

**Institutul Național de Patologie**  
**„Victor Babeș”**



*Fondat în 1887*

*Tradiție, continuitate, inovație*



# **Epigenetica în patologiile umane: de la cercetare fundamentală la cercetare aplicată**

**Dr. Sevinci Pop**

# Outline

## I. Epigenetica- noțiuni introductive

- I.1 Mecanisme epigenetice
- I.2 Epigenom
- I.3 Controlul epigenetic al expresiei genelor
- I.4 Cercetarea fundamentală în domeniul epigeneticii
- I.5 Modificări Epigenetice-Boli cronice

## II. Cercetarea aplicată

Cum se pot evalua prin studii *in vitro* compuși biologic activi din dietă pentru stabilirea efectului biologic, inclusiv capacitatea de modulator epigenetic?

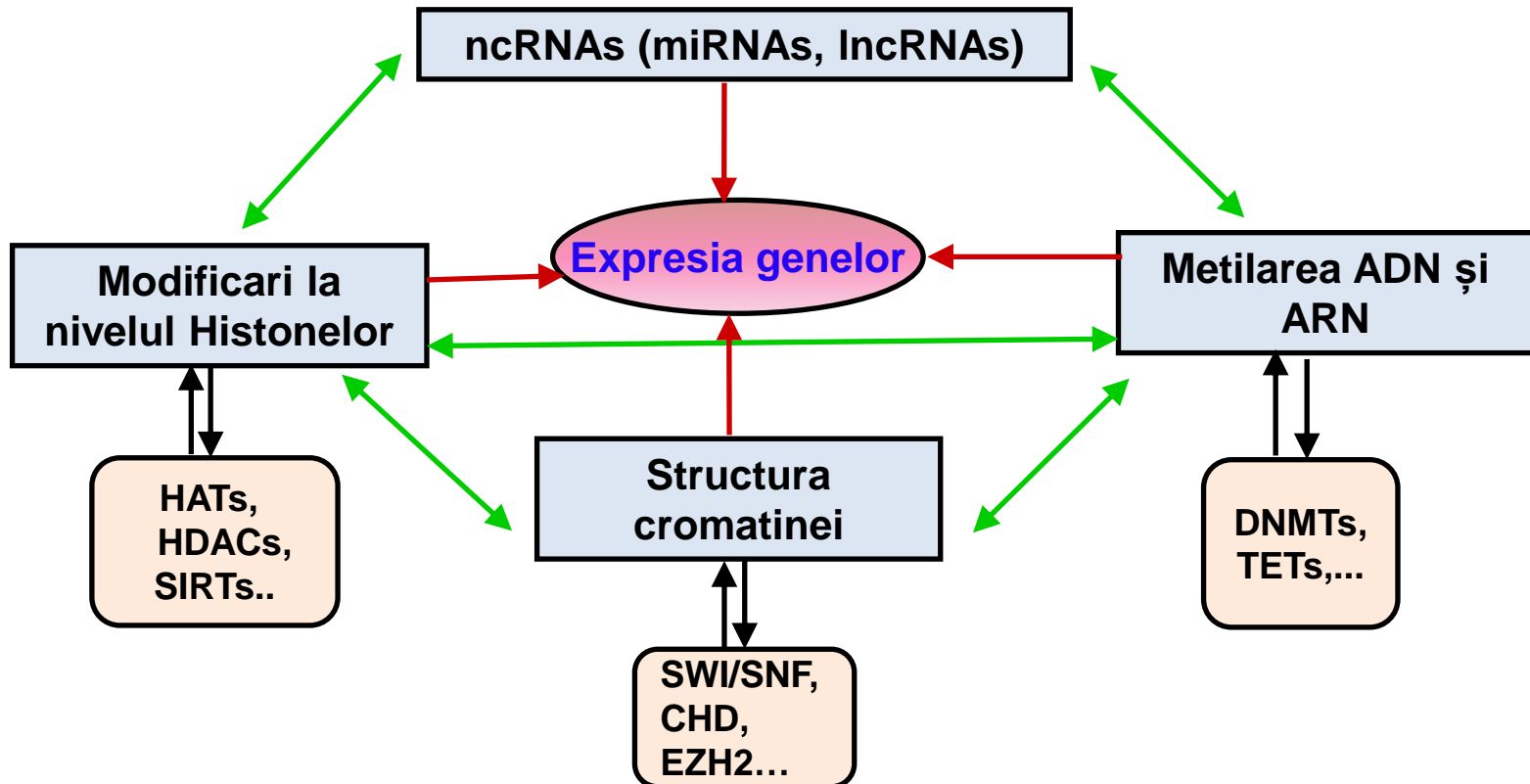
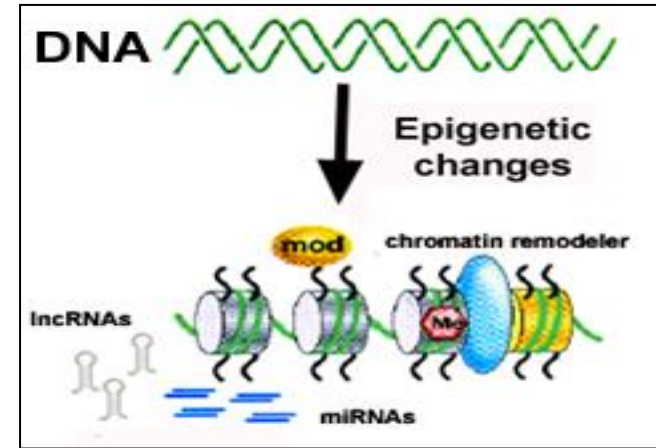
- II.1 Stabilirea obiectivelor generale într-un proiect de cercetare aplicată
- II.2 Stabilirea obiectivelor specifice
- II.3 Prezentarea datelor experimentale
- II.4 Concluzii

# I. EPIGENETICA

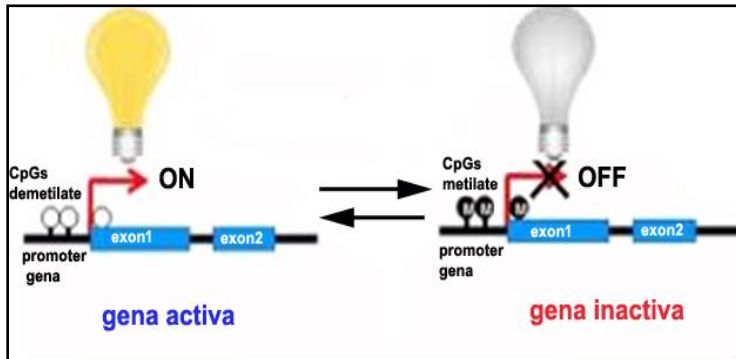
- **1942 Conrad Waddington** definește epigenetica - știința care studiază interacțiunea genelor cu mediul înconjurător pentru a crea fenotipul;
- ”**epi**” - peste/deasupra”-**genetics**”, explică procesul de diferențiere celulară ce apare în natură;
- Studiază **mecanismele** de **reglare** a **activității** și **expresiei genelor**, **independent** de secvențele de ADN.
- Genomul uman conține **~25 000 de gene**, care nu se exprimă în același timp. **Mecanismele epigenetice** controlează expresia genelor în **timp** și **spațiu**, realizează reglajul fin al expresiei acestora.
- Explică diferențele dintre indivizi cu **genom identic** dar cu **fenotip diferit**.

# I.1 Mecanisme epigenetice

- Metilarea ADN-ului și a ARN-ului
- Modificarile post-translacionale la nivelul histonelor
- Expresia non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs)
- Remodelarea cromatinei



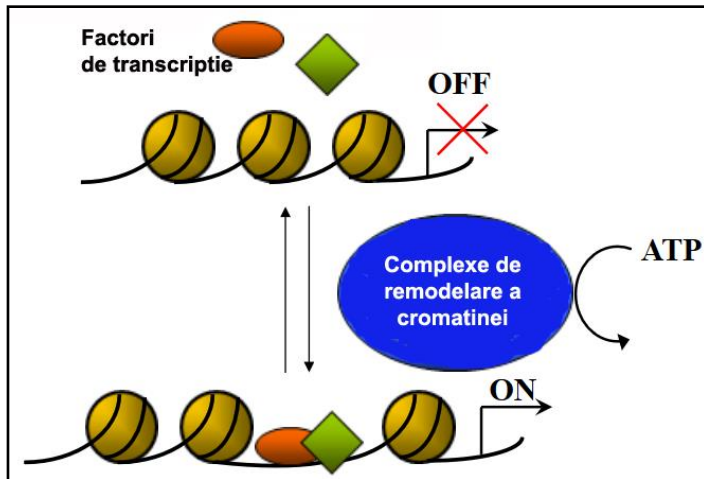
## Metilarea ADN-ului



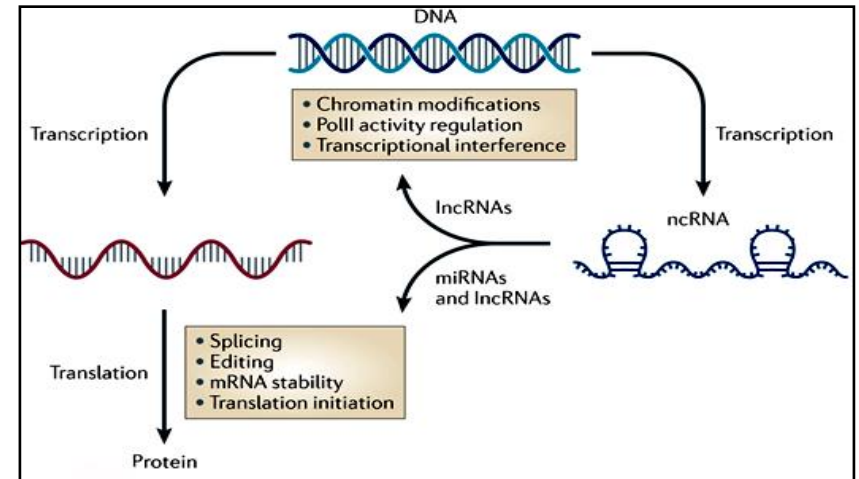
## Modificările post-translazionale ale Histoneilor

Modification	Role in transcription	Modification site
Acetylation	Activation	H3(K9, K14, K18, K56). H4(K5, K8, K12, K16). H2B(K6, K7, K16, K17) (Strahl and Allis, 2000).
Methylation	Activation	H3(K4me2, K4me3, K36me3, K79me2) (Strahl and Allis, 2000)
Methylation	Repression	H3(K9me3, K27me3) and H4(K20me3) (Balazs, 2014).
Phosphorylation	Activation	H3(S10) (Strahl and Allis, 2000)

## Remodelarea cromatinei



## Expresia non-coding ARN-urilor



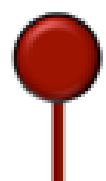
**GENOM:** materialul genetic -1% protein-coding DNA și 99% non-coding DNA.

**EPIGENOM:** include informațiile adiționale privind **MOMENTUL**, **MODUL** și **LOCUL** în care materialul genetic va fi procesat

## EPIgenetic code -EPIGENOME

hundreds of proteins and chemical modifications

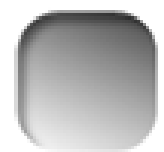
Cytosine modifications



Histone modifications



Writer/Reader/Eraser proteins

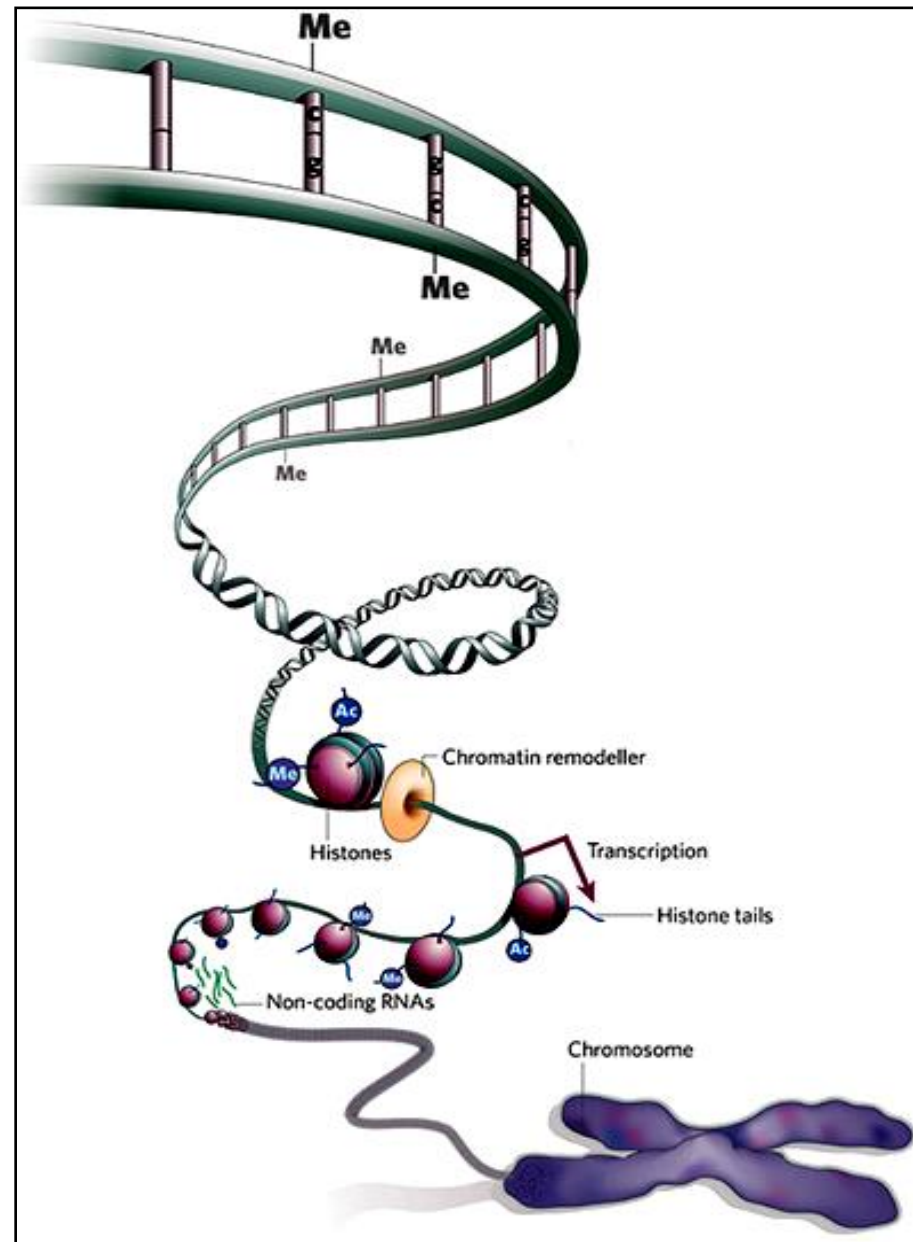


....ACGT....TCGCCAA....ATCG....ATACGTT...

**Genetic code: 4 nucleotides**

## I.2 EPIGENOMUL

- Catalog al modificărilor epigenetice care există la nivelul cromatinei;
- Prezintă **specificitate celulară** și de **țesut**; reflectă starea biologică care definește potențialul de transcripție;
- **Evoluează** și se **modifică continuu** începând cu dezvoltarea embrionară - procesul de îmbătrânire, ca răspuns la **factorii interni** și **externi**.



**Genomul rămâne în esență neschimbat în timpul vieții.**

# Componentele EPIGENOMULUI

A. Totalitatea modificărilor realizate prin atașare de **grupări chimice** sau proteine la secvențele de ADN, ARN sau histone

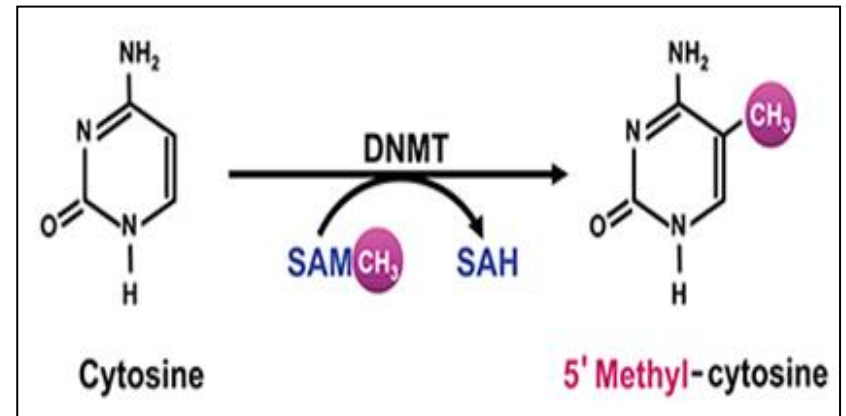
**- markeri epigenetici-**

- Metil: CH<sub>3</sub>-
- Hidroximetil: OH-CH<sub>2</sub>-
- Acetil: CH<sub>3</sub>CO-
- Fosfat: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>
- Proteina Ubiquitin  
MM=8.6 kDa

**ADN:** secvențele de tip CpG → **C<sup>5m</sup>pG**

5-metil citozina (**5mC**)

5-hidroximetil citozina (**5-hmC**)...

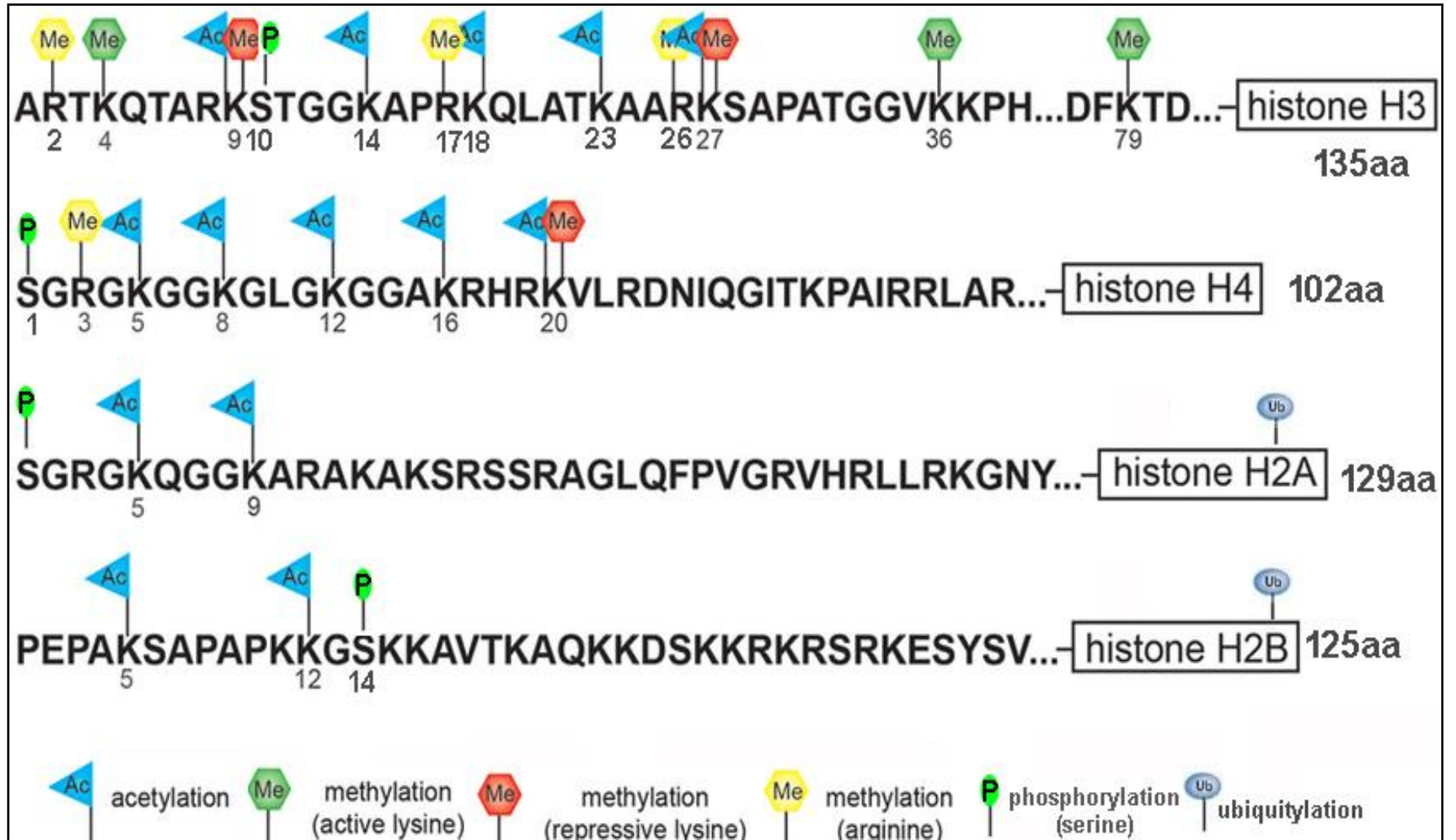


**ARN mesager :** N6 metil-Adenozina (**m6A**) ....



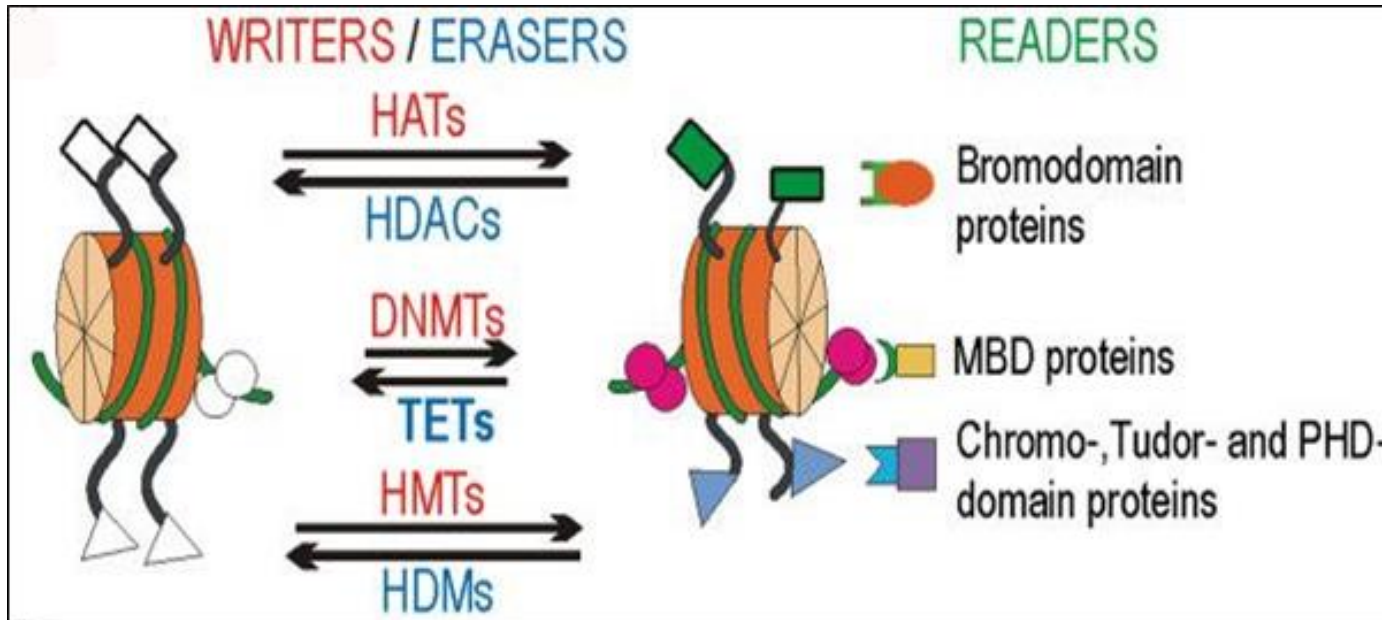
# Modificări post-tranlaționale la nivelul HISTONELOR:

- acetilarea la lizina din poziția 16 a histonei H4 (H4K16Ac), sau poziția 8 (H4K8Ac)...
- mono-, di-, tri metilare: (H4K20me, H4K20me2, H4K20me3); H3K27me3, H3K9me3...
- trimetilare și fosforilare: H3K27me3S10P....
- acetilare sau metilare la același rest de lizină: H3K9Ac sau H3K9me3

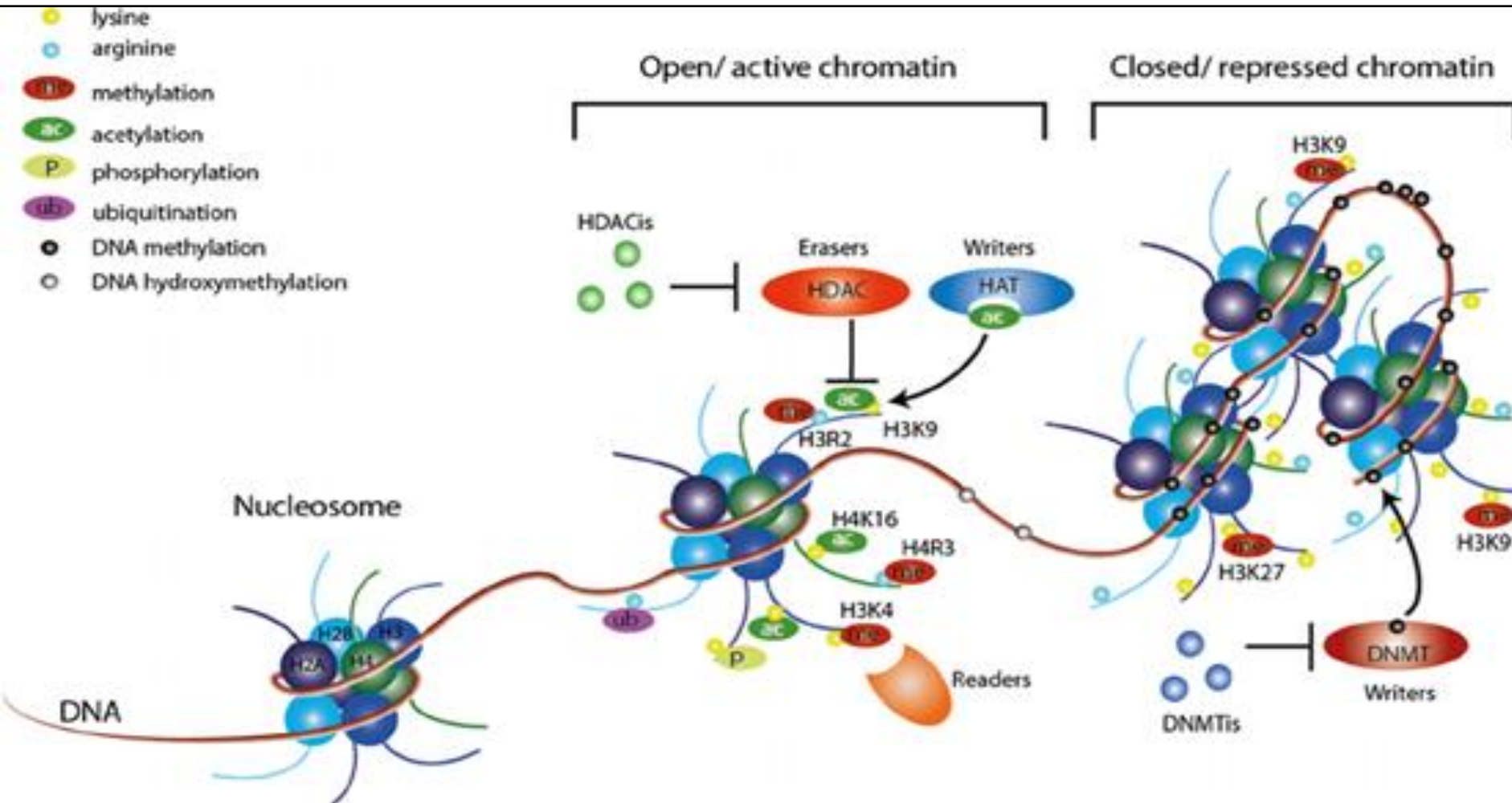


## B. Proteinele care reglează mecanismele epigenetice

- ~ 1000 proteine care controlează mecanismele epigenetice
- **‘WRITERS’** - modifică ADN-ul, histonele și ARNm prin adăugarea de grupări chimice (CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CO-) → **markeri epigenetici**
- **‘ERASERS’** - îndepărtează grupările chimice existente
- **‘READERS’** - recunosc markeri epigenetici specifici



# I.3 Controlul epigenetic al expresiei genelor

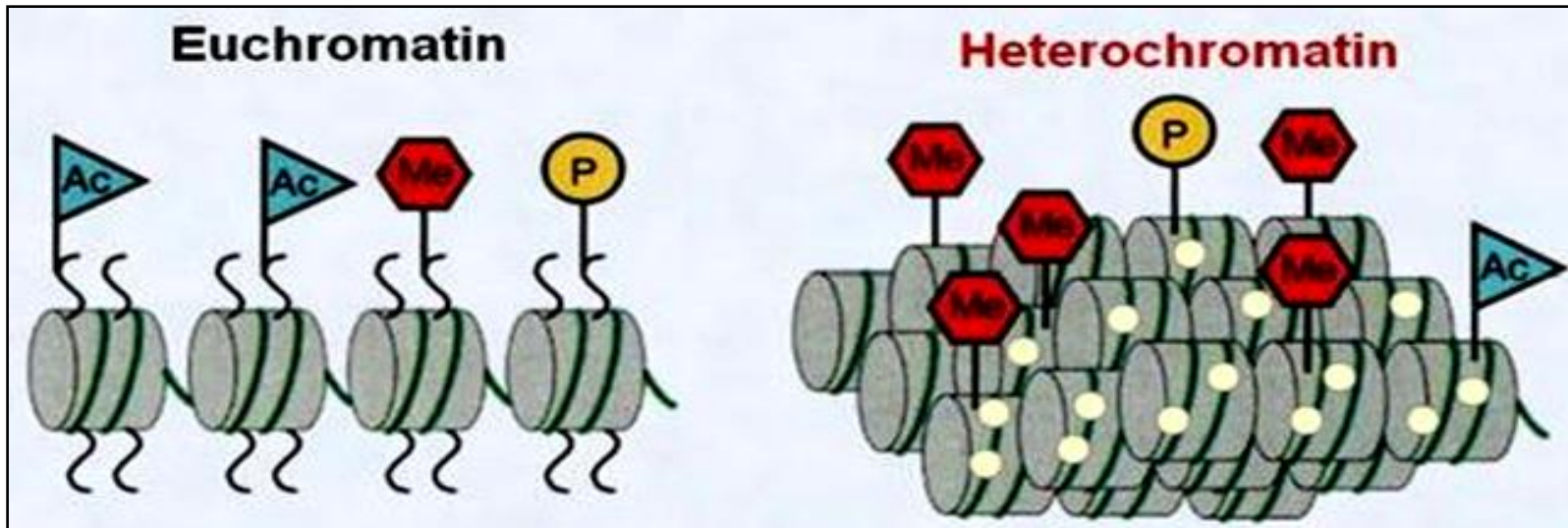


# Organizarea cromatinei

Metilarea ADN -ului și modificările histonelor pot organiza structura cromatinei în domenii cu potențial diferit de transcriere al genelor.

Cromatina Transcripțional  
**Activă**

Cromatina Transcripțional  
**Inactivă**

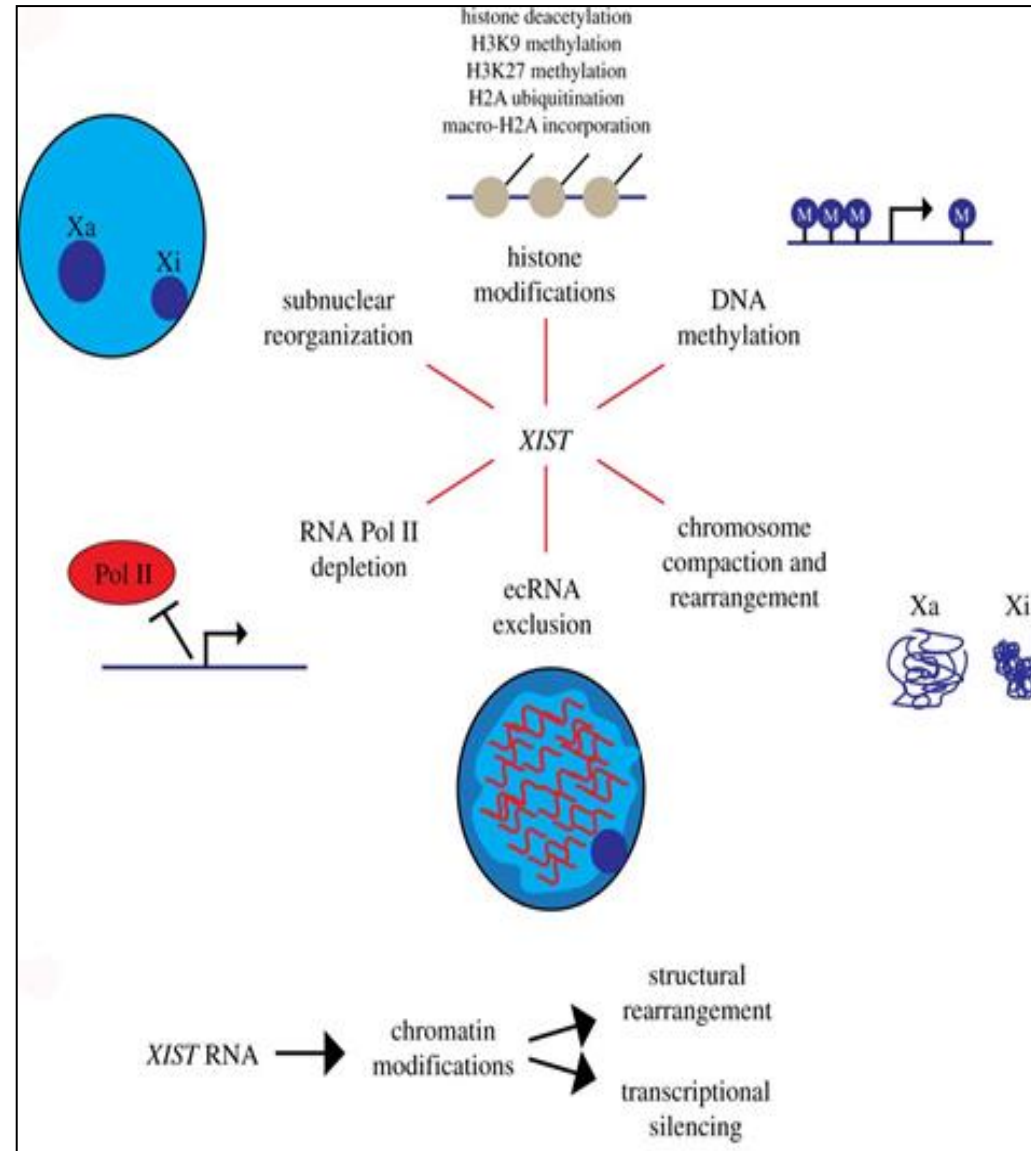


- **Hiper-acetilarea** histonelor H3 (K9, K27) și H4 (K8, K16)
- **Hipo-metilare a ADN** (CpG)
- trimetilarea la H3K4**me3**

- **Hipo-acetilarea** histonelor H3 și H4
- **Hiper-metilarea** ADN-ului (CpG)
- trimetilarea la H3K9**me3**

# Mecanisme epigenetice în dezvoltarea normală

- **Inactivarea cromozomului X** echilibrează expresia genelor dintre cele două sexe;
- **Ampretarea genomică** inactivare specifică a anumitor alele funcție de originea parentală. Acest proces este esențial pentru dezvoltarea embrionară;
- **Inactivarea elementelor repetitive din genom** menține structura și organizarea cromatinei, și implicit stabilitatea genomului.

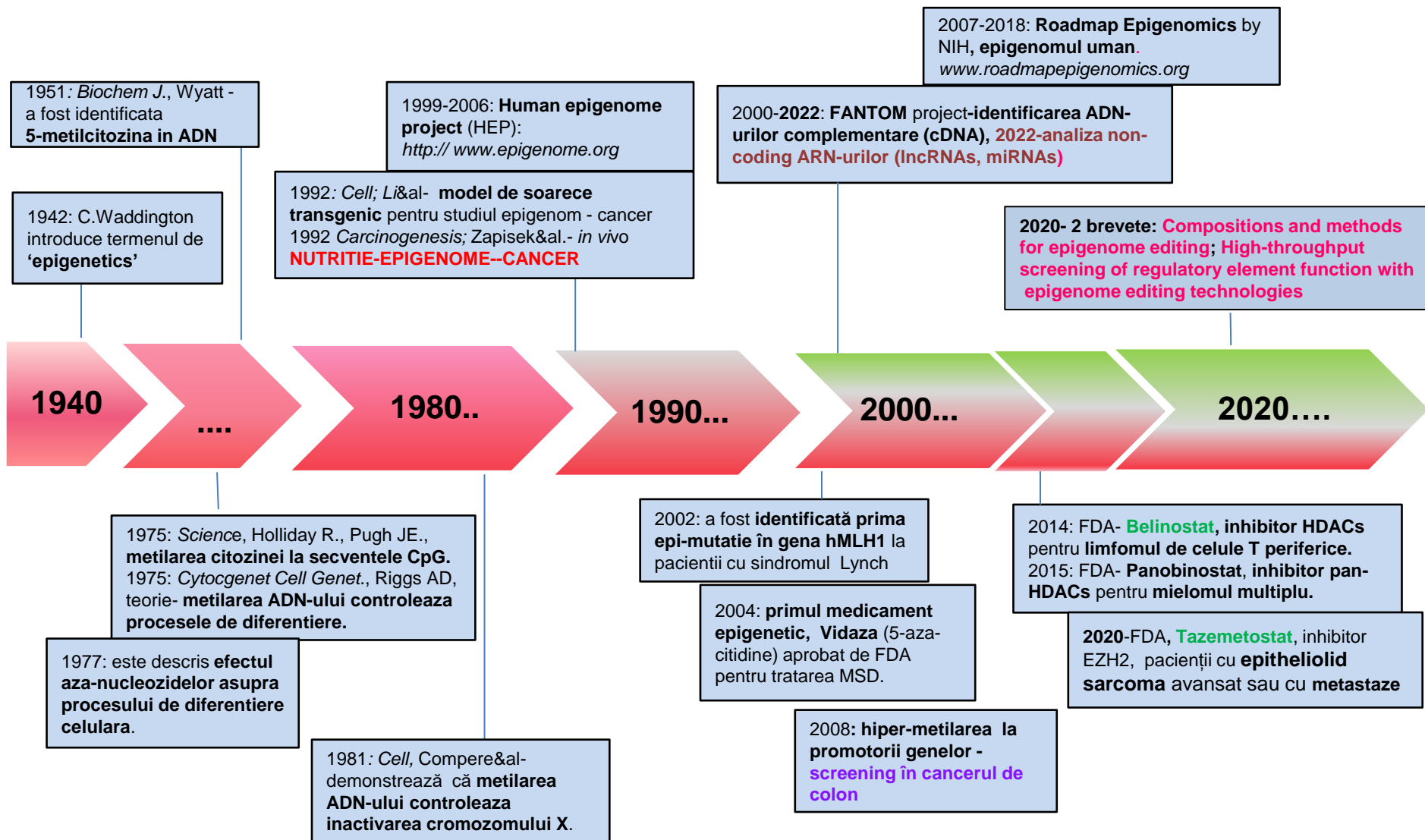


# Dezvoltarea domeniul EPIGENETICII

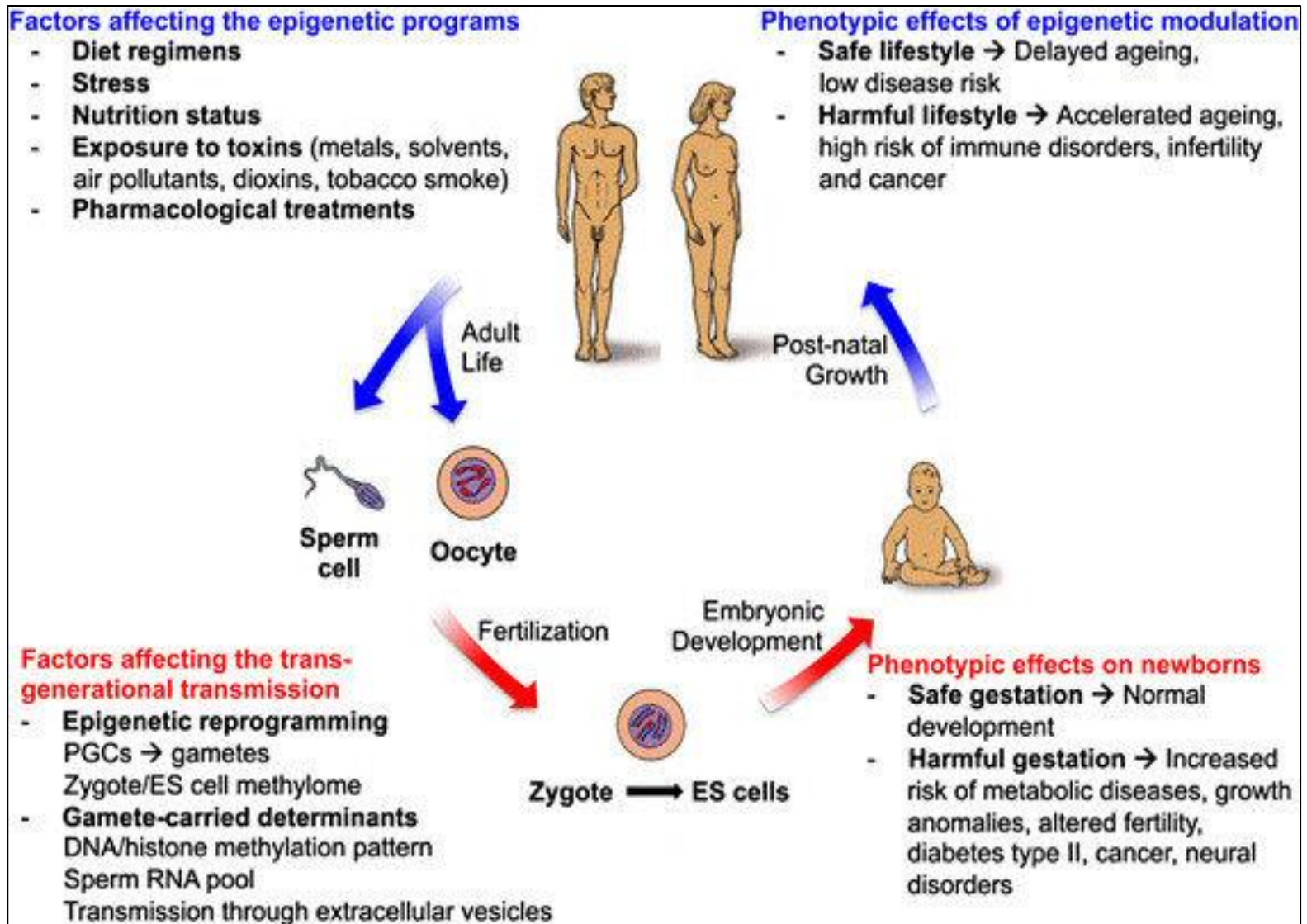
Cercetare fundamentală



Cercetare aplicată



# Factorii care induc modificări epigenetice -modulează epigenomul



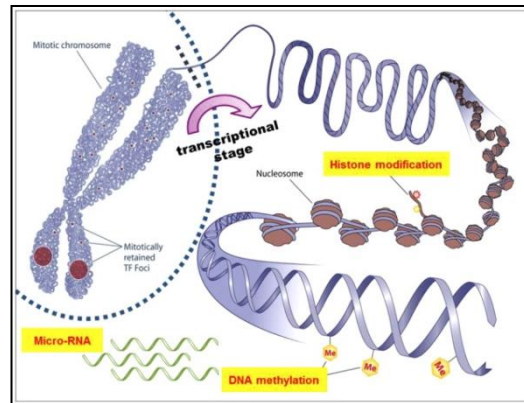
# I.4 Factorii de mediu-mecanisme epigenetice-genom

## Factori de mediu



- Poluarea
- Radiatiile
- **Dieta/nutriția**
- Fumatul
- Consumul de alcool
- Stresul
- Sedentarismul

## EPIGENETICA



## Genomul uman

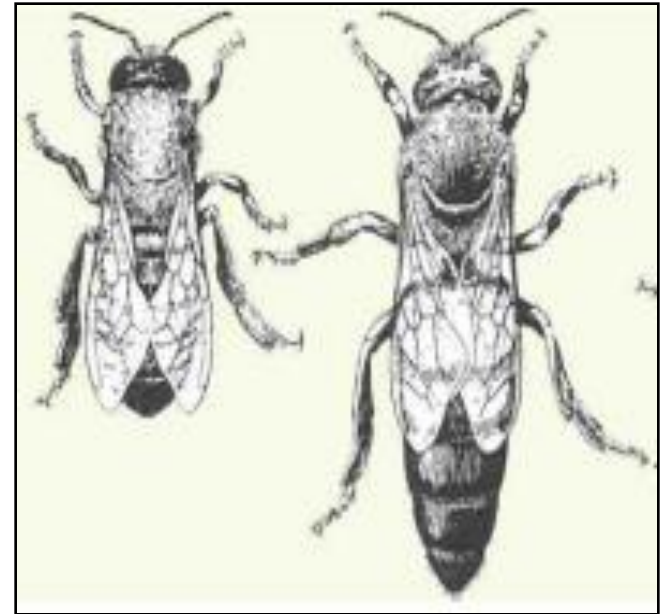


- activarea/inactivarea transcripției
- **mutații somatice**
- **translocări genice**
- **polimorfism**



# Diferențierea tipurilor de albine - Nutriție

- Populațiile de albine se diferențiază în albina-regină (matca) și albinele lucrătoare, cu caracteristici fenotipice diferite;
- Larvele sunt identice din punct de vedere genetic, dar hrana pe care o primesc este diferită;
- Matca este hrănită cu lăptișor de matcă și se dezvoltă complet diferit de albinele lucrătoare, hrănite cu miere;
- **Fenotipurile diferite** apărute datorită **nutriției diferite** sunt controlate de modificările epigenetice de la **nivelul ADN-ului genomic** și de la **nivelul histonelor**.

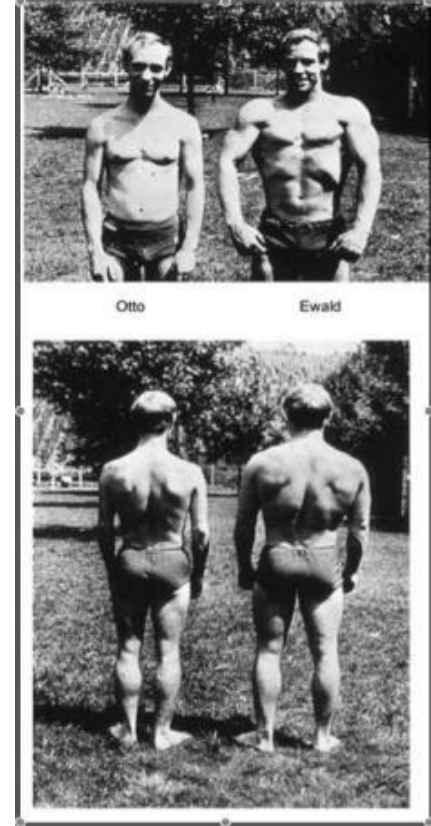


# Fenotipuri diferite la gemeni monoziagoți- Stil de viață diferit

Dezvoltarea diferită a gemenilor monoziagoți



Stil de viață adultă diferit



Genotip identic

Fenotip identic în copilărie

Fenotip diferit în viața adultă

# I.5 Modificări Epigenetice-Boli cronice

- Modificări ale markerilor epigenetici pot induce declanșarea și dezvoltarea afecțiunilor cronice: **cancer, boli imunologice, alergii, boli neurologice...**

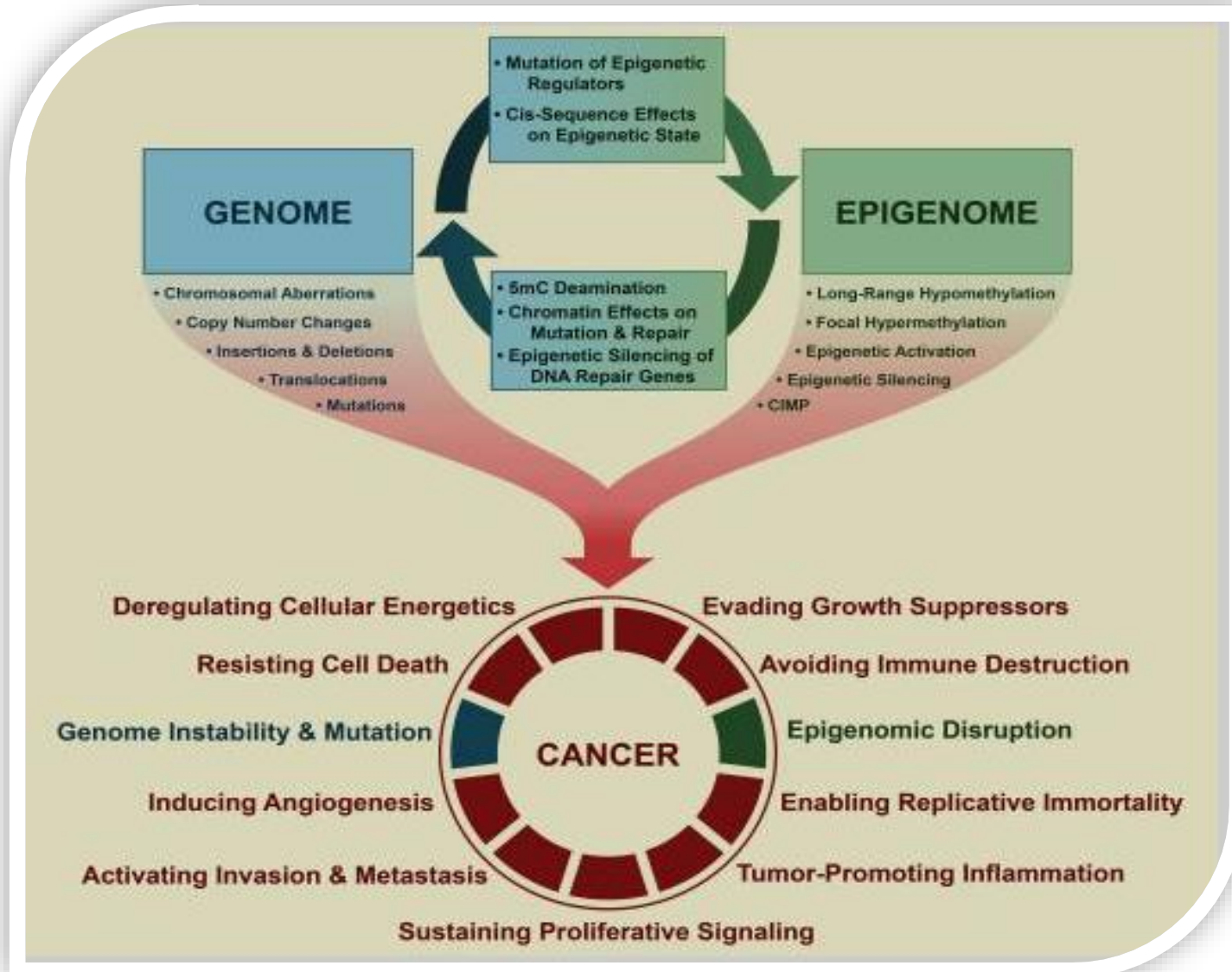
Disease	Symptom	Aetiology
ATR-X syndrome	Intellectual disabilities, $\alpha$ -thalassaemia	Mutations in <i>ATRX</i> gene, hypomethylation of certain repeat and satellite sequences
Fragile X syndrome	Chromosome instability, intellectual disabilities	Expansion and methylation of CGG repeat in <i>FMR1</i> 5' UTR, promoter methylation
ICF syndrome	Chromosome instability, immunodeficiency	<i>DNMT3b</i> mutations, DNA hypomethylation
Angelman's syndrome	Intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (maternal)
Prader-Willi syndrome	Obesity, intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (paternal)
BWS	Organ overgrowth	Deregulation of one or more imprinted genes at 11p15.5 (e.g. <i>IGF2</i> )
Rett syndrome	Intellectual disabilities	<i>MeCP2</i> mutations
$\alpha$ -Thalassaemia (one case)	Anaemia	Methylation of $\alpha 2$ -globin CpG island, deletion of <i>HBA1</i> and <i>HBQ1</i>
Various cancers	Microsatellite instability	<i>De novo</i> methylation of <i>MLH1</i>
	Disruption of Rb, p53 pathway, uncontrolled proliferation	<i>De novo</i> methylation of various gene promoters
	Disruption of SWI-SNF chromatin remodelling complex	Mutations in <i>SNF5</i> , <i>BRG1</i> , <i>BRM</i>
	Overexpression of <i>IGF2</i> , silencing of <i>CDKN1C</i>	Loss of imprinting
Leukaemia	Disturbed haematopoiesis	Chromosomal translocations involving HATs and HMTs
Rubinstein-Taybi syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in CREB-binding protein (histone acetylation)
Coffin-Lowry syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in <i>Rsk-2</i> (histone phosphorylation)

Egger, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02625>

- Unele **alterările** ale epigenomului sunt **reversibile**; deci ar putea fi eliminate în primele stadii ale bolii.

**Este posibil acum?**

# Carcinogeneza: interacție complexă dintre mutațiile genetice și alterările epigenetice care afectează procese celulare esențiale



# Biomarkeri epigenetici pentru diagnostic și prognostic în cancer

Diseases	Epigenetic biomarkers	Commercial tests	Technology for the analysis	Biospecimen	Sn (%)	Sp (%)
Colorectal cancer	DNA methylation ( <i>NDRG4</i> and <i>BMP3</i> )	<i>Cologuard® stool-DNA-based test</i>	Stool-based CRC test	Stool	92.3	86.6
	DNA methylation ( <i>SEPT9</i> )	<i>Epi proColon® 2.0 test</i>	MethyLight	CfDNA from blood	75-81	96-91
	DNA methylation ( <i>SDC2</i> )	<i>EarlyTect® CRC assay</i>	MethyLight	CfDNA from blood	87	95.2
	miR-31-3p	<i>miRPreDX-31-3p</i>	RT-qPCR	FFPE	NA	NA
Breast cancer	DNA methylation ( <i>PITX2</i> )	<i>Therascreen PITX2 RGQ PCR kit.</i>	MethyLight	FFPE; DNA from blood	NA	NA
Cervical cancer	DNA methylation ( <i>ZNF582</i> )	<i>Cervi-M® assay</i>	Methyl-specific PCR	Epithelial cells from cervical brush	73	80
Glioblastoma	DNA methylation ( <i>MGMT</i> )	<i>Therascreen MGMT Pyro Kit</i>	Pyrosequencing	FFPE, DNA from blood	95-97	NA
Lung cancer	DNA methylation ( <i>SHOX2</i> and <i>PTGER4</i> )	<i>Epi proLung BL Reflex Assay®</i>	Methyl-specific PCR	CfDNA from blood	78	96
Cancers of unknown origin	Analysis of 450K CpGs	<i>EPICUP™</i>	Human methylation Beadchip 450 K (Illumina)	FFPE	97.7	99.6

cfDNA, circulating cell-free DNA; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; Sn, Sensitivity; Sp, specificity; NA, data not available.

Beltran+Garcia et al., *Epigenetic IVD Tests for Personalized Precision Medicine in Cancer*, *Front. Genetics* 2019, doi.org/10.3389/fgene.2019.00621

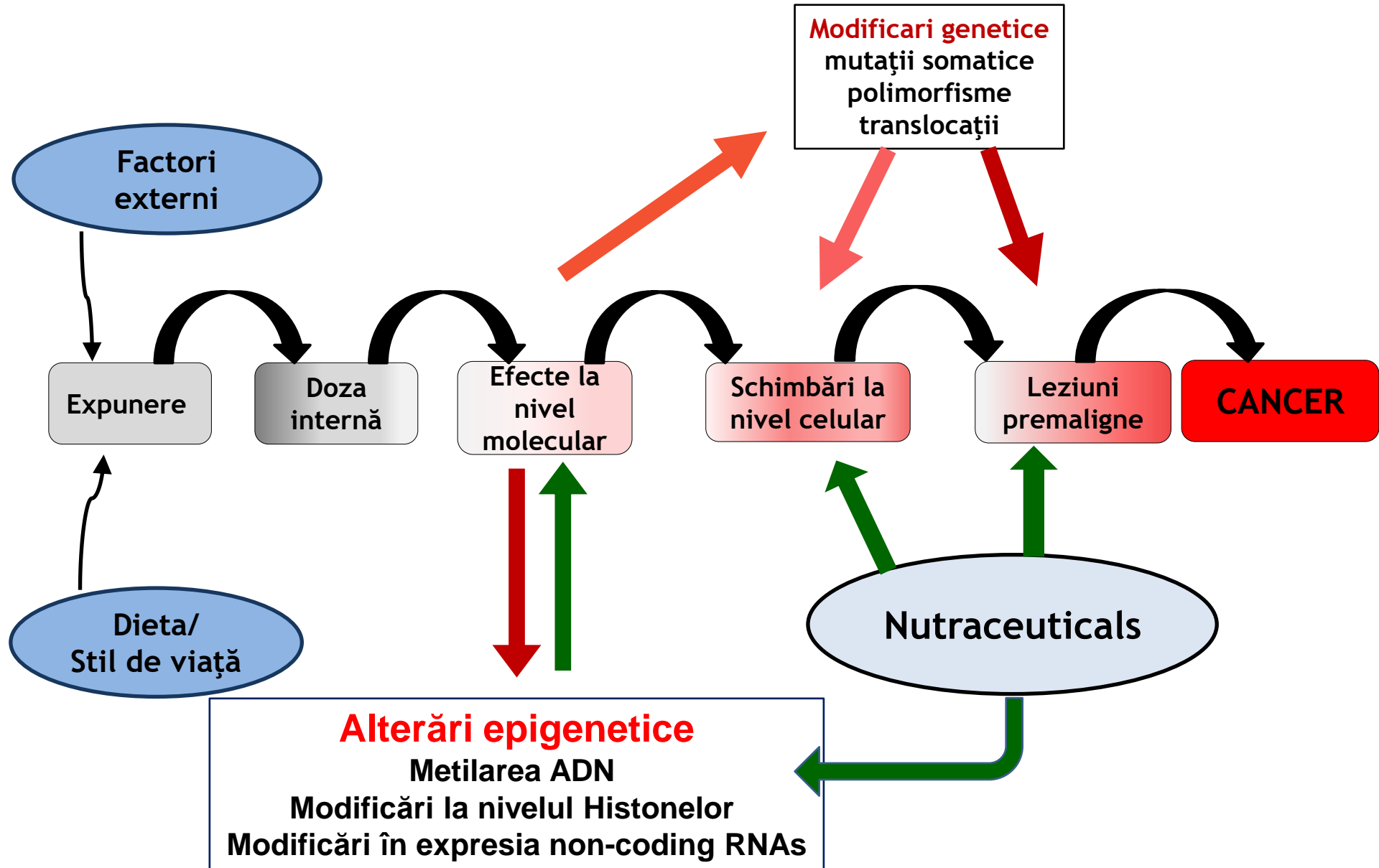
- **Nu necesită metode invazive**
- Se pot detecta din materii fecale, plasmă, ADN-ul tumoral circulant, țesut inclus în blocuri de parafină

# Rolul dietei în reversibilitatea **modificărilor epigenetice-** **Chemoprevenția**

- **World Health Organization:** "one-third of all cancer deaths are **preventable** by life-style changes".
- **American Cancer Society (2017):** "at least 42% of newly diagnosed cancers are caused by a combination of excess body weight, physical inactivity, excess alcohol consumption, tobacco smoking and **poor nutrition**".
- **The New England Journal of Medicine (2016) IF-79:** "there is a positive correlation between **caloric or dietary restriction** and **chemoprevention** in **13** types of cancer, including mammary gland, colon, liver, pancreas, skin, and pituitary gland".
- O **dieta săracă** în nutrienți poate iniția **carcinogeneza**, iar o dietă bogată în nutrienți cu acțiune biologică activă/benefică -**nutraceuticals**, poate preveni carcinogeneza.

**CUM?**

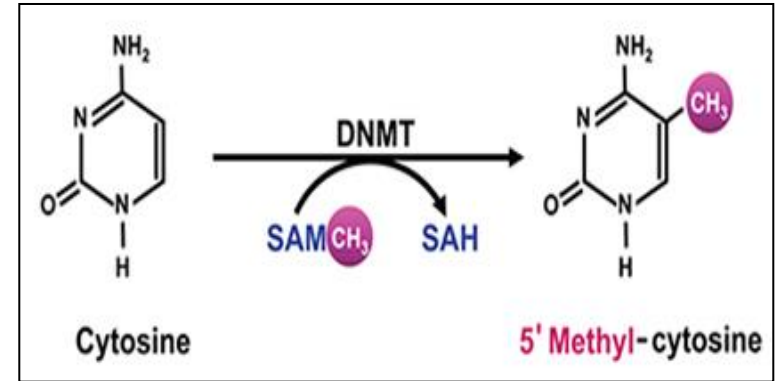
# Reversibilitatea alterărilor epigenetice în carcinogeneză



# Alterări în patternul de metilarea al ADN-ului

Proteinele DNA-metil-transferazele DNMTs transfera o grupare CH<sub>3</sub>- de la S-adenosil L-metionina (SAM) în poziția 5' a citozinei;

DNMTs : DNMT3A si DNMT3B catalizează reacția de metilare; DNMT1-menține starea de metilare



**Dezechilibru al reacției de metilare- Cum poate fi investigat?**

**DNMTs?** ↓ activitatea enzimatică?

↓ nivelul de expresie al proteinelor?

↓ nivelul de expresie al ARNm?

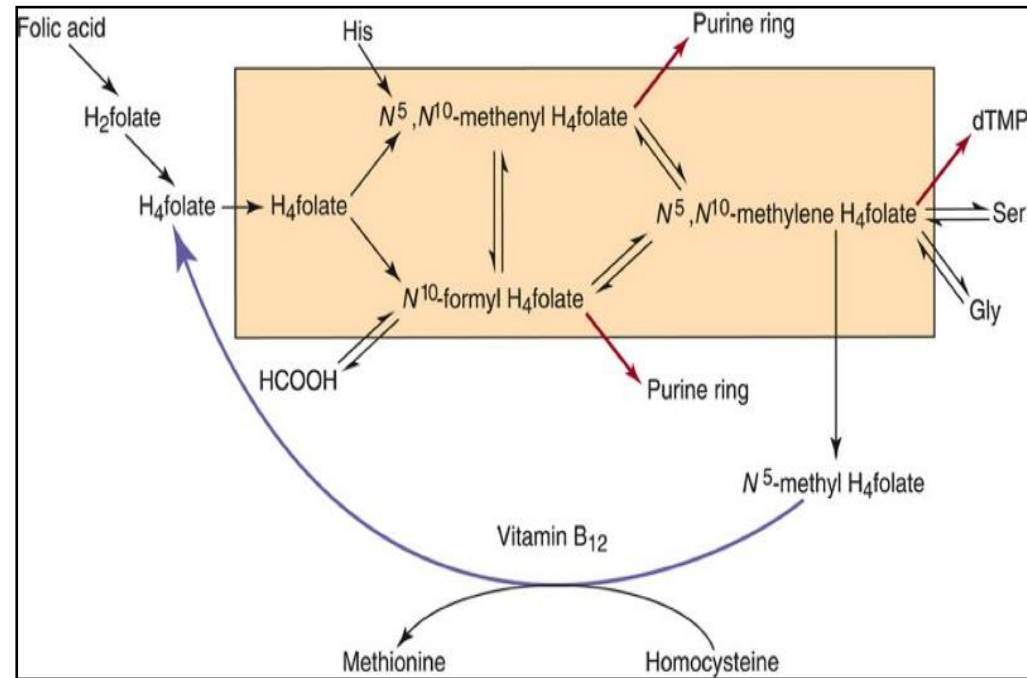
**Grupari metil în deficit? Sau în exces?**

Introducerea de ‘nutraceuticals’ în alimentație, se restabilește echilibrul?



## Calea metabolică Carbon 1

- generează în principal donorii de grupări CH<sub>3</sub>-
- este dependentă de nutrienții din dietă care pot genera grupări metil (ex: acid folic, acizii grași nesaturați, vitamine, etc)



Dietă săracă în nutrienți posibili donori de grupări CH<sub>3</sub>-



**Alterări epigenetice la nivelul ADN-ului metilat**



**CARCINOGENEZĂ**

# Alterări majore ale metilării ADN în cancer

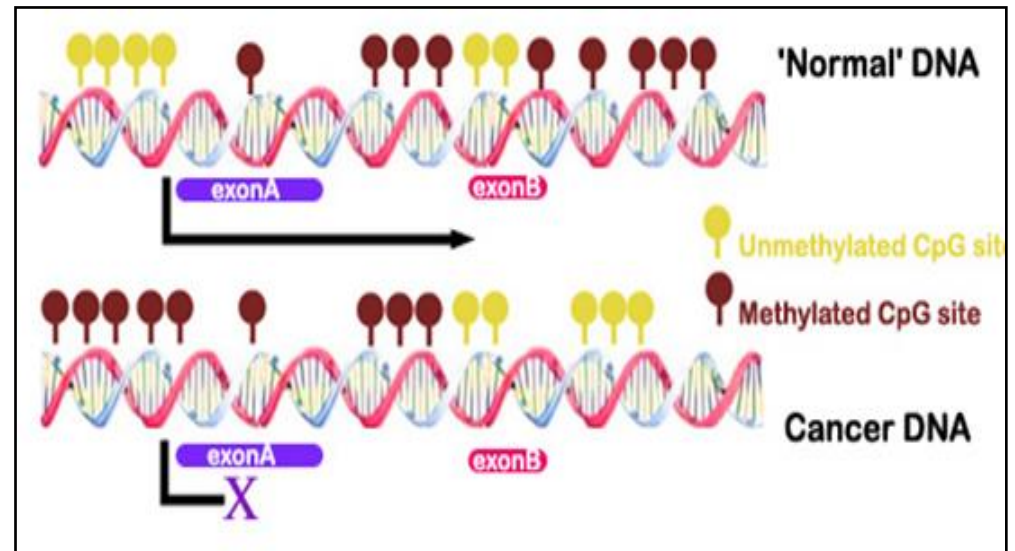
**HIPO**-metilarea globală, la secvențele repetitive din genom, - asociată cu instabilitatea genomică, specifică în primele etape ale carcinogenezei

-locală, promoterii oncogenelor devin active

**HIPER**-metilarea locală la promoterii unor gene specifice

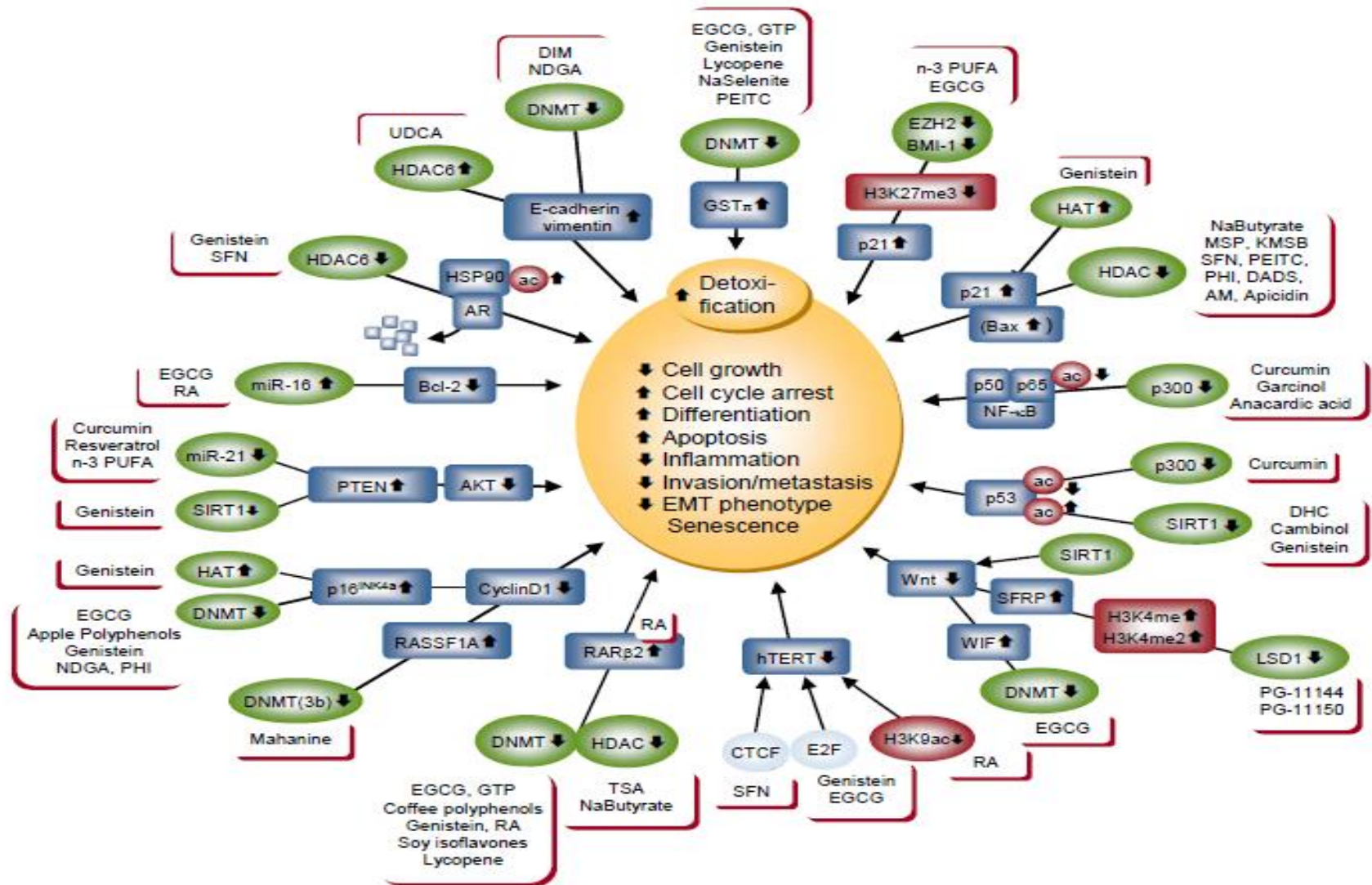
- **supresori tumorali inactivi**

- gene esențiale care controlează ciclul de diviziune celulară, repararea ADN-ului, etc



Cancerul de **colon** și **gliomele cerebrale** - rata mare de **metilare** la **gene specifice**, metoda de diagnostic-CpG island methylator phenotype **CIMP**

# EPIGENOMUL targetat de ‘nutraceuticals’ -efect asupra căilor de semnalizare și a mecanismelor care susțin procesul de carcinogeneză



- Modificările epigenetice induse de factorii externi pot avea efect ‘pozitiv’ sau ‘negativ’ asupra organismului, depinde de tipul de gene afectate, de momentul și de modul în care sunt afectate!
- Profilul optim al epigenomului pentru un organism sănătos nu a fost încă definit
- Studiul mecanismului molecular de acțiune al nutrienților biologic activi asupra epigenomului -chemoprevenție/epigenetic drugs

## NUTRIEPIGENOMICS

## II. Cercetare aplicată:

Cum evaluăm prin studii *in vitro* compuși biologic activi din dietă, pentru stabilirea efectului biologic, inclusiv capacitatea de modulator epigenetic

### II.1 Obiective generale

- Investigarea efectului anti-tumoral al unui compus biologic activ, ex: polifenoli, acizi grași esențiali de tip omega-3, omega-6;
- Identificarea modificărilor epigenetice pe care le induce acest tratament pe linii celulare tumorale;

**CITITI LITERATURA DE SPECIALITATE!** articole din reviste cu **IF mare**, produse de colective de cercetare cu experiența în domeniu.

**Compuși biologic activi:** efect anti-inflamator, anti-oxidant, anti-proliferativ...

- ✓ acizi esențiali de tip omega3 (docosahexanoic acid-DHA,  $\alpha$  linolenic-ALA); acizi grași saturați (PA- palmitic acid); curcumină; polifenoli extrași din plante (izoflavone).

**Studii *in vitro*:** linii celulare tumorale: Mewo (melanom uman), U-87MG (glioblastom uman), MCF-7 (adenocarcinom uman de sân); linii celulare normale.

**Table 1** Effects of unsaturated fatty acids on metabolic outcomes through epigenetic mechanisms (Continued)

FA	Dose	Study model	Epigenetic mechanisms	Epigenetic signature	Metabolic outcomes	Reference
<b>IN VITRO MODELS</b>						
n-6 AA	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M	Human THP-1 monocytes	DNA methylation	Dose-dependent DNA methylation A 10.5% increase in 5mC content at 100 mM compared to 1 $\mu$ M dose	+ Associated with atherosclerosis, diabetes, inflammatory profile, obesity and cancer	[26]
AA	3 $\mu$ M	Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and endothelial progenitors (EPCs)	DNA methylation	Promoter region of genes KDR and Notch4	- Associated with changes in expression of genes implicated in carcinogenesis and angiogenesis.	[9]
<b>MUFA</b>						
Oleic acid	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M	In vitro human THP-1 monocytes	DNA methylation	Global hypomethylation at 100 $\mu$ M compared to the 1 $\mu$ M dose	- Anti-inflammatory effects.	[26]
Oleic acid	1–200 $\mu$ M range	20 pregnancy mice and THP-1 cells	DNA methylation	1–50 $\mu$ M but in 5 $\mu$ M weaker response peaking	+ Improvement of proinflammatory profile and adipogenesis	[27]

**Table 2** Effects of saturated and trans FA on metabolic outcomes through epigenetic mechanisms

FA	Dose	Study model	Epigenetic mechanism	Epigenetic signature	Metabolic outcomes	Reference
<b>HUMANS</b>						
<b>Trans FA</b>						
Industrial TFA	10.2 g/2500 kcal, 3.7% of daily energy	9 healthy men	miRNAs	5 miRNAs in purified HDLs 13 HDL-carried miRNAs to the plasma miRNA pool	↑ Related to carcinogenesis, FA biosynthesis and alteration in FA metabolism	[28]
<b>ANIMAL MODELS</b>						
<b>Transgenerational</b>						
Elaidic acid		20 pregnancy mice and THP-1 cells	DNA methylation	1–50 $\mu$ M 5.2% increase in 5mC up to 200 $\mu$ M	+ Favors the accumulation of adipose tissue, obesity, and hepatic steatosis	[27]
<b>IN VITRO MODELS</b>						
<b>SFA</b>						
Palmitic acid	750 $\mu$ M palmitate	In vitro urinary human podocyte cell line and male Sprague-Dawley rats	Histone methylation and acetylation	H3K27me3 and H3K36me2 on promoter region of FOXO1	↓ Related to insulin resistance and decrease of glucose tolerance, favors gluconeogenesis.	[29]
Palmitic acid	1 mM palmitate	In vitro human pancreatic islets	DNA methylation	4561 sites increased DNA methylation (2753 unique genes and 1429 intergenic sites) 129 sites decreased DNA methylation (99 unique genes, and 30 intergenic sites)	+ Associated with insulin resistance, lipotoxicity, T2D, glycolysis, gluconeogenesis, dysregulation in FA metabolism related to obesity.	[30]
Palmitate	0.4 mmol/L palmitate	Pancreatic beta cell line and diabetic rats	DNA methylation	No changes in DNA methylation	No change in DNA methylation of <i>Ins1</i> promoter under normal or high glucose conditions	[31]
Oleato-palmitate	250 $\mu$ M oleate-palmitate ratio 1:1	Human skeletal muscle cells from severely obese women	DNA methylation	PPAR $\delta$ (sites - 71 and 61 bp)	+ Changes in methylation of PPAR $\delta$ , increases FA uptake and oxidation, favors abnormal accumulation of lipids in oxidative tissues.	[32]
Stearate and palmitate	3.75 mM. Stearate-palmitate ratio 4:1	Raw264.7 macrophage cell line	DNA methylation	PPAR $\gamma$ promoter	+ Promote metabolic disorders and inflammation, increase insulin resistance and obesity.	[33]

FA Fatty acids, TFA Trans fatty acids, FA Fatty acids, THP-1 Human monocytic cell line, HDL High density lipoprotein

↑ Increase

↓ Decrease

+ hypermethylated

- hypomethylated

## II. Obiective specifice

1. Stabilirea intervalului de concentrație la care compusul nu prezintă citotoxicitate pentru celule;
2. Stabilirea intervalului de timp în care se poate face tratamentul fără ca viabilitatea celulelor să fie afectată;
3. Evaluarea efectului anti-proliferativ al compusului;
4. Evaluare modificărilor epigenetice -metilarea ADN-ului;
5. Evaluarea activității enzimaticice și a nivelului de expresie al proteinelor de tip DNMTs

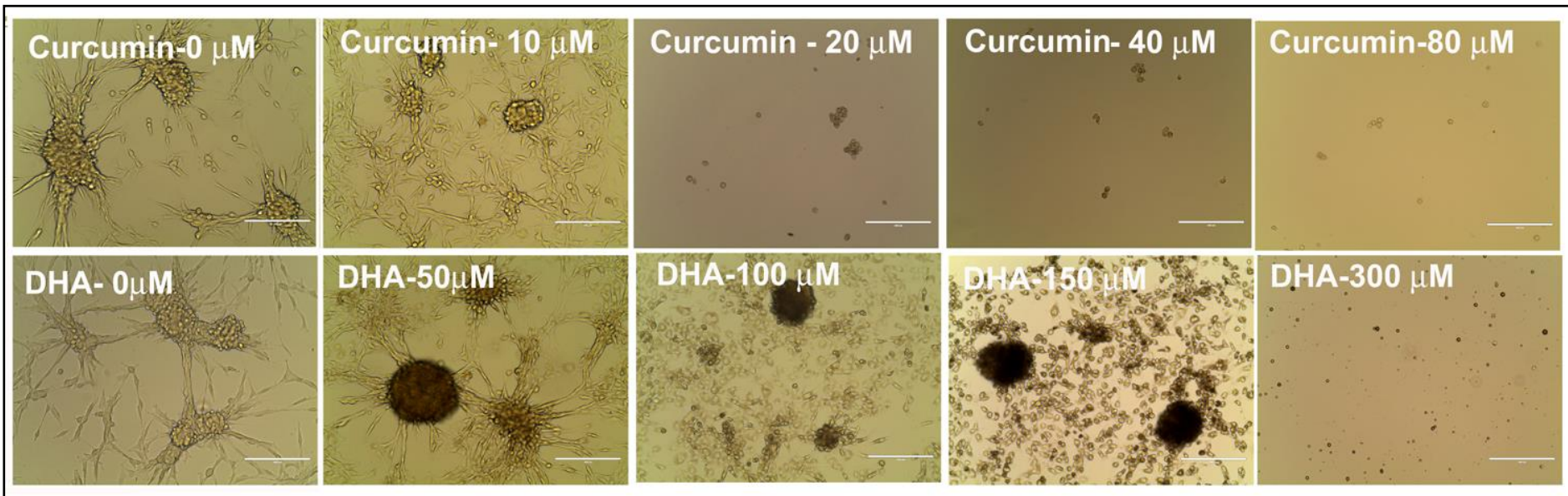
## II.3 Prezentarea rezultatelor experimentale

### 1. Stabilirea intervalului de concentrație și de timp la care compusul nu prezintă citotoxicitate pentru celule

**Materiale:** linia celulara U87-MG de glioblastom uman

Control pozitiv: tratament cu curcumin (0-80  $\mu\text{M}$ ); Probe: tratament cu DHA (0-300  $\mu\text{M}$ ); Control- DMSO-curcumin si BHT- DHA; Timp de tratament: 6 zile.

**Metoda de analiză:** colectare imagini la microscopul cu contrast de faza în fiecare zi de tratament



**Concluzii:** **DHA: 50-100  $\mu\text{M}$**  și **curcumin: 5-10  $\mu\text{M}$** , celulele rămân în parametrii optimi de creștere. Pentru curcumin > 20  $\mu\text{M}$  și pentru DHA -300  $\mu\text{M}$ , celulele mor, tratamentul devine toxic.



# Evaluarea viabilității celulare și a citotoxicității

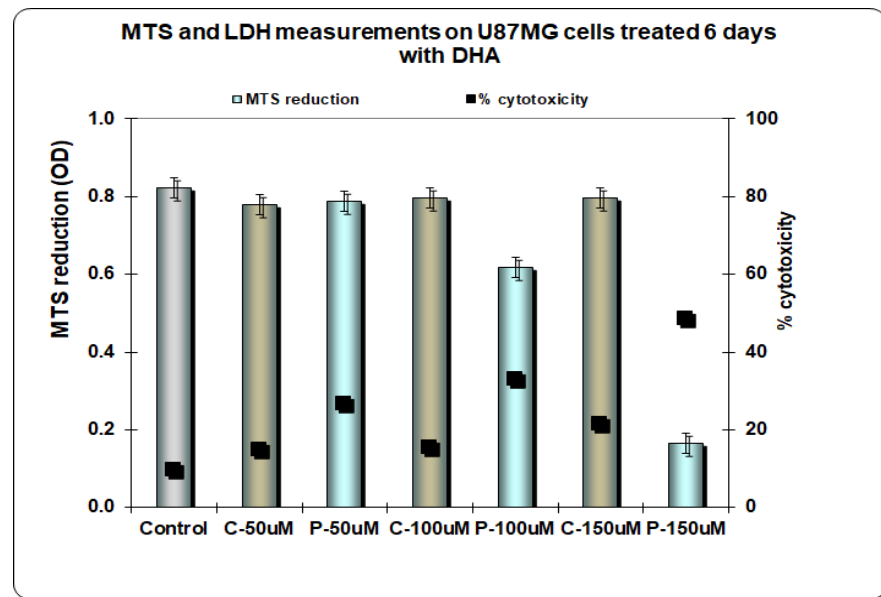
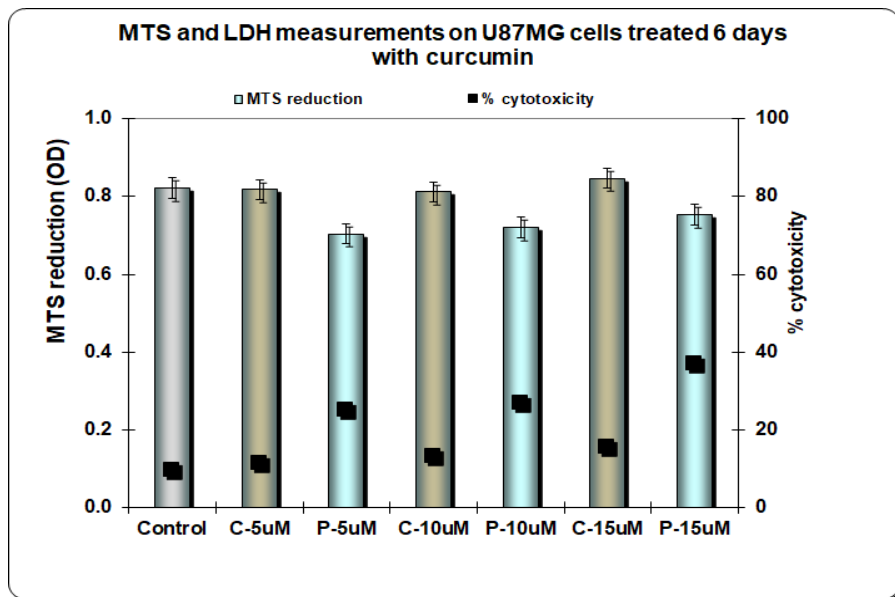
a) Teste de viabilitate celulară (MTS); b) Teste de citotoxicitate (LDH)

tratament: curcumina (5, 10, 15  $\mu\text{M}$ ); DHA (50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ); timp: 6 zile după tratament

## Rezultate:

**curcumina** - viabilitatea nu este afectată ( $\downarrow$  ~12% pentru 5-15  $\mu\text{M}$ ); citotoxicitate mare  $\times 4$  (15  $\mu\text{M}$ ); citotoxicitate acceptabilă (5-10  $\mu\text{M}$ )

**DHA** - viabilitatea  $\downarrow$  ~20% la conc 100  $\mu\text{M}$  față de control, citotoxicitate acceptabilă (100  $\mu\text{M}$ ); la 150  $\mu\text{M}$  DHA: viabilitatea redusă  $\downarrow$  ~75%, citotoxicitate  $\times 5$  mai mare.



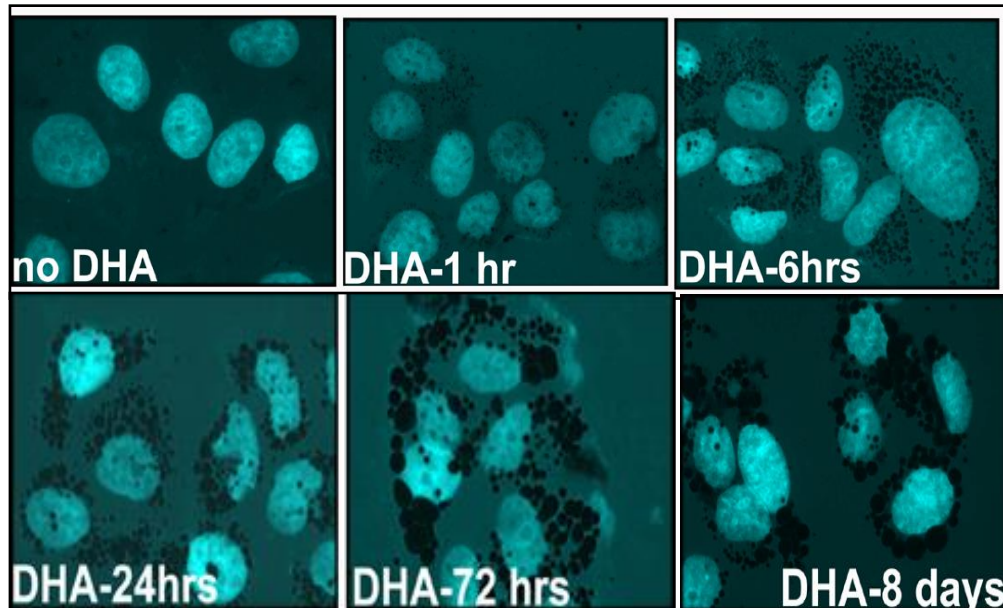
**Concluzii:** celulele U87-MG rămân viabile la tratamentul cu **DHA de 100  $\mu\text{M}$** ; concentrația de 150  $\mu\text{M}$  DHA este toxică; pentru tratamentul cu **curcumina** se poate lucra la o concentrație de **5-10  $\mu\text{M}$** .

## 2. Stabilirea intervalului de timp pentru realizarea experimentelor

### a) Evaluarea acumulării de acid gras nesaturat în celule

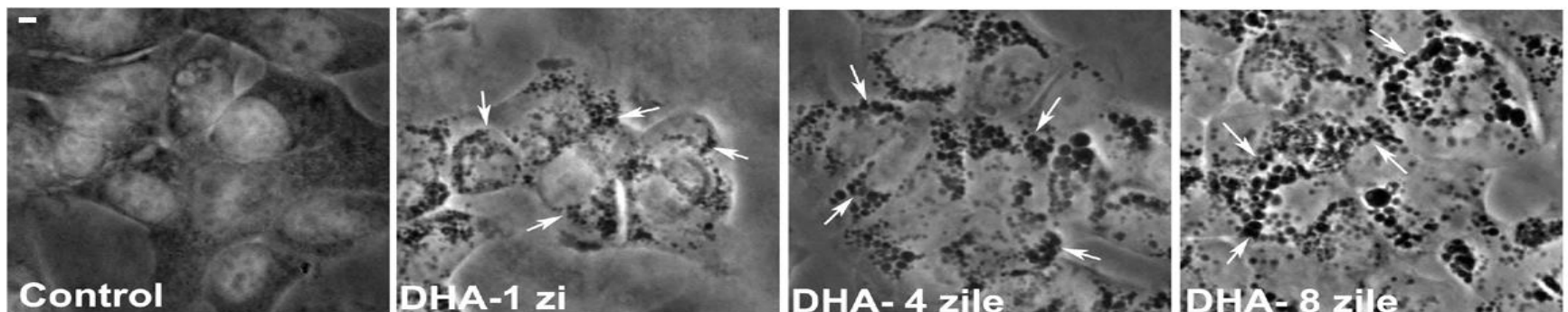
**Materiale:** Celule MCF-7 tratate cu DHA, 100  $\mu$ M, timp de 8 zile.

**Metoda:** colorare cu Oil RED a celulelor fixate la diferite intervale de timp dupa tratament; nucleul celulelor a fost colorat cu DAPI. Imagini -microscopul de fluorescență.



**Rezultate:** **acumulare** de **depozite de lipide** de la 1 oră dupa tratament. Mărimea depozitelor de lipide crește odată cu intervalul de timp de tratament.

**Concluzie:** **DHA** se **acumulează continuu** în citoplasma celulelor, fără să afecteze viabilitatea celulară.

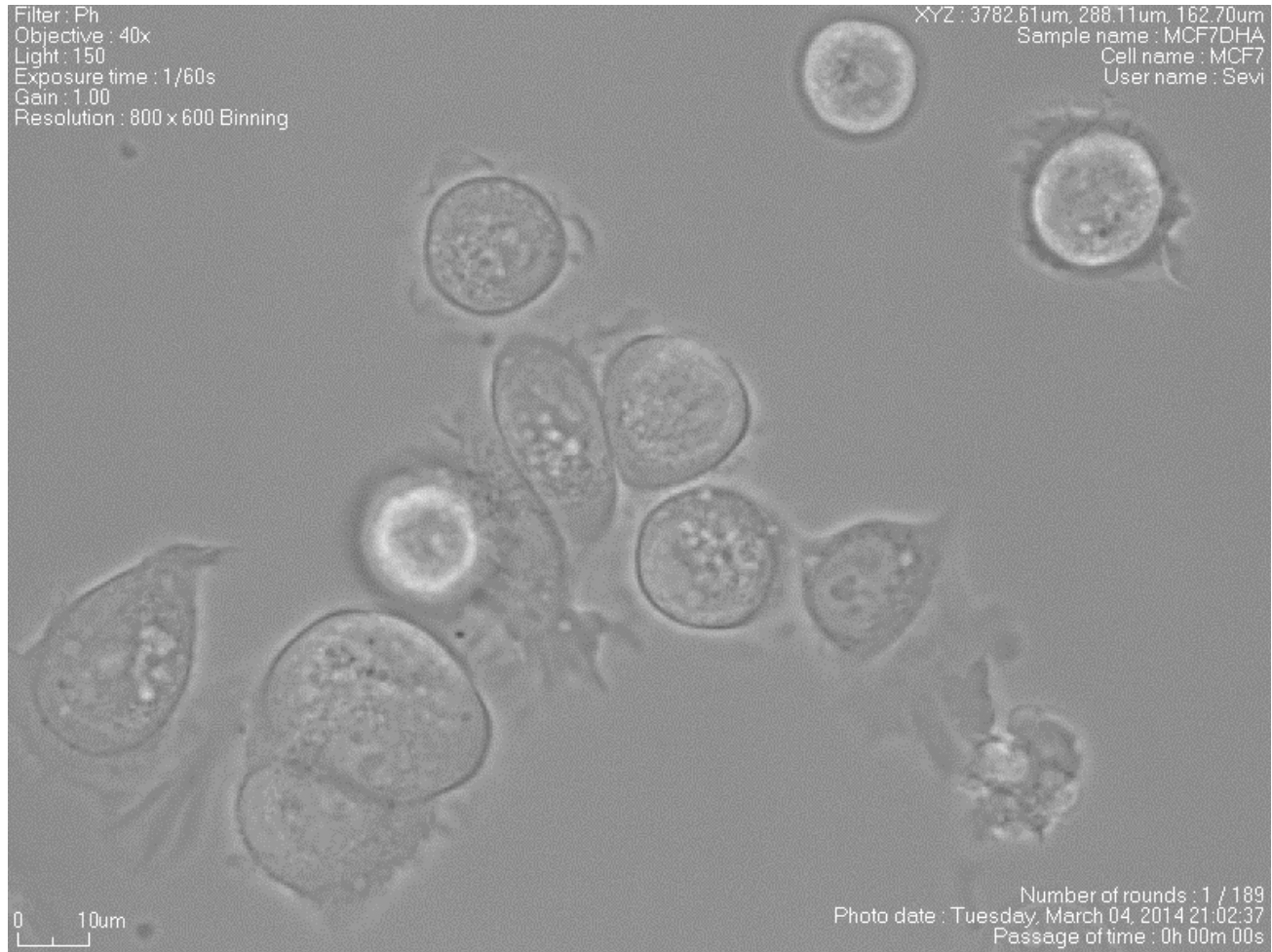


b) Monitorizarea în timp real a celulelor aflate sub tratament - BioStation TM

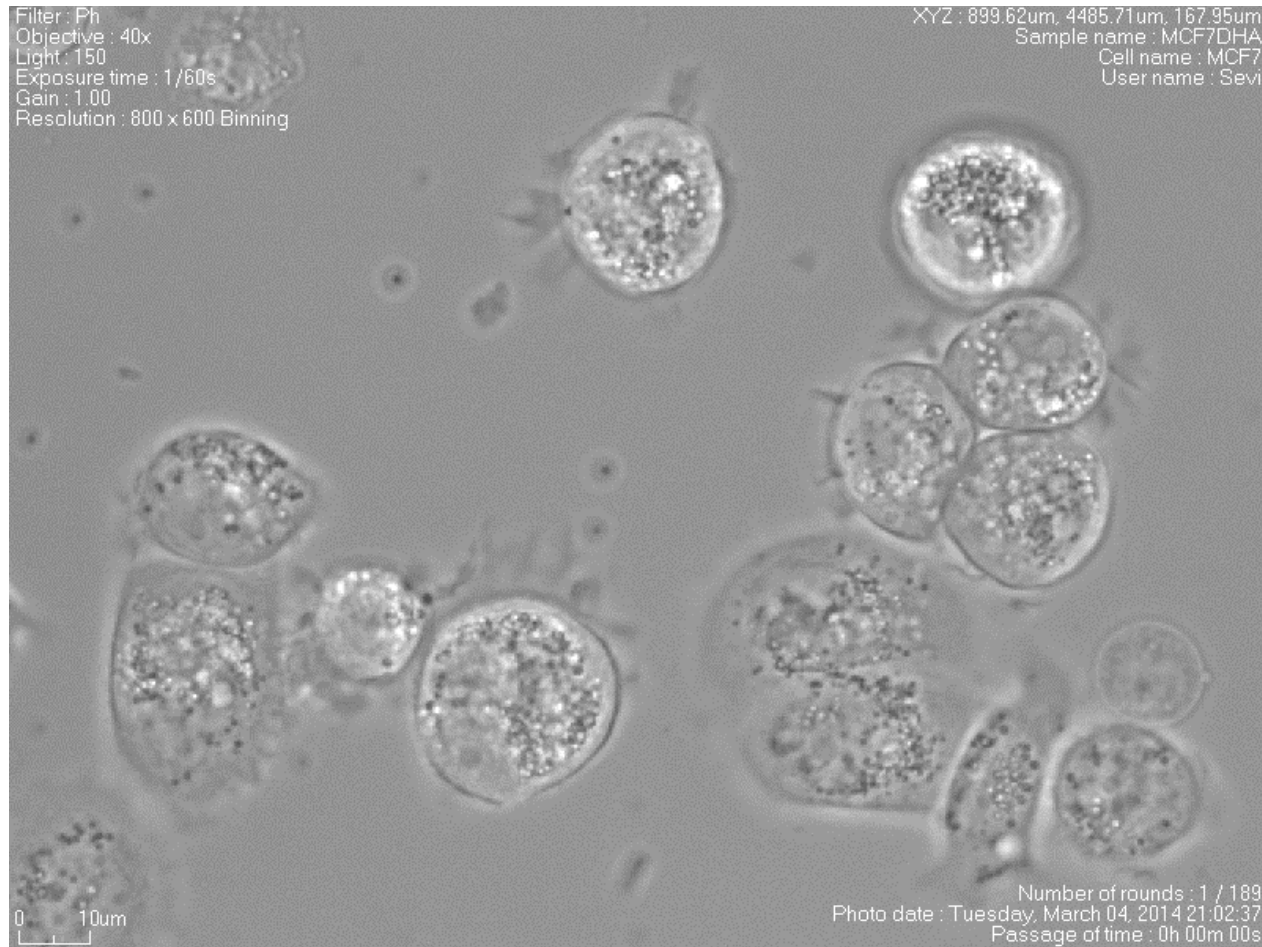
## MCF-7 netratate



# MCF-7 treatment DHA-4zile



# MCF-7 tratament DHA 8 zile



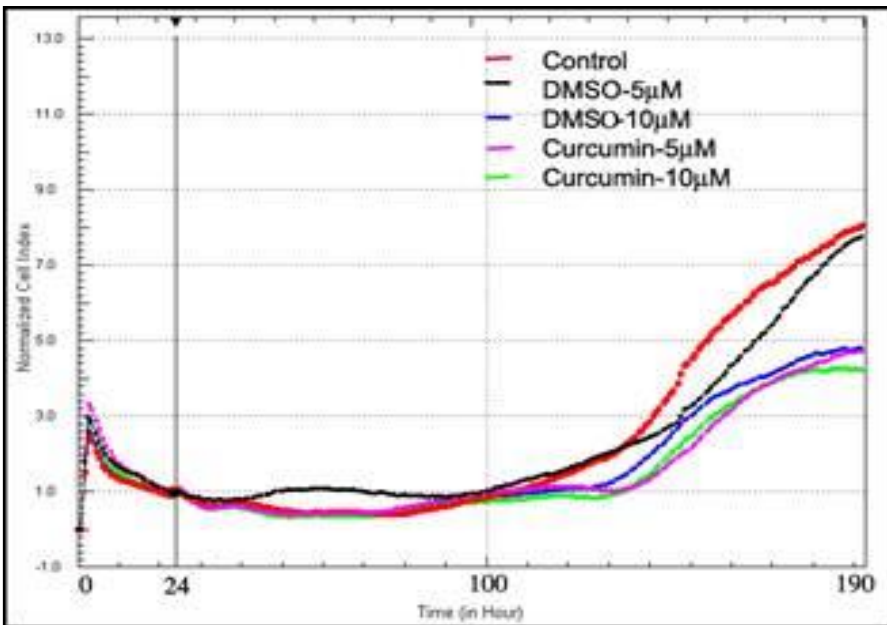
**Concluzii:** Celulele își **schimbă morfologia** la tratament îndelungat cu **DHA**, rata de **proliferare celulară scade**.

### 3.Evaluarea efectului anti-proliferativ indus de compuși activi biologic - platforma xCELLigence

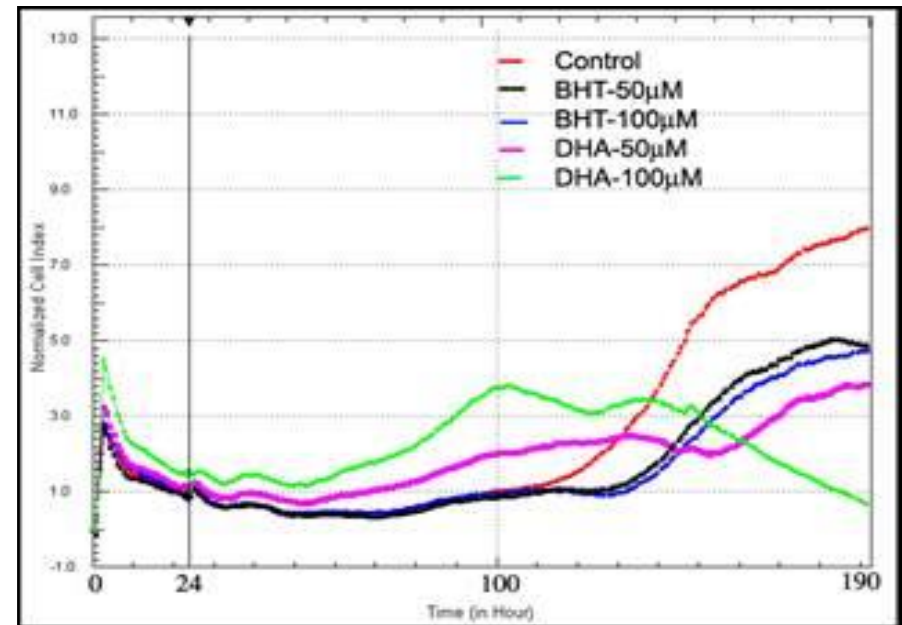
**Metoda:** monitorizare celulară în timp real prin măsurarea impedanței stratului celular- platforma xCELLigence

- Rezultate:**
- efect anti-proliferativ accentuat pentru tratamentul cu **DHA** 50, 100  $\mu\text{M}$ . Forma curbei de proliferare modificată la 100  $\mu\text{M}$  comparativ cu 50  $\mu\text{M}$  și cu celulele netratate.
  - efect **anti-proliferativ** mai puțin accentuat pentru tratamentul cu **curcumina** comparativ cu **DHA**.

Celule U87-MG - tratament curcumina

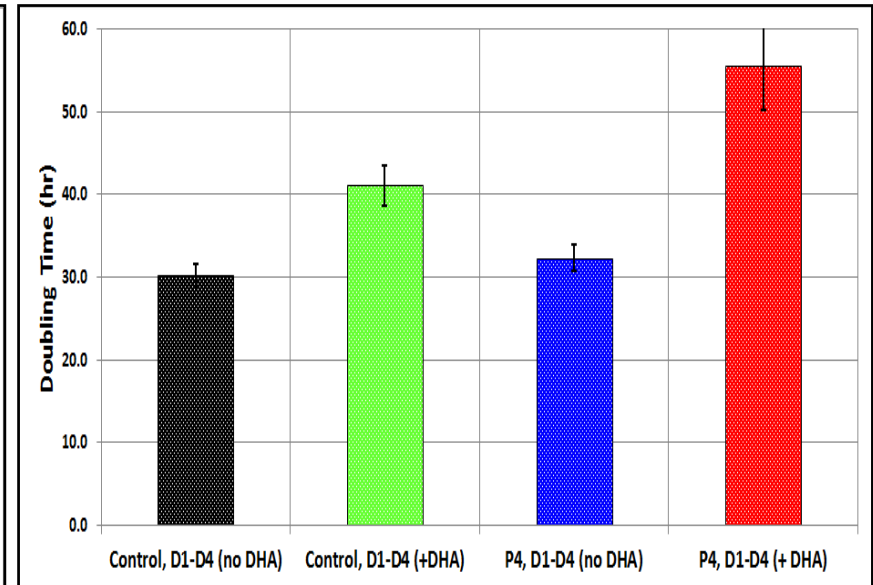
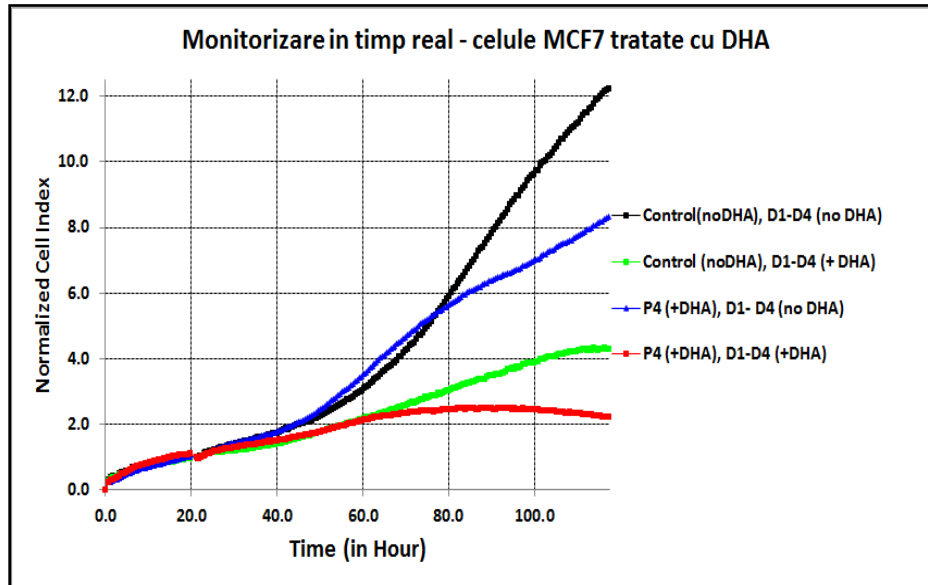


Celule U87-MG - tratament DHA



# Evaluarea efectului anti-antiproliferativ al DHA pe linii celulare de adenocarcinom

**Rezultate:** Efect anti-proliferativ și  **timp mare** de **dublare celulară** la tratamentul continuu cu **DHA**. Revenirea la aceeași timp de dublare a populației celulare după îndepărtarea tratamentului.



## Concluzii:

- **Curcumina** și **DHA** au efect anti-proliferativ pe celulele tumorale studiate,
- DHA a prezentat capacitate de modulare epigenetică la nivelul ADN-ului genomic și a histonelor pe cele liniile celulare tumorale.

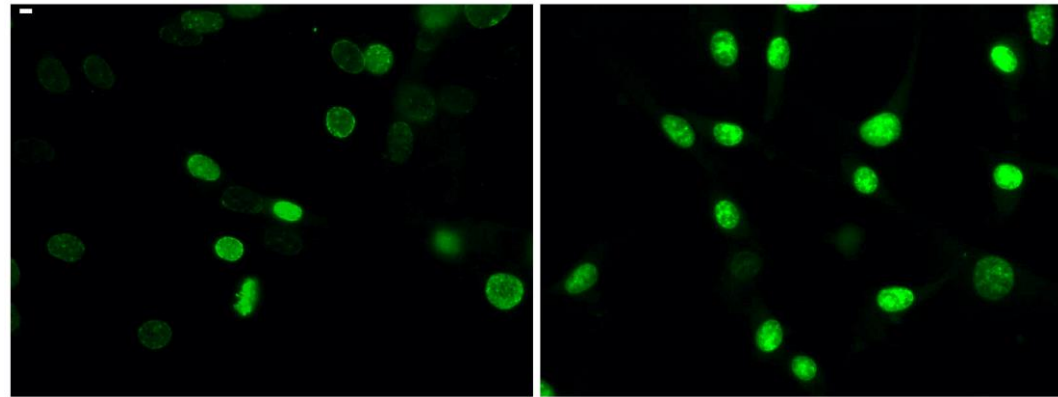
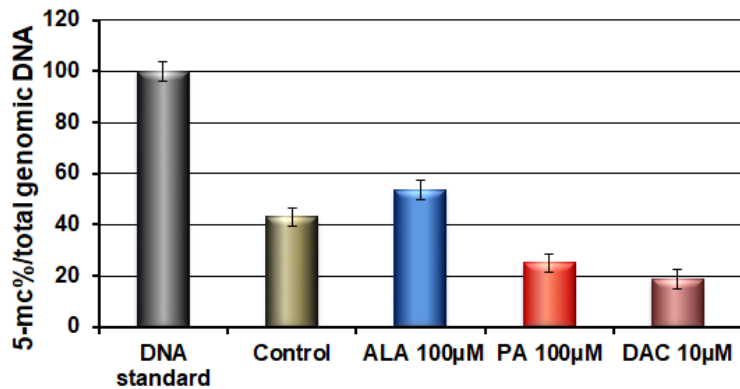
## 4. Evaluare modificărilor epigenetice la nivelul metilării globale a ADN-ului

**Materiale:** Mewo tratate cu ALA 100 $\mu$ M, PA 75  $\mu$ M timp de 6zile; ADN genomic extras. Control pozitiv-DAC: 5 aza 2' deoxycytidine, DNMTs inhibitor, 10 $\mu$ M.

**Metode:** analiza nivelului global de metilare a ADN-ului genomic.

**Tehnici de investigare:** ELISA, imunofluorescență pentru detecția 5-mC.

MeWo cells



Control

ALA

### Rezultate:

- Nivelul de **metilare al ADN-ului crește** cu ~20% pentru celulele MeWo tratate cu **ALA**, comparativ cu controlul.
- PA reduce metilarea ADN-ului cu ~ 25%.
- Experimentele de **imunofluorescență confirmă** rezultatele obținute prin tehnica ELISA

### Concluzie:

**ALA** poate avea **capacitate de modulator epigenetic** la nivelul **metilării globale a ADN-ului**.

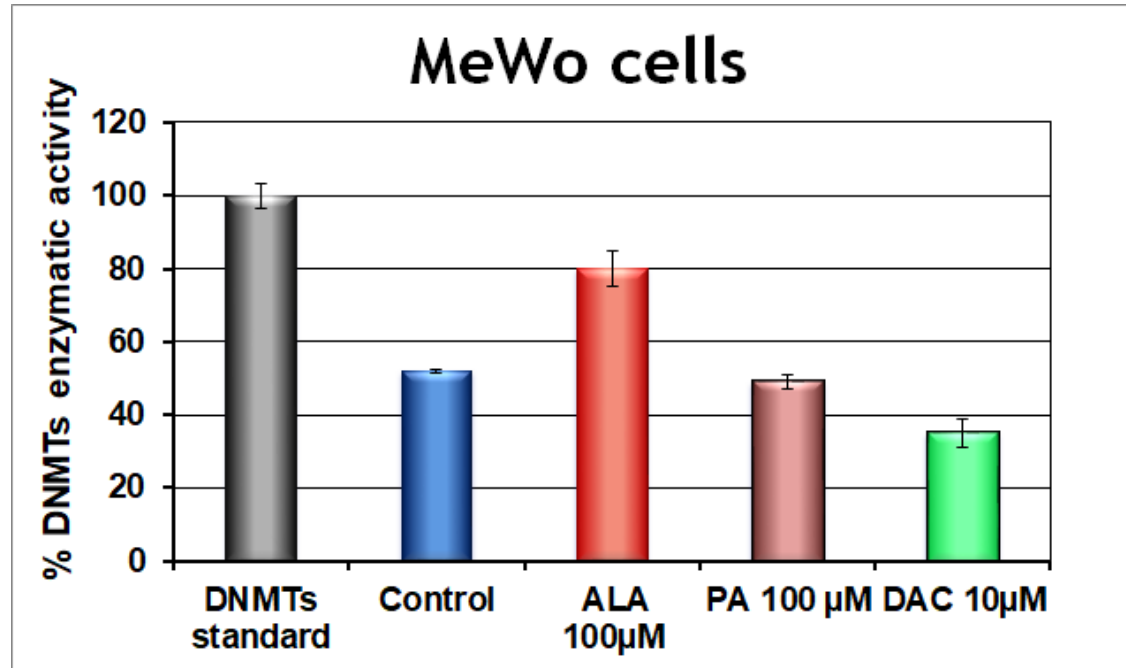


## 5. Evaluarea activității enzimatică a proteinelor DNA-metiltransferaze

**Materiale:** extract proteine nucleare, celule MeWo, tratate 6 zile

**Metode:** analiza activității enzimatică a proteinelor DNA metil-transferazele (DNMT1, 3A și 3B).

**Tehnica de investigare:** ELISA.



**Rezultate:** ↓ activitatea enzimatică DNMTs pentru DAC, pentru ALA ↑ comparativ cu controlul. PA - o scădere ușoară comparativ cu celulele netratate, experimentul control.

### Concluzie:

- ALA și PA afectează activitatea enzimatică a proteinelor DNMTs.
- Rezultatele se pot corela cu experimentele de metilare globală a ADN-ului

## Concluzii: studii *in vitro* pentru determinarea capacității de modulator epigenetic a compușilor biologic activi

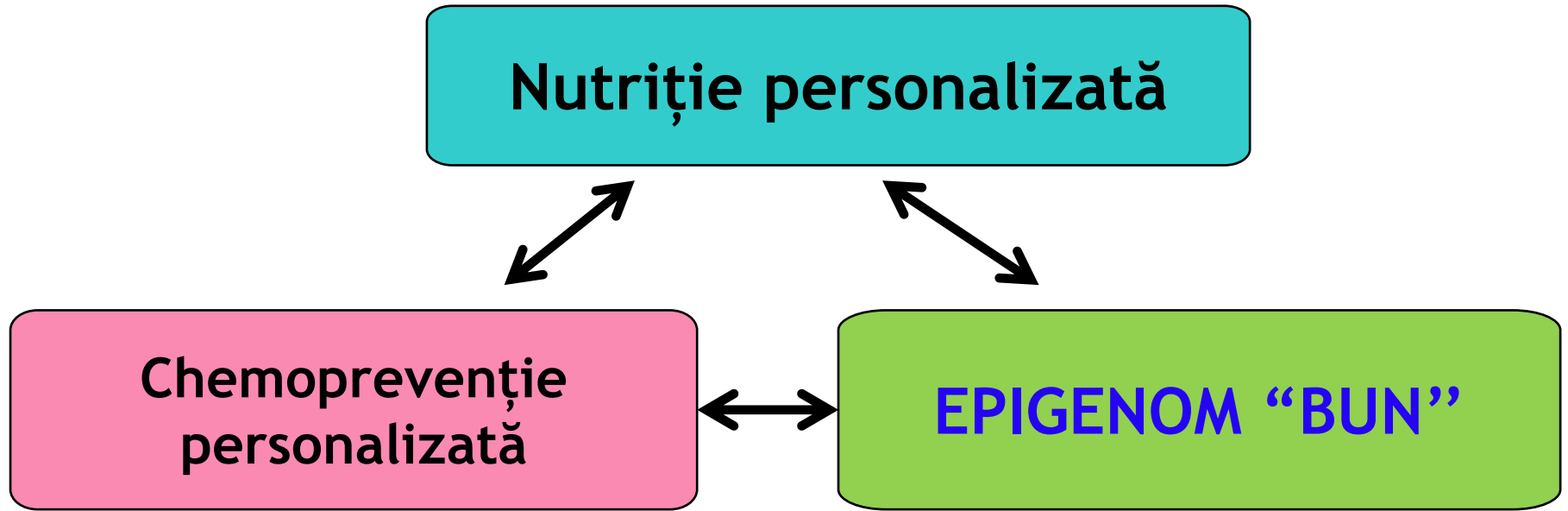
- **ALA** (acid omega3 esențial, prezent în plante) și **PA** (acid saturat) pot induce modificări epigenetice în celule tumorale;
- Tratatamentul îndelungat cu acizi grași poate modifica patternul de metilare globală a ADN-ului genomic la celulele tumorale:
  - **crește** nivelul de **5-mC** pentru tratamentul cu **ALA**
  - **scade** nivelul de **5mC** pentru tratamentul cu **PA**
- Activitatea DNMTs este afectată de tratamentul cu **ALA** ↑, pentru PA se observă o scădere ușoară comparativ cu celulele netratate;
- **ALA** – poate fi un **nutrient bioactiv** cu efect **pozitiv** pentru modularea epigenetică;
- **PA-** poate fi un **nutrient bioactiv** cu efect **negativ** de modulare epigenetică.

## II.4 Nutriție-Epigenom-Boli cronice

- Alterările epigenomului pot induce declanșarea și dezvoltarea unor afecțiuni cronice, inclusiv cancerul.
- Alterările epigenomului sunt reversibile.
- Nutrienții din alimentație pot fi modulatori epigenetici.

MODULATORII EPIGENETICI - acțiune POZITIVĂ SAU NEGATIVĂ asupra epigenomului

# VIITOR:



Vă mulțumesc!

