

# PROCEDEU DE PROGNOZARE A RISCULUI DE DEZVOLTARE A CANCERULUI GLANDEI TIROIDE\*

*Dr. Victor POPESCU*  
*USMF „Nicolae Testemițanu”*

*PROCEDURE FOR THE PROGNOSIS OF  
THYROID CANCER PROGRESSION RISK – THE  
INNOVATION OF 2012 YEAR IN THE REPUBLIC  
OF MOLDOVA*

In this study we have obtained some methylation profiles in DNA extracted from normal tissue and thyroid malignant tumors (various morphologic subtypes). We have identified differences in the methylation profile of *p15* gene promoter of the thyroid tumors compared with the profile of normal thyroid cells (peritumoral tissue). In conclusion we sustain that MM methylation profile of *p15* gene promoter can be used as a molecular marker for the examined person who is at risk with thyroid cancer development referring the day of sample collection.

*Key-words:* tumor-suppressor genes, methylation specific polymerase chain reaction, genetic prognostics, high-risk with cancer development.

## Introducere

Datele din literatura de specialitate atestă faptul că genele tumor-supresoare se caracterizează adeseori printr-un grad avansat al metilării la nivelul promotorilor în neoplazmele umane, fenomen ce corelează cu inactivarea genelor date prin diminuarea sau stoparea transcripției acestor gene în celulele preneoplazice și în cele maligne [1].

Promotorul genei *p15* (denumirea oficială – *CDKN2B*), poziționată în locusul cromozomial 9p21, la fel se caracterizează adeseori printr-un grad avansat al metilării, în special, în neoplazmele hematopoietice umane. A fost stabilită, inclusiv, corelația între hipermetilarea promotorilor genelor *p15* și *p16* situate adiacent [2].

Între profilurile metilice ale tumorilor din diferite stadii nu au fost găsite diferențe semnificative, sugerându-se că alterările epigenetice au loc în stadiile precoce ale dezvoltării cancerului sau în momentul inițierii tumorilor [3].

Dereglarea unor căi semnalizatoare moleculare,

\* Elaborarea a fost desemnată drept *Inovația anului 2012*



precum *Rb/p16* și *p53/p14/MDM2* sau altele, pot fi cauza creșterii neoplazice.

## Scopul studiului

Compararea particularităților profilurilor metilice ale promotorului genei *p15* în țesutul normal al glandei tiroide și în tumori maligne tiroidiene, în vederea stabilirii unor markeri moleculari noi de prognozare a cancerului tiroidian.

## Materiale și metode

În acest studiu a fost investigat un grup de 50 de persoane afectate de cancer tiroidian (tumori maligne din diverse subtipuri morfologice: carcinom medular, folicular, papilar), fiind, anterior, diagnosticate primar și internate în Secția Tumori cap și gât a Institutului Oncologic din Republica Moldova.

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

## Descrierea succintă a inovației

În anul 2010, elaborarea intitulată „Procedeu de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide” a fost brevetată la Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală din Republica Moldova, brevet de invenție nr. MD-4038. Esența procedurii propus de noi constă în identificarea profilurilor metilice ale genei *p15* în ADN-ul din fragmentele tumorilor maligne și evidențierea particularităților acestor profiluri în raport cu cele ale țesutului normal peritumoral.

Procedeu se efectuează în modul următor:

1. Prelevarea fragmentelor din glanda tiroidă (fragment din țesutul normal al glandei tiroide și, separat, din tumori maligne);

2. Extracția ADN-ului genomic uman din fragmentele glandei tiroide;
3. Modificarea ADN-ului prin conversia citozinei în uracil;
4. Amplificarea ADN-ului modificat prin MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) la nivelul promotorului genei *p15*;
5. Vizualizarea și analiza produșilor de amplificare (fig. 1A, fig. 1B);
6. Formularea concluziilor.

În urma analizei profilurilor electroforetice, cu ajutorul transiluminatorului, la lumină ultravioletă (lungimea de undă 302 nm), am constatat că fragmentele de țesut normal ale glandei tiroide au prezentat, concomitent, atât banda U (produs al reacției de amplificare corespunzătoare ADN-ului nemetilat, la nivelul promotorului genei *p15*), cât și banda M (produs al reacției de amplificare corespunzătoare ADN-ului metilat, la nivelul promotorului genei *p15*), adică profilul UM, în toate speci-menele analizate (fig. 1A).

Fragmentele din tumorile maligne ale glandei tiroide au prezentat numai banda M (produs al reacției de amplificare corespunzătoare ADN-ului metilat, la nivelul promotorului genei *p15*), adică profilul MM, în toate speci-menele analizate, fapt ce semnifică starea metilată a ambelor alele în toate ceelele probei biologice analizate (fig. 1B).

### Concluzie

Prin urmare, dacă în gelul de electroforeză se vizualizează doar banda de amplificare corespunzătoare ADN-ului metilat la nivelul promotorului genei *p15* – se atestă risc de dezvoltare a cancerului glandei tiroide (cu referire la data prelevării probei biologice), iar dacă gelul de electroforeză conține atât banda de amplificare corespunzătoare ADN-ului metilat la nivelul promotorului genei *p15*, cât și banda de amplificare a ADN-ului nemetilat – nu se

stabilește risc de cancer al glandei tiroide (cu referire la data prelevării probei biologice).

### Domeniul de aplicare și necesitatea implementării inovației în Republica Moldova

Invenția se referă la medicina preventivă și poate fi aplicată pentru identificarea presimptomatică și prevenirea cancerului tiroidian.

Beneficiarii ai acestui procedeu nou sunt:

1. Pacienții cu status postoperatoriu al cancerului glandei tiroide, în special cu istoric de cancer tiroidian, cărora li se indică investigația de laborator de referință elaborată de savanții noștri în vederea prevenirii în timp rezonabil a unor potențiale recidive ale bolii și în scop de profilaxie diferențiată și individualizată.

2. Persoane sănătoase, în vederea prevenirii și identificării presimptomatice a potențialelor transformări maligne la nivelul glandei tiroide (cu condiția confirmării datelor din literatura de specialitate [1, 4] privind prezența în serul/plasma sanguină a ADN-ului metilat circulant și constituirea protocolului noninvaziv de prelevare a materialului biologic).

### Indicații

Investigația de referință efectuată în laborator este indicată cu frecvența de cel puțin 2 ori pe an pentru una și aceeași persoană, ceea ce asigură o adresabilitate continuă pentru acest serviciu de laborator.

### Investiții necesare și rentabilitatea acestora pentru implementarea inovației

Investițiile necesare pentru implementarea invenției cuprind: fondurile fixe – circa 12 000 Euro, plus cheltuielile curente.

### Avantajul inovației prezentate față de produsele existente pe piață

Este cunoscut procedeuul *Real-Time Quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*

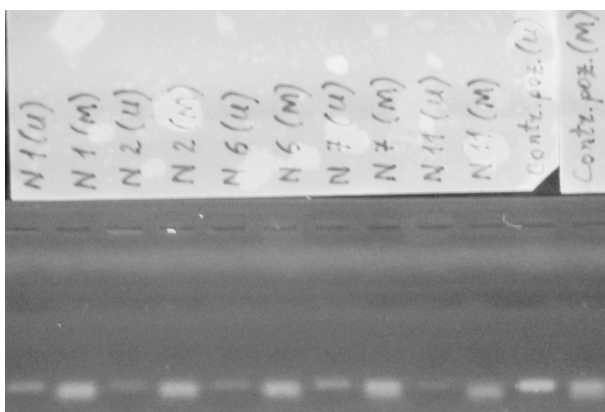


Figura 1A. Profiluri metilice la nivelul ADN-ului din țesutul normal peritumoral al glandei tiroide (original)

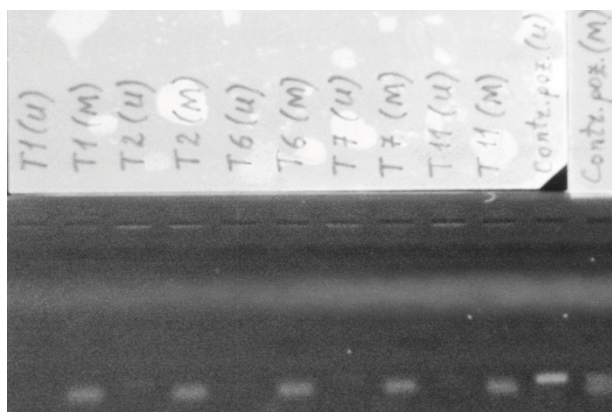


Figura 1B. Profiluri metilice la nivelul ADN-ului din tumori maligne ale glandei tiroide (original)

(*Real-Time QMSP*), descris de către Hoque M. și colaboratorii săi în anul 2005, care include obținerea profilurilor metilice ale genelor umane *Rassf1A*, *TSHR*, *RaRβ2*, *DAPK*, *S100*, *p16*, *CDH1*, *CALCA*, *TIMP3*, *TGF-β* și *GSTpi*, publicat în același an în revista „The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism” [5].

Dezavantajele procedurii elaborat de Hoque M. și colaboratorii săi [5] constau în următoarele: este nespecific (nu caracterizează strict ADN-ul din fragmentele tumorilor maligne în raport cu ADN-ul din țesutul normal peritumoral) și redundant (presupune obținerea concomitentă a profilurilor metilice ale câtorva gene umane *Rassf1A*, *TSHR*, *RaRβ2*, *DAPK*, *S100*, *p16*, *CDH1*, *CALCA*, *TIMP3*, *TGF-β* și *GSTpi*, adică 11 gene = un criteriu diagnostic).

Procedul propus de noi se caracterizează prin următoarele avantaje:

1. Este specific (caracterizează nemijlocit ADN-ul din fragmentele tumorilor maligne în raport cu ADN-ul din țesutul normal peritumoral);
2. Sensibil (țesutul de analizat este suficient în limitele a 100 mg);
3. Nonredundant (o genă = un criteriu diagnostic).



Eudochia Zavtur. *Flori și pere*. 2010, 400x400, u/p

### Distincții obținute

În perioada 2011-2012, elaborarea „Procedeu de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide” a fost distinsă cu 4 medalii și anume:

1. Medalie de aur. Expoziția Internațională de Inventică – *INVENTICA-2011*, Iași, 8-10 iunie 2011.
2. Medalie de argint. VII Международный салон изобретений и новых технологий *НОВОЕ ВРЕМЯ*, Севастополь, 22-24 septembrie 2011.
3. Medalie de argint. Expoziția Internațională Specializată de Inventică *INFOINVENT- 2011*, Chișinău, 22-25 noiembrie 2011.
4. Medalie de argint. Expoziția Internațională Specializată de Inventică *EUROINVENT- 2012*, Iași, 12 mai 2012.

În afară de aceste distincții, în cadrul Concursului național „Topul Inovațiilor”, ediția a IV-a, elaborarea dată a fost desemnată drept „INOVAȚIA ANULUI 2012”.

Instituțiile organizatoare ale concursului au fost Academia de Științe a Moldovei, Agenția Pentru Inovare și Transfer Tehnologic, Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova, cărora le aducem sincere mulțumiri pentru susținerea permanentă, pentru munca zilnică asiduă alături de cercetători și calde felicitări pentru succesele frumoase în promovarea rezultatelor cercetărilor științifice autohtone atât pe plan național, cât și internațional!

### Bibliografie

1. Levenson V., Melnikov A. (2012) DNA Methylation as Clinically Useful Biomarkers - Light at the End of the Tunnel. *Pharmaceuticals*, 5, 94-113.
2. Gronbaek K., Nedergaard T. et al. (1998) 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* 12: pp. 1266-1271.
3. Costello J., Fruhwald M. et al. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 24: pp. 132-138.
4. Shuiying H., Marge E. et al. (2006) Detection of Serum Deoxyribonucleic Acid Methylation Markers: A Novel Diagnostic Tool for Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(1):98-104.
5. Hoque M., Rosenbaum E. et al. (2005) Quantitative assesment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(7): 4011-4018.