \leq 0,1$  был принят как показатель тенденции различий между сравниваемыми группами.

Această lucrare a fost realizată cu susținerea financiară a Consiliului Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al Academiei de Științe a Moldovei, proiecte înregistrate cu nr. 87.IND din 09.01.2007; 220.IND din 19.01.2009 în Registrul de Stat.

## EXPRESIA FACTORULUI DE CREȘTERE A ENDOTELIULUI VASCULAR (VEGF) ȘI A RECEPTORULUI LUI (VEGFR2) ÎN PROCESUL PROGRESIEI NEOPLAZIEI DE CERVIX UTERIN

**Lilian Șaptefrați**, dr. hab. în medicină, conf. univ., **Vitalie Mazuru**, asist. univ.;  
**Lucian Rudico**, asist. univ.;  
**Valeriu David**, dr. în medicină, conf. univ.,  
**Tatiana Globa**, asist. univ.  
USMF „Nicolae Testemițanu”

### Introducere

În anul 1863, Virchow R. [12] observă intraoperator și semnaleză în lucrarea sa „Die Krankhaften Geschwulste” vascularizarea abundentă și hiperemia vaselor peri- și intratumorale. Faptul a fost explicat drept o simplă dilatare vasculară în jurul tumorii, care se datora metaboliților eliberați de celulele necroti-