

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL I

GABRIELA-EMILIA AVRAM



TEZĂ DE DOCTORAT

MARKERII EPIGENETICI ÎN PATOLOGIA
CANCERULUI MUCOASEI ORALE

REZUMAT

Conducător științific
PROF. UNIV. DR. ANGELA CODRUȚA PODARIU

Timișoara
2022

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Lista abrevierilor.....	VI
Indexul figurilor.....	XI
Indexul tabelor.....	XII
Mulumiri	XIV
Dedicatie.....	XV
INTRODUCERE.....	XVII

PARTEA GENERALĂ

1. Cancerul cavității orale	1
1.1 Considerații anatomo-patologice și clinice.....	2
1.2 Factorii etiologici implicați în patogenia CSC.....	6
1.2.1 Factori biologici	6
1.2.1.1 Virusul papiloma uman (HPV).....	6
1.2.1.2 Herpes virus uman	8
1.2.2 Obiceiuri vicioase	10
1.2.2.1 Tutunul	11
1.2.2.2 Alcoolul.....	14
2. Markerii epigenetici.....	16
2.1. Caracteristici generale.....	16
2.2. Mecanismele epigenetice	17
2.2.1 Metilarea ADN-ului.	17
2.2.2 Hidroximetilarea ADN-ului	19
2.2.3 Metilarea histonica	20
2.3. ARN non-codant.....	21
2.3.1. Clasificarea moleculelor ARN non-codante	22
2.3.1.1 ARN non-codant scurt	22
2.3.1.2 ARN non-codant lung	26
2.3.2 Implicațiile clinice ale ARN-ului non-codant în cancerul oral	27

PARTEA SPECIALĂ

3. Modificări ale ADN la nivelul mucoasei bucale în relație cu expunerea la fum de țigară- Studiul I	31
3.1 Scopul studiului	31
3.2 Material și metodă	31
3.2.1 Participanții la studiu.....	31
3.2.2 Recoltarea probelor biologice	33
3.2.3 Izolarea ADN	33
3.2.4. Analiza spectrofotometrică a ADN obținut.....	35
3.2.5. Detectarea procentului global de metilare a ADN din celulele epiteliale orale de la nivelul mucoasei jugale.	35
3.2.6. Detectarea procentului global de hidroximetilare a ADN din celulele epiteliale orale de la nivelul mucoasei jugale.....	38
3.2.7. Analiza statistică.....	40
3.3 Rezultate.....	40
3.3.1 Cuantificarea ADN extras	40
3.3.2 Analiza metilării globale a AND	43
3.3.3 Analiza hidroximetilării globale a AND	47
3.4. Discuții	50
3.5 Concluzii	52
4. Identificarea și evaluarea markerilor epigenetici implicați în patologia carcinomului scuamo-celular al cavității orale – Studiul II	53
4.1. Scopul studiului	53
4.2 Material și metodă	53
4.2.1 Materialul folosit în studiu	53
4.2.2 Criteriile de includere/excludere	54
4.2.3 Validarea și recoltarea probelor.....	54
4.2.4 Izolarea ADN genomic din probele de parafină.....	56
4.2.5 Analiza spectrofotometrică a ADN obținut.....	57
4.2.6 Identificarea profilului de metilare la nivelul întregului genom uman în probele de cancer versus țesut normal adiacent	58
4.2.7 Analiza statistic.....	60
4.2.8 Identificarea locilor microARN diferențial metilați	62
4.2.9 Predicția insulelor CpG	62
4.2.10 Compararea rezultatelor obținute cu cele din literatură de specialitate.	63

4.2.11 Analiza <i>in silico</i> a microARN/ integrarea funcțională a microARN	63
4.2.11.1 Predicția genelor target.....	63
4.2.11.2 Analiza funcțională a genelor target.....	65
4.3 Rezultate.....	65
4.3.1 Identificarea profilului de metilare la nivelul întregului genom uman în probele de cancer versus țesut normal adiacent	65
4.3.2 Identificarea locilor microARN diferențial metilati	68
4.3.3 Predicția insulelor CpG	70
4.3.4 Compararea rezultatelor obținute cu cele din literatură de specialitate.	72
4.3.5 Analiza <i>in silico</i> a microARN/ integrarea funcțională a microARN.....	72
4.3.5.1 Predicția genelor target.....	72
4.3.5.2 Analiza funcțională a genelor target.....	72
4.4 Discuții	83
4.5 Concluzii	87
Concluzii și contribuții personale	89
BIBLIOGRAFIE	92
ANEXE	I

INTRODUCERE

Cancerul cavității orale alături de alte cancere a reprezentat și reprezintă încă una din marile provocări în medicină.

Cancerul oral cu celule scuemoase este tumora care predomină în cadrul cancerelor orale, apreciată la un procent de 90%, fiind considerată ca cea mai agresivă și răspândită tumoră. În pofida progreselor și a achizițiilor privind managementul cancerului scuamocelular oral pe baza datelor etio-patogenice s-a estimat că 45% din pacienți au un prognostic infaust, datorită posibilității de recurență locală sau metastazării.

Studiile de genetică moleculară anterioare și actuale încearcă să clarifice mecanismele care stau la baza procesului malign. Ceea ce este bine demonstrat sunt concluziile privind mutația genică, amplificarea genică și restructurarea cromozomială ca fiind prezente la majoritatea pacienților cu cancer oral.

Deși s-au efectuat numeroase cercetări pentru a elucida patenurile moleculare care intervin în procesul de tranziție de la epiteliu normal la starea premalignă, apoi la cea de carcinom oral, unul din domeniile încă parțial descifrate este cel al modificărilor epigenetice. Deși modificările epigenetice au fost legate în prezent de inițierea și progresia tumorală orală, acestea au fost doar parțial caracterizate.

Vizând heterogenitatea etiologică a cancerului oral SCC și pentru a înțelege mecanismele care stau la baza diferenței privind modelele de metilare specifică mi-am propus să studiez rolul fumatului în declansarea procesului tumoral prin identificarea posibilelor modificări epigenetice la nivel de ADN în celula epitelială orală care ar putea fi cauzate de tutun precum și identificarea și evaluarea markerilor epigenetici implicați în patologia carcinomului scuamocelular al cavității orale (CSCO).

PARTEA GENERALĂ

1. CANCERUL CAVITĂȚII ORALE

Cancerul cavității orale reprezintă aproximativ 85% din cancerul capului și gâtului și este una din cele mai severe afecțiuni, având un prognostic rezervat datorită faptului că de cele mai multe ori este depistat în stadiu avansat al bolii ca urmare a lipsei semnelor clinice în stadiile inițiale sau a localizării în zonele posterioare, puțin vizibile, ale cavității bucale.

1.1 CONSIDERAȚII ANATOMO-PATOLOGICE ȘI CLINICE

Din totalul cancerelor cavității orale 90 % sunt reprezentate de carcinomul scuamocelular.

Din punct de vedere clinic carcinomul scuamocelular prezintă particularități diferite influențate atât de etiologie, localizare cât și de stadiul procesului neoplazic. În stadiile inițiale forma cea mai frecvent întâlnită, indiferent de localizare, este cea ulcerativă și de obicei este de natură traumatică. În stadii foarte avansate formele sunt în general mixte având aspect ulcero-vegetant sau ulcero-proliferativ. În localizările pe față ventrală a limbii și în planșeu, 40% din pacienți prezintă în stadiile inițiale afectare limfonodulară, iar în T4 acest procent merge până la 90%.

Pe lângă acestea o importanță deosebită trebuie acordată și modificărilor morfopatologice din țesutul tumoral. Gradul slab de diferențiere celulară determină creșterea recidivei și scăderea ratei de supraviețuire. Prezența de alte tipuri celulare la nivelul stromei tumorale influențează dezvoltarea procesului patologic prin acțiunea pe care acestea o

exercită asupra celulelor tumorale propriu-zise. Fibroblasti asociați cancerului (CAF) controlează inițierea, progresia, angiogeneza și metastaza prin interacțiunea cu celulele tumorale cu ajutorul factorilor de creștere tumorală (FCT) , citikinelor sau exozomilor (ARNm, ADN, proteine și miARN). Limfocitele T induse tumoral și granulocitele sunt asociate cu creșterea proliferării tumorale, cu metastaza și cu **reducerea** ratei de supraviețuire.

1.2 FACTORII ETIOLOGICI IMPLICAȚI ÎN PATOGENIA CSC.

1.2.1 FACTORI BIOLOGICI

1.2.1.1 Virusul papiloma uman (HPV)

Cele mai frecvent depistate tipuri de virusuri HPV întâlnite în cavitatea bucală, atât în cazul pacienților sănătoși cât și a celor cu leziuni benigne sau maligne, sunt tipurile 6,11,16,18,31,33,35,52,58.

Infectarea cu HPV a mucoasei orale are ca rezultat localizarea virusului la nivelul stratului bazal de unde prin intermediul oncoproteinelor virale, în special E6 și E7, influențează proliferarea celulară și sinteza de ADN. În cazul tumorilor orale HPV pozitive se întâlnesc și o serie de aberații cromozomiale, de tipul amplificărilor, la 3q, 16q, 20q. Realizarea profilului transcripțional al pacienților cu CSC la nivelul capului și gâtului au relevat și influența pe care o are prezența HPV asupra expresiei miRNA. Pe lângă aceste modificări la pacienții cu CSC HPV pozitiv se întâlnesc și modificări ale gradului de metilare atât la nivelul genomului viral cât și a genomului celular.

În aproximativ 1/3 din cazurile de cancer asociate cu HPV a fost depistată coinfecția cu alte virusuri ca Epstein-Barr (EBV), herpes simplex (HSV), cytomegalic (CMV), virusul imunodeficienței umane (HIV).

1.2.1.2 Herpes virus uman

Virusul herpes uman este o familie de virusuri din care fac parte și virusurile herpes simplex și Epstein-Barr. Infectarea cu EBV și HSV este foarte întâlnită în rândul populației, afectând aproximativ 9 din 10 adulți. Implicarea virusului EBV în patogeneza CSC este contestabilă. Rolul coinfecției virale în procesul tumoral este investigat de Jiang et. al (2015) într-un studiu in vitro pe linii celulare. Rezultatul studiului sugerează implicarea coinfecției HPV/EBV în creșterea gradului de invazivitate, nu de proliferare celulară.

Datele privind implicarea virusului HSV-1 în patogeneza CSC oral nu sunt foarte concludente cu toate că studiile mai vechi evidențiază prezența acestuia în celula canceroasă, fără să fie depistat și în mucoasa normală a aceluiași pacient. Procentul redus de cazuri de CSC HSV-1 pozitive depistat sugerează că acesta nu joacă un rol important în patogeneza CSC orale.

1.2.2 OBICEIURI VICIOASE

1.2.2.1 Tutunul

Tutunul, indiferent de forma de ingerare (fumat sau mestecat) este asociat cu apariția cancerului la nivelul mucoasei jugale, gingiei și buzei.

La nivel structural tutunul produce o dezorganizare epitelială prin ruperea atașamentului celular și reducerea numărului de straturi celulare, precum și prin modificarea formei și dimensiunii celulelor. Efectul tutunului nu se reduce doar la aceste modificări structurale, el fiind implicat și în perturbarea echilibrului dintre proliferarea și moartea celulară.

Deoarece modificările epigenetice se considera a fi implicate în etapele inițiale ale declanșării procesului tumoral s-a luat în considerare și posibilul impact al tutunului asupra epigenomului cu consecințe în carcinogeneza. Utilizând epiteliul de la nivelul mucoasei linguale a fumătorilor, cercetătorii au constatat o creștere a metilării insulelor CpG ce poate ajunge până la 50% în cazul genelor MRE11A și PMS2. De asemenea, în cazul ARN-urilor necodificatoare s-au constatat diferențe în ceea ce privește nivelul de metilare între fumători și foști fumători, precum și diferențe de metilare în raport cu numărul de țigări fumate.

1.2.2.2 Alcoolul

Este considerat că 70% din pacienții cu cancer oral sunt potatori. Saad et al. (2015) identifica 8 microARN-uri (miR-30a, miR-101, miR-675, miR-934, miR-1266, miR-3164, miR-3178 și miR-3690) asociate cu consumul de alcool, în carcinoamele scuamocelulare ale capului și gâtului (CSCCG), a căror activitate este crescută. Pe lângă acestea o expresie crescută în CSC orale asociate alcoolului s-a constatat a avea și miR-375 și miR-21.

2. MARKERI EPIGENETICI

2.1. CARACTERISTICI GENERALE

Mecanismele epigenetice sunt elemente cheie ale proceselor de dezvoltare și contribuie la diversitatea genetică. Perturbări ale acestor mecanisme sau a markerilor ce intervin în aceste mecanisme pot duce la apariția fenomenelor patologice, printre care și cancerul. Principalele procese epigenetice și markeri epigenetici sunt: metilarea ADN-ului, modificări histonice de tipul acetilării și metilării și ARN-ul necodat.

2.2. MECANISMELE EPIGENETICE

2.2.1 METILAREA ADN-ULUI.

Metilarea este un proces fundamental al dezvoltării normale și orice modificare a sa are ca rezultat transmiterea unui semnal la nivel de cromatina ce va determina modificări ale transcripției. Predominant metilarea ADN-ului are loc la nivelul citozinei ce precede guanina (regiuni CpG) dar se întâlnește și în regiuni non CpG (CA, CT). Metilarea promotorului reflectată în reducerea expresiei genelor implicate în repararea ADN-ului, a genelor supresoare tumorale sau a celor implicate în procesele de invazie și metastazare este o caracteristică a tumorigenezei. Metilarea la nivelul corpului genei este, de asemenea, asociată cu expresia genică. Spre deosebire de hipermetilarea promotorului hipermetilarea la nivelul corpului genei este asociată cu creșterea expresiei genice iar hipometilarea este asociată atât cu creșterea cât și cu reducerea expresiei genice. În schimb metilarea intergenica are rol de a inactiva expresia unor elemente genetice potențial patogene (transpozomi sau elementele virale) pentru a proteja integritatea structurală și funcțională a genomului. Hipometilarea globală fiind dată mai degrabă de reducerea metilării la nivelul elementelor transpozabile decât la nivel corpului genei. Reducerea gradului de metilare este caracterizată prin apariția de epimutații ce sunt asociate cu instabilitatea cromozomială întâlnită în cancere.

2.2.2 HIDROXIMETILAREA ADN-ULUI

Alterarea paternului de metilare a ADN-ului se produce atât prin apariția de noi zone metilate cât și prin demetilarea celor existente. Oxidarea 5mC sub acțiunea enzimelor din familia TET are ca prim produs 5 hidroximetilcitozina (5hmC), ce prin oxidare ulterioară formează 5 formilcitozina (5fC) și 5 carboxilcitozina (5caC). Nivelul 5hmC al oricărei gene este determinat de tipul de țesut din care provine, iar nivelul global este influențat de gradul de diferențiere și maturitate celulară.

2.2.3 METILAREA HISTONICĂ

Metilarea histonică constă în adăugarea unei grupări metil de la S-adenozinmetionina (SAM) la capătul N-terminal al histonelor. Ca și metilarea ADN-ului metilarea histonică este reversibilă. Metilarea histonică (H) este un proces dinamic cu consecințe diferite asupra reglării transcripției, a cromatinei și a reparării ADN-ului în funcție de poziția și gradul de metilare a lizinei (K) sau argininei (R).

2.3 ARN NON-CODANT

ARN-urile non-codante sunt o clasă ARN-uri ce nu au ca rezultat final traducerea într-o proteină.

2.3.1. CLASIFICAREA MOLECULELOR ARN NON-CODANTE

Non coding ARN se clasifică în funcție de lungimea lanțului în ARN non-codant scurt (sncARN) și ARN non-codant lung(lncARN).

2.3.1.1 ARN-ul non-codant scurt

Principalele moleculele de ARN non-codante scurte implicate în procesele epigenetice sunt: miARN, siARN și piARN. Rolul acestora este complex fiind implicate atât în reglarea transcripției ARN-ului mesager(ARNm) (prin inhibarea expresiei sau deradarea lui) cât și în rearanjarea ADN-ului și inhibarea expresiei genice mediată de cromatină.

MicroARN sunt implicate în reproducerea și diferențierea celulelor stem. Micro ARN-urile au rol și în reglarea expresiei altor microARN-uri. Pe lângă implicarea în procesele biologice aproximativ 30% din miARN-urile sunt implicate și în procesele tumorale. Studiile au arătat că miARN-urile acționează asupra mai multor gene și în funcție de genele implicate pot avea efect oncogen sau supresor tumoral.

siARN este una din cele mai studiate ARN-uri non-codante în experimentele , in vivo sau in vitro, pentru determinarea strategiilor terapeutice în cancer. Numeroase studii au arătat că administrarea de siARN specific determină modificarea expresiei unor gene implicate în geneza, dezvoltarea și propagarea locală și la distanță a proceselor tumorale. Pe lângă inhibarea directă siARN poate influența și reacția pacientului la tratament în cazurile cu rezistență la medicamente.

piARN se găsește aproape exclusiv în celulele germinative de la nivel țesutului testicular adult și țesutului ovarian fetal. Cu toate că piARN prezintă o expresie crescută în celulele geminative, fără a fi depistată și în celulă somatică, studii recente au identificat prezența de piARN cu expresii crescute în cancere.

2.3.1.2 ARN non-codant lung

Principala funcție a lncARN este de reglare a expresiei genelor supresoare tumorale sau oncogene. Reglarea activității genice se realizează atât intracromozomial (*cis*) cât și pe alt cromozom (*trans*). Unele din mecanismele de reglare a genelor situate intracromozomial sunt legarea factorilor de transcripție, condensarea cromatinei și metilarea genică iar a celor situate pe alt cromozom includ modularea factorilor implicați în transcripție și interacțiunea cu complexe de remodelare a cromatinei. Ca și alte ARN-uri non-codante, lncARN poate induce modificări celulare ce declanșează procesul tumoral.

2.3.2 IMPLICAȚIILE CLINICE ALE ARN-ULUI NON-CODANT ÎN CANCERUL ORAL

Deoarece studiile au arătat că ARN-urile non-codante au specificitate tisulară s-a luat în considerare și posibila lor intervenție în procesele fiziologice și patologice ce au loc la nivelul celulelor epiteliale orale. Cele mai investigate ARN-uri non-codante sunt miARN-urile. În ultimii ani numeroase studii au evidențiat implicarea miARN în inițierea acestui proces.

Modificări ale gradului de metilare au fost observate și în cazul microARN-urilor asociate cu CSS oral. Metilarea promotorului miR-137 este unul din factorii ce influențează reducerea expresiei acestui microARN în CSC oral. Modificări ale gradului de metilare în CSC din cavitatea bucală au fost depistate și în cazul miR-127, miR-205 și familia de miR-200, corelate sau nu cu expresia genică a acestora la nivel de țesut.

Ultimele cercetări din domeniul patologiei maligne orale sau îndreptat și spre ARN-ul non-codant lung. ARN-ul non-codant lung are o expresie diferită în țesutul tumoral față de țesutul epitelial normal din cavitatea bucală și ca și mARN poate avea atât rol de oncogenă cât și de gena supresoare tumorală fiind implicat în proliferarea, migrarea și invazia proceselor tumorale din cavitatea orală. Până în momentul actual studiile efectuate pentru depistarea mecanismelor ce modifică expresia lncARN-urilor în cazul CSC au identificat doar la nivelul MEG3 prezența hipermetilării genice.

PARTEA SPECIALĂ

3. MODIFICĂRI ALE ADN LA NIVELUL MUCOASEI BUCALE ÎN RELAȚIE CU EXPUNEREA LA FUM DE ȚIGARĂ- STUDIUL I

3.1 SCOPUL STUDIULUI

Acest studiu își propune să identifice modificările epigenetice la nivelul ADN din celulele mucoasei jugale care ar putea fi cauzate de expunerea la produse cu tutun (țigări) la subiecții fumători și evaluarea acestora comparativ cu nefumătorii.

3.2 MATERIAL SI METODA

3.2.1 PARTICIPANTII LA STUDIU

Subiecții participanți la acest studiu au fost voluntari. Numărul total de participanți care au fost de acord să participe la acest studiu a fost 47, împărțiți în 3 loturi după cum urmează:

I. Lotul fumători: 19

II. Lotul nefumători: 22

III. Lotul fosti fumatori: 6

3.2.2 RECOLTAREA PROBELOR BIOLOGICE

Recoltarea celulelor de la nivelul mucoasei jugale s-a făcut cu ajutorul swab-urilor bucale sterile Sterile OmniSwab buccal swabs.

3.2.3 IZOLAREA AND

Izolarea ADN-ului genomic din celulele prelevate s-a făcut cu ajutorul kit-ului specific pentru swab-urile bucale QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) urmând specificațiile din prospect.

3.2.4. ANALIZA SPECTROFOTOMETICA A ADN OBȚINUT

Analiză cantității și calității AND obținut a fost făcută cu ajutorul NanoDrop Microvolume Spectrophotometer.

3.2.5. DETECTAREA PROCENTULUI GLOBAL DE METILARE A ADN DIN CELULELE EPITELIALE ORALE DE LA NIVELUL MUCOASEI JUGALE.

Depistarea nivelului de metilare globală a ADN din țesutul epitelial oral s-a făcut prin metoda fluorometrică ELISA folosind kit-ul MethylFlash Methylated DNA Fluorometric Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) urmând specificațiile din prospect.

3.2.6 DETECTAREA PROCENTULUI GLOBAL DE HIDROXIMETILARE A ADN DIN CELULELE EPITELIALE ORALE DE LA NIVELUL MUCOASEI JUGALE.

Ca și în cazul determinării metilării globale a ADN, pentru cuantificarea nivelului de hidroximetilare am utilizat metoda fluorometrică ELISA folosind kitul specific hidroximetilării: Hydroxymethylated DNA Fluorometric Quantification Kit.

Determinarea valorii absolute a metilării și hidroximetilării s-a făcut folosind curba standard generată și formulele de calcul din protocol. Deoarece probele au fost în duplicat valoarea fluorescenței relative (RFU) a fiecărei probe s-a calculat făcând media valorii RFU a duplicatelor.

3.2.7 ANALIZA STATISTICĂ

Rezultatele analizelor au fost exprimate în medie aritmetică și DS (Deviația Standard). După verificarea normalității distribuției cu ajutorul testului D'Agostini & Pearson Omnibus Test s-a făcut compararea procentul de metilare și hidroximetilare între grupuri cu ajutorul testului-T nepereche sau testului Mann-Whitney U. Valoarea lui $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic.

3.3 REZULTATE

3.3.1 CUANTIFICAREA ADN EXTRAS

Analiza specrofotometrică a ADN extras măsurată la A_{260}/A_{280} a evidențiat o puritate a ADN cuprinsă între 1.09 și 3.

3.3.2 ANALIZA METILĂRII GLOBALE A ADN

La acest studiu au participat 47 de subiecți (25 bărbați și 22 femei) cu vârstă cuprinsă între 26 și 89 ani. Consumul mediu de țigări pe zi nu a fost semnificativ diferit la fumători față de nefumători.

Analizând datele obținute în urma acestei analize am observat că deși nivelul de metilare este mai scăzut la fumători (3.1%) și foști fumători (2.1 %) față de nefumători (4.1%) diferența nu este semnificativă statistic.

Dacă luăm în considerare intensitatea fumatului (numărul de țigări /zi și durata în ani a fumatului) situația este diferită. Cei care au fumat mai mult de 20 țigări /zi precum și cei care au fumat o perioadă mai mare de 20 ani prezintă o creștere semnificativă a nivelului de metilare la nivel de ADN ($p=0.0273$). Datorită numărului redus de participanți la studiu în această analiză stratificată nu a fost incluși și foștii fumători.

3.3.3 ANALIZA HIDROXIMETILĂRII GLOBALE A ADN

Datorită numărului redus de foști fumători participanți la studiu analiza comparativă în cazul hidroximetilării globale a ADN a fost făcută doar între fumători și nefumători.

Prin această analiză am identificat un nivel scăzut al hidroximetilării globale a ADN în cazul fumătorilor față de nefumători. Nefumătorii având un procent al hidroximetilării globale a ADN de două ori mai mare decât fumătorii ($p= 0.0312$).

3.4. DISCUȚII

Acest studiu pilot a investigat efectele tutunului asupra metilării și hidroximetilării globale a ADN din celulele epiteliale orale.

Studii recente au identificat existența unei relații între fumat și modificări extinse ale nivelului de metilare a ADN (hipometilare globală și hipermetilare la nivel de promotor a numeroase gene). Zeilinger et al (156) folosind probe de sânge a observat atât insule CpG hipometilate cât și insule CpG hipermetilate la fumători comparativ cu nefumătorii fără însă a identifica o direcție clară și o magnitudine a nivelului de metilare globală a ADN sub influența fumatului.

Rezultatele noastre arată o reducere a statusului de metilare cu 25% în cazul fumătorilor. Reducerea nivelului de metilare a fost mai pronunțată în cazul foștilor fumători (aproximativ 50%). Această, însă, poate fi rezultatul influenței cumulative a vârstei subiecților din acest grup.

Pentru a identifica o corelație între intensitatea fumatului și nivelul global al metilării am împărțit subiecții în 2 categorii determinate de numărul de ani în care pacientul a fumat și respectiv numărul de țigări fumate pe zi. Am considerat pe cei ce au fumat mai mult de 20 țigări pe zi precum și pe cei care au fumat mai mult de 20 ani ca fumători înrăiți (heavy

smokers). În concordanță cu rezultatele raportate de De Araujo Costă et al am depistat o creștere semnificativă (de 2 ori) a nivelului de metilare globală în cazul fumătorilor înrăiți comparativ cu cei care fumează mai puțin.

În ceea ce privește hidroximetilarea rezultatele acestui studiu au evidențiat un nivel al hidroximetilării globale ADN mult mai redus comparativ cu cel al metilării globale a ADN. Aceasta este în concordanță cu studiile anterioare asupra nivelului de 5-mC și 5-hmC în țesutul uman. Totodată am constatat că fumătorii au avut un nivel semnificativ redus al hidroximetilării globale a ADN comparativ cu nefumătorii, diferența neinfluențată de vârstă subiecților.

3.5 CONCLUZII

Acest studiu a avut ca scop cuantificarea nivelului de metilare și hidroximetilare globală a ADN din celula epitelială orală expusă fumului. Am constatat o scădere de 25% a nivelului de metilare la fumători și o scădere de 50% la foștii fumători. În ceea ce privește statusul hidroximetilării, am constatat, de asemenea, un nivel redus la fumători. Rezultatele arată că fumatul poate influența metilarea și hidroximetilarea globală a ADN-ului.

4. IDENTIFICAREA SI EVALUAREA MARKERILOR EPIGENETICI IMPLICAȚI ÎN PATOLOGIA CARCINOMULUI SCUAMO-CELULAR AL CAVITĂȚII ORALE - STUDIUL II

4.1 SCOPUL STUDIULUI

În acest studiu ne-am gândit să investigăm modificările de metilare genomică asociate cu patologia carcinomului scuamo-celular oral (CSCO).

Principalele obiective ale acestui studiu sunt:

- Identificarea profilului de metilare la nivelul întregului genom uman în probele de cancer oral
- Evaluarea și validarea profilului de metilare la nivelul anumitor situsuri asociate cu patologia cancerului mucoasei orale
- Evaluarea expresiei anumitor moleculele microARN în vederea stabilirii unei corelații între nivelul de expresie al acestor molecule și profilul de metilare a anumitor situsuri din genom
- Analiza bioinformatică *in silico* a datelor obținute din investigarea gradului de metilare a genomului pentru a genera profilul expresiei genelor diferit metilate identificate și asocierea lor cu anumite căi de semnalizare sau procese biologice.

4.2 MATERIAL SI METODĂ

4.2.1 MATERIALUL FOLOSIT IN STUDIU

Pentru determinarea gradului de metilare globală în cazul CSCO am folosit 13 de perechi de blocuri de parafină care conțineau țesut tumoral (T) și țesut normal adiacent (N).

4.2.2 CRITERIILE DE INCLUDERE/EXCLUDERE

În vederea efectuării unei analize corespunzătoare dar și pentru obținerea unor rezultate relevante am stabilit următoarele criterii de evaluare pentru alegerea blocurilor de parafină.

Criterii de includere:

- diagnosticul de carcinom scuamocelular(CSC) confirmat histopatologic.
- pentru fiecare bloc de parafină cu țesut reprezentând CSC oral să existe și un bloc de parafină cu țesut adiacent neinfiltrat tumoral.

Criterii de excludere:

- insuficient țesut în blocul de parafină
- asocierea cu leziuni de tip displazic sau lichen plan
- cazurile cu efect citopatic HPV.

4.2.3 VALIDAREA SI RECOLTAREA PROBELOR.

După alegerea blocurilor de parafină ce corespundeau criteriilor de includere, s-a trecut la analizarea lor pentru a elimina probele ce prezentau unul sau mai multe criterii de excludere. După validarea probelor s-a trecut la recoltarea fragmentelor de țesut din fiecare bloc de parafină inclus în studiu.

4.2.4 IZOLAREA ADN GENOMIC DIN PROBELE DE PARAFINĂ.

Pentru izolarea ADN s-a folosit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit urmând specificațiile din prospect.

4.2.5 ANALIZA SPECTROFOTOMETICĂ A ADN OBȚINUT

Pentru determinarea locilor CpG ce prezintă metilare diferențiată în cazul probelor de cancer versus țesutul normal adiacent am făcut Next Generation Sequencing (NGS) utilizând Infinium Human Methylation 450k BeadChip KitSpectrophotometer. Purity ADN măsurată la A_{260}/A_{280} a fost de 1.89 ± 0.18 .

4.2.6 IDENTIFICAREA PROFILULUI DE METILARE LA NIVELUL ÎNTREGULUI GENOM UMAN ÎN PROBELE DE CANCER VERSUS ȚESUT NORMAL ADIACENT

Pentru determinarea locilor CpG ce prezintă metilare diferențiată în cazul probelor de cancer versus țesutul normal adiacent am făcut Next Generation Sequencing (NGS) utilizând Infinium Human Methylation 450k BeadChip Kit.

4.2.7 ANALIZA STATISTICĂ

Analiza bioinformatică a datelor s-a făcut cu ajutorul programelor informatice pentru bioconductor minfi și limma din cadrul R statistical program (www.R-project.org).

4.2.8 IDENTIFICAREA LOCILOR MICROARN DIFERENȚIAL METILAȚI

Am analizat toate genele diferențial metilate (valoarea p ajustat ≤ 0.05) pentru a decela prezența microARN. După depistarea microARN diferențial metilați am identificat numărul de loci CpG ce generează metilarea diferențiată din cadrul microARN depistați.

4.2.9 PREDICȚIA INSULELOR CpG

Folosind platforma MethPrimer am calculat predicția insulelor CpG de la nivelul acestor loci pentru a detecta prezența de insule CpG capabile să genereze primeri specifici pentru PCR metilare precum și primer specifici pentru PCR bazat pe conversie bisulfică.

4.2.10 COMPARAREA REZULTATELOR OBȚINUTE CU CELE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE.

Datele din literatura de specialitate cu privire la expresia microARN în carcinomul scuamocelular oral necesare realizării acestei analize le-am obținut utilizând baza de date PubMed.

4.2.11 ANALIZA IN SILICO A microARN/ INTEGRAREA FUNCȚIONALĂ A microARN

4.2.11.1 Predicția genelor target

Un prim pas în vederea evaluării funcțiilor microARN îl constituie identificarea genelor target. Pentru identificarea mai rapidă și mai comprehensivă a genelor target am utilizat metodă computerizată miRWalk 3.0.

Pentru predicția genelor target a microARN identificate la nivelul siturilor de transcripție 3' UTR, 5'UTR și CDS am stabilit o valoare p ajustat Bonferroni ≤ 0.05 .

Pe lângă aceasta am luat în considerare și următoarele criterii:

- probabilitatea de legare a microARN să fie cel puțin 0.99
- validarea de către cel puțin încă un algoritm: miRDB sau TargetScan

4.2.11.2 Analiza funcțională a genelor target

După identificarea setului de gene target corespunzătoare fiecărui tip de microARN am comparat aceste seturi de date cu genele cu expresie diferențiată (DEG- Differentially Expressed Genes) obținute după analiză Geo2R a setului de date GSE138206 (False Discovery Rate ajustat după procedura de corelație Benjamini și Hochberg FDR ≤ 0.05). Pentru analiza funcțională a genelor target a microARN identificate am utilizat programul KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) și analiza clusterelor de pe platforma STRING 9.1.

4.3. REZULTAT

4.3.1 IDENTIFICAREA PROFILULUI DE METILARE LA NIVELUL ÎNTREGULUI GENOM UMAN ÎN PROBELE DE CANCER VERSUS ȚESUT NORMAL ADIACENT

Rezultatele finale ale analizei Infinium 450K array-based Methylation Assay sunt exprimate în valori beta și M. Analiza valorilor beta și M rezultate din investigarea probelor cu ajutorul Illumina 450K bead array reflectă faptul că, la nivel global, există un grad mare de hipometilare în cazul probelor de țesut tumoral comparativ cu probele de țesut normal.

Investigarea prin Illumina microarray a evidențiat 440365 loci cu metilare diferită din care 1468 au prezentat diferențe semnificative de metilare între probele de cancer și cele de țesut adiacent fără invazie tumorală (valoarea p ajustat ≤ 0.05).

4.3.2. IDENTIFICAREA LOCILOR MICROARN DIFERENTIAL METILATI

Analizând cei 1469 de loci diferențial metilati am depistat 5 loci ce codează pentru 4 microARN: hsa-miR-124-3, hsa-miR-24-1, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500.

4.3.3 PREDICȚIA INSULELOR CpG

Analiza MethPrimer a evidențiat mai multe aspecte. Cu ajutorul acestei analize am identificat prezența insulelor CpG la capătul 5'UTR pentru hsa-miR-124-3 și hsa-miR-769, dar nu pentru hsa-miR-4500 și hsa-miR-24-1. Cinci seturi de primeri BSP cu secvențele lor au fost extrase pentru toate cele patru molecule de microARN; fiecare dintre ele constând din două perechi de primeri sens și antisens.

4.3.4 COMPARAREA REZULTATELOR OBȚINUTE CU CELE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE.

Analiza datelor obținute a dus la identificarea unui număr de 191 microARN. Dintre aceștia 101 prezentau o expresie genică scăzută și 88 o expresie genică crescută în probele de CSCO comparativ cu cele de țesut normal.

4.3.5 ANALIZA *IN SILICO* A microARN/ INTEGRAREA FUNCȚIONALĂ microARN

4.3.5.1 PREDICȚIA GENELOR TARGET

După selecția genelor ținând cont de criteriile stabilite (probabilitatea de legare ≤ 0.99 și validarea de către cel puțin încă un alt algoritm) și îndepărtarea duplicatelor am obținut 4147 gene target pentru hsa-miR-24-1, 6084 gene target pentru hsa-miR-124-3, 743 gene target pentru hsa-miR-4500 și 7256 gene target pentru hsa-miR-769.

4.3.5.2 ANALIZA FUNCȚIONALĂ A GENELOR TARGET

Analiza Geo2R a selectat un număr de 2289 gene a căror expresie genică a fost modificată, 1490 având o expresie genică scăzută (FC < -0.538) și 799 având o expresie genică crescută (FC < 1.0)

Pentru lista de gene comune obținute în urmă comparării genelor target ale hsa-miR-24-1 cu genele cu expresie redusă din setul de date GSE138206 am obținut o rețea de interacțiuni proteină-proteină (PPI) caracterizată prin 259 de noduri, 68 de capete de rețea. Evaluarea calitativă a PPI a generat un p de $3.75e-12$. Analiza funcțională KEGG nu a evidențiat nici un mecanism biologic semnificativ asociat acestui set de gene.

Lista de gene comune dintre genele target ale hsa-miR-124-3 și genele cu expresie crescută din setul de date GSE138206 a generat o imagine PPI caracterizată din 266 noduri, 562 capete de rețea. În acest caz valoarea p a fost sub $1.0e-16$. Coeficientul mediu de clustering local al rețelei este de 0,359 cu un grad mediu de nod de 4,23. Analiză clusterelor folosind metoda MCL (Markov Cluster Algorithm) a condus la identificarea a trei clusterare îmbogățite funcțional în căile KEGG. Clusterul 1 este îmbogățit în gene implicate în infecții virale, clusterul 2 în gene implicate în digestia și adsorbția proteinelor, în calea de interacțiune cu receptorilor ECM și în căile de semnalizare AGE-RAGE, iar clusterul 3 în gene implicate în căile de semnalizare AGE-RAGE, în mecanismul de interacțiune a receptorilor ECM și în căile de semnalizare asociate cu cancerul.

În cazul has-miR-769 și genele cu expresie crescută din setul de date GSE138206 rețeaua de interacțiuni proteină –proteină prezintă 290 noduri, 581 capete de rețea. Valoarea p fiind mai mică de $1.0e-16$. Analiza acestei rețele cu ajutorul metodei MCL a evidențiat, de asemenea, trei clusterare îmbogățite funcțional în căile KEGG. Clusterul 1 este îmbogățit în gene implicate în infecții virale, clusterul 2 în gene implicate în digestia și adsorbția proteinelor, în calea de interacțiune cu receptorii ECM și în adeziunea focală, iar clusterul 3 în gene implicate în calea de semnalizare p53. Datorită numărului redus de gene comune găsite între genele target ale has-miR-4500 și genele cu expresie genică diferențiată din setul de date GSE138206 rețeaua de interacțiuni proteină-proteină nu prezintă semnificație statistică.

Compararea calupului de gene specifice hsa-miR-24-1 și hsa-miR-4500 cu setul de gene cu expresie redusă din datele GSE138206 a generat o rețeaua de interacțiuni proteină – proteină cu 290 de noduri, 95 de capete de rețea și o valoare p de $7.46e-12$. În acest caz analiză funcțională KEGG a relevat doar un mecanism biologic semnificativ și anume metabolismul beta-Alaninei (FDR de 0.03).

Rețeaua de interacțiuni proteină-proteină în cazul calupului format de genele target specifice hsa-miR124-3, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500 împreună comparativ cu genele cu expresie genică crescută din setul de date GSE138206 prezintă 319 noduri, 816 capete de rețea cu valoarea p mai mică decât $1.0e-16$. Analiza funcțională KEGG a relevat un număr de 36 mecanisme fiziologice semnificative în care sunt implicate aceste gene, cel mai semnificativ fiind mecanismul de interacțiune a receptorilor matricei extracelulare.

4.4. DISCUȚII

Cu toate că este cea mai frecventă formă de cancer oral, carcinomul scuamocelular prezintă încă multe incertitudini cu privire la mecanismele epigenetice implicate în inițierea, dezvoltarea, invazia tumorală, tratamentul, evoluția și prognosticul său.

În acest studiu am analizat profilul metilării globale în cazul CSCO în vederea depistării de loci CpG asociați cu microARN ce prezintă schimbări ale statusului de metilare. Această investigație a dus la depistarea a patru microARN (hsa-miR-24-1, hsa-miR-124-3, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500) ce prezentau hipermetilare la nivelul mai multor loci CpG în probele de CSCO față de țesutul normal adiacent. În CSCO, hsa-miR-24 este asociat cu proliferarea, migrarea și invazia tumorală. Din studiile anterioare s-a constatat că hsa-miR-24 este prezent nu doar în țesutul tumoral ci și în salivă, serul și plasmă pacienților cu CSCO, ceea ce îl face un posibil biomarker pentru predicția și diagnosticarea cancerului oral.

Și în cazul hsa-miR-124-3, putem spune că rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele din literatură deoarece hsa-miR-124-3 a fost detectat ca având expresie genică scăzută în cazul CSCO atât pe linii celulare cât și pe model animal. Rezultatele analizei funcționale KEGG au relevat, în cazul clusterului 1, pe lângă cele mai cunoscute infecții

virale HPV, EBV și HSV și hepatita C, hepatita B precum și Influenza A. Hepatita C este implicată în apariția unor afecțiuni orale considerate a fi factori de risc în patologia CSC oral (inflamații cronice și lichen plan). În cazul clusterului 2 rezultat acestui studiu confirmă concluziile studiilor anterioare efectuate pe linii celulare care susțin că în cazul CSCO hsa-miR-124-3 suprimă prin acțiune directă expresia ITGB19 (integrin subunit beta 1), considerat a fi un factor cheie în modularea mecanismul de interacțiune a receptorilor matricei extracelulare.

În cazul hsa-miR-769 cele mai semnificative din clusterul 1 sunt infecția EBV, hepatita C și Influenza A. Pe lângă infecțiile virale un alt mecanism comun celor două miARN este mecanismul de interacțiune a receptorilor ECM. Acest rezultat este în concordanță cu cercetările lui Zhang et al., ce a relevat, cu ajutorul metodei "attract", că mecanismul de interacțiune a receptorilor ECM poate juca un rol semnificativ în dezvoltarea CSCO. Un alt mecanism este cel al căii de semnalizare AGE-RAGE. Un rol special al RAGE în patogeneza CSCO a fost demonstrat într-un studiu in vitro, în care s-a arătat că acest receptor este activat datorită secreției paracrine de High-mobility group box 1 (HMGB1) de către celulele CSC oral. Această activare intensifică progresia tumorală și declanșează distrugerea osoasă.

În ceea ce privește al patrulea microARN identificat în acest studiu nu există, deocamdată, nici o informație cu privire la expresia lui în CSCO.

Făcând analiza funcțională KEGG a tuturor genelor target specifice hsa-miR-124-3, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500 comparativ cu genele cu expresie crescută din setul de date GSE138206 am constatat că, din nou, cel mai semnificativ este mecanismul de interacțiune a receptorilor matricei extracelulare (FDR= 6.98e-09). În schimb analiză funcțională KEGG pentru genele comune ale hsa-miR-24-1, hsa-miR-4500 și genele cu expresie scăzută din setul de date GSE138206 a relevat doar un mecanism semnificativ: metabolismul beta-Alaninei. Alanina a fost detectată atât în salivă cât și în țesutul tumoral al pacienților cu CSC al capului și gâtului sugerând posibilitatea utilizării lui ca biomarker non-invaziv.

4.5. CONCLUZII

În acest studiu am identificat 4 microARN: hsa-miR-24-1, hsa-miR-124-3, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500 cu metilare diferențiată în probele de CSCO versus țesutul normal. Deși toate microARN au fost hipermetilate, localizarea insulelor CpG ce au determinat această hipermetilare poate explica corelația pozitivă cu expresia genică în cazul hsa-miR-24-1 sau corelația negativă cu expresia genică în cazul hsa-miR-124-3, hsa-miR-769.

Explorarea mecanismelor funcționale în care sunt implicate genele target ale miARN identificate a relevat implicarea lor în infecții virale, în mecanismul de interacțiune a receptorilor matricei extracelulare și în calea de semnalizare AGE-RAGE. Pe lângă aceste mecanisme explorarea mecanismelor funcționale ale genelor target în cazul hsa-miR-24-1 și hsa-miR-4500 a relevat implicarea lor în metabolismul beta-alaninei.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Scopul acestui studiu a fost acela de a investiga rolul fumatului în declanșarea procesului tumoral prin identificarea posibilelor modificări epigenetice la nivelul ADN-ului din celulă epitelială orală care ar putea fi cauzate de tutun, precum și identificarea și evaluarea markerilor epigenetici implicați în patologia carcinomului cu celule scuamoase al cavității bucale.

În acest studiu, am observat că,

- în ceea ce privește pacienții fumători, există o modificare atât a nivelului global de metilare, cât și a nivelului global de hidroximetilare
- nivelul de metilare este mai scăzut la fumători și foști fumători față de nefumători

- scăderea nivelului de metilare a fost mai pronunțată la foștii fumători
- exista o creștere semnificativă (de două ori) a nivelului global de metilare la fumătorii care fumau peste 20 țigări pe zi față de fumătorii care fumau sub 20 țigări pe zi
- nivelul global de metilare a fost mai mare la cei care fumau de peste 20 ani
- nivelul global al hidroximetilării ADN-ului este considerabil mai scăzut decât al metilării ADN-ului.
- fumătorii au avut un nivel semnificativ redus (de două ori) al hidroximetilării globale a ADN-ului în comparație cu nefumătorii
- modificările procentului de metilare pot fi influențate de vârsta pacientului, în timp ce în cazul hidroximetilării această influență este nulă.

Pentru a avea rezultate cât mai concludente, am utilizat numai celule epiteliale recoltate din mucoasa jugală și am folosit metoda fluorometrică ELISA, o metodă mult mai sensibilă de detectare a nivelurilor de 5-mc și 5-hmc. Comparând rezultatele noastre cu cele ale studiilor anterioare, am observat că, datorită caracteristicilor probelor, a metodei de recoltare, precum și a metodei de analiză, utilizate în acest studiu, am detectat un nivel mai adecvat de 5-mc și 5-hmc în celulele epiteliale bucale.

Investigarea profilului de metilare la nivelul întregului genom în eșantioanele de cancer față de țesutul normal adiacent, utilizând Infinium 450K array-based Methylation Assay, a evidențiat 1468 loci cu diferențe semnificative în ceea ce privește modelul de metilare între eșantioanele de cancer și cele de țesut normal adiacent (valoare p ajustată $\leq 0,05$). Distribuția acestor regiuni metilate diferențiat este variată, fiind localizate atât la nivel genic (TSS 200 și TSS 1500, 5'UTR, primul exon, corpul, 3'UTR) cât și la nivel intergenic. Am observat, de asemenea, că loci care prezintă modificări ale stării de metilare sunt distribuiți pe toți cromozomii.

Investigarea profilului global de metilare în CSCO ne-a permis să detectăm patru microARN-uri (hsa-miR-24-1, hsa-miR-124-3, hsa-miR-769 și hsa-miR-4500) care prezintă hipermetilare la nivelul mai multor loci CpG în probele CSCO în comparație cu țesutul normal adiacent. În cadrul microARN, loci sunt poziționați în cea mai mare parte la nivelul promotorului (regiuni TSS) dar și la nivel 3'UTR.

În ceea ce privește microARN-urile detectate am observant că:

- hsa-miR-4500 este prima dată când a fost detectat în probele de cancer CSCO
- hsa-miR-24-1 a fost propus ca marker epigenetic în CSCO.

Analiza bioinformatică făcută în acest studiu sugerează că influența metilării asupra expresiei genice a acestor microARN ar putea avea un impact semnificativ în căile de răspuns la infecțiile virale, în mecanismul de interacțiune a receptorilor matricei extracelulare, digestia și absorbția proteinelor și în calea de semnalizare AGE-RAGE, care ar putea fi relevante pentru dezvoltarea, progresia și patogeneza CSCO.

Acesta este primul studiu realizat în România care investighează markerii epigenetici în patologia CSCO și influența factorilor de mediu asupra epigenomului din mucoasa orală.

Consider că atât pentru a înțelege etiopatogenia CSCO și cât pentru a găsi o metodă de prevenire și eradicare a acestui neoplasm sunt necesare mai multe studii.

Ca direcții de cercetare, pot spune că sunt indicate studii suplimentare pentru a:

- valida influența fumatului asupra metilării și hidroximetilării globale a ADN-ului
- valida implicarea hsa-miR-4500 în patologia CSCO
- clarifica corelația dintre expresia genică și statusul de metilare a hsa-miR-24-1, hsa-miR-124-3 și hsa-miR-769 în probele de CSCO.