

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec**  
**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção e quantificação do nível de metilação em linhagens celulares tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina**

**Júlia Sallaberry Pinto**

**Pelotas, 2014**

**Júlia Sallaberry Pinto**

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção e quantificação do nível de metilação em linhagens celulares tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora acadêmica: Prof. Dra. Sandra Beatriz Tarquinio  
Orientadora de estágio: Prof. Dra. María Montes Bayón

**Pelotas, 2014**

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P659d      Pinto, Júlia Sallaberry

Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção e quantificação do nível de metilação em linhagens celulares tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina / Júlia Sallaberry Pinto. – 57f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora Sandra Beatriz Chaves Tarquinio ; coorientadora Maria Montes Bayón.

1.Biotecnologia. 2.ICP-MS. 3.Oncologia. 4.Epigenética. 5.Metilação DNA. 6.Espectrometria. 7.Câncer. I.Tarquinio, Sandra Beatriz Chaves. II.Bayón, Maria Montes..III.Título.

CDD: 572

Júlia Sallaberry Pinto

Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção e quantificação do nível de metilação em linhagens celulares tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24/11/2014

Banca examinadora:

Prof. Dra. Sandra Beatriz Tarquinio (Orientadora)  
Doutora em Odontologia (Patologia Bucal) pela Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Fernanda Nedel  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

*Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã,  
meus maiores incentivadores e exemplos.*

## **Agradecimentos**

Ao universo por esta conquista tão desejada. Muito além de um trabalho de conclusão de curso esta é a conclusão de 5 anos dedicados a me tornar a profissional que sempre sonhei e trabalhar com o que mais me encanta nesta vida, a ciência!

À minha mãe Vera, por ser meu maior exemplo e porto seguro nesta vida, me inspirando a chegar até aqui e nunca desistir dos meus sonhos. Pela amizade, companheirismo e amor indescritível com o qual fui abençoada. Pela apoio desde o princípio, és a principal responsável por esta realização;

Ao meu pai Elto, pelos princípios, valores, educação e amor a mim transmitidos, por ser um grande exemplo de garra, coragem e determinação, sempre me amparando e acreditando no meu potencial;

À minha irmã Elen, por ter compartilhado comigo os melhores e piores momentos durante a graduação e toda a vida, pela força, compreensão e imenso amor! Pela amizade e carinho que nos tornam muito mais que irmãos de sangue e sim de alma;

À minha orientadora Prof. Dra. Sandra Tarquínio, pelas oportunidades e confiança em mim depositadas durante os quatro anos em que fiz parte do grupo de pesquisa NCTBio. Por ser mais que um exemplo científico, me ensinando também que mesmo em situações de aparente superioridade podemos trabalhar com simplicidade, amizade, delicadeza e generosidade;

À minha coorientadora Prof. Dra. Fernanda Nedel, por ter fomentado meu amor pelas ciências biomédicas e oncologia. Pelo exemplo profissional a ser seguido, pela orientação unida a mais pura amizade. Pelos inumeráveis ensinamentos científicos, pelo incentivo e apoio quando eu mais precisei;

Às minhas orientadoras durante os estágios realizados Espanha María Montes Bayón e Purificación Muñoz, pela oportunidade de trabalho, ensinamentos, paciência e confiança em mim depositadas;

Ao todo grupo NCTBio pelos ensinamentos e amizade;

Ao Centro de Biotecnologia e Universidade Federal de Pelotas junto a todos seus profissionais e colegas, pela companhia, ensinamentos e por terem tornado possível minha formação no curso de graduação que sempre sonhei;

À minha madrastra Neca e queridas tias do Sul e de Minas, por todo amor

dedicado a mim, por acreditarem comigo nos meus sonhos me dando muito mais força para correr atrás de cada um;

À toda minha família pela torcida, carinho e por terem muitas vezes compreendido minha ausência durante esses anos;

Ao Diego, por todo carinho, ensinamentos, companheirismo, paciência e amor com o qual fui agraciada neste último ano de graduação;

Às amigas para vida toda Tai, Bruna e Paula por sempre me ouvirem, apoiarem, compartilhando de todos os momentos importantes ao meu lado;

À Mariana, amiga que a biotecnologia me proporcionou, pela amizade, discussões, trocas científicas, por ter me ensinado que pensar por outro ângulo pode tornar tudo ainda mais interessante. Pela boa vontade em contribuir com a formatação do presente trabalho;

Às irmãs que a Espanha me presenteou Vânia e Karen, por terem aparecido no momento certo da minha vida, me fazendo amadurecer em tempo de mudar o rumo da minha própria história, por todo apoio durante o desenvolvimento deste projeto em Oviedo, sem vocês essa conquista não seria possível;

À todos amigos e companheiros com que dividi grandes experiências em Oviedo que para sempre farão parte das minhas melhores memórias para o resto da vida, em especial ao Guilherme, Leonardo, Paula, Júlia Condé, Kamila, Wagner, Amaury e Jonas;

Ao Samuel, Lara e Rossana pelo acolhimento, apoio e amizade durante minha estada em Barcelona para realização do estágio de final de curso, sempre serei imensamente grata a vocês por cada detalhe que fizeram por mim neste tempo;

Ao Roberto, por ter sido um anjo que antes de partir me ensinou princípios que levarei para sempre comigo de paz interior e amor verdadeiro. Pelo apoio essencial para esta realização quando resolvi trocar a estabilidade momentânea e ir em busca do meu sonho em estudar biotecnologia;

Às Jesualdas, pelos lindos momentos vividos juntos, amizade, carinho e compreensão com minhas ausências;

Ao grupo de trabalho mais eficiente que já encontrei Marina, Bárbara e Gabriela pelos ensinamentos, paciência, amizade e caronas compartilhadas. Ainda sinto falta de trabalhar com tanta sabedoria em conjunto como fazíamos;

Às colegas Fernanda Valiati, Carol e Fernanda Rodrigues que durante estes

5 anos se tornaram muito mais que colegas e sim grandes amigas que levarei para o resto da vida, pelas parcerias, conselhos, cervejas, amor e apoio incondicional todas as vezes que precisei;

A Milena, por ser uma amiga tão especial e presente na minha vida mesmo que muitas vezes tenha que conviver mais com minhas ausências do que com as presenças;

A toda a turma atbiotec2013, por tantos momentos inesquecíveis vividos durante estes anos, por serem a turma mais dedicada unida que já convivi. Como também a turma atbiotec2014, por terem me acolhido com tanta amizade e carinho neste último ano de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Graduação Sanduíche do Programa Ciências Sem Fronteiras, a qual tornou possível o desenvolvimento deste estudo.

**Muito Obrigada!**

## Resumo

PINTO, Júlia Sallaberry. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção e quantificação do nível de metilação em linhagens celulares tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina.** 2014.57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)- Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A cisplatina é um fármaco antineoplásico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de tumores e que, apesar da atividade antitumoral eficiente, tem sua eficácia clínica limitada, principalmente devido à resistência adquirida à cisplatina após o tratamento. Dentre os fatores que podem estar associados a esta resistência, destacam-se alterações no estado de metilação celular que podem ocorrer em resposta ao uso deste fármaco. Estas alterações são avaliadas mediante a análise de biomoléculas que, se estabelecidas, podem servir como marcadores para a verificação do desenvolvimento de resistência ao fármaco antes do tratamento. Neste estudo foram utilizadas duas metodologias para análise da porcentagem de metilação encontrada no DNA. Primeiramente, foi realizada a técnica de separação cromatográfica de alta resolução (HPLC) para o desmembramento dos nucleotídeos e da 5-Metilcitosina (d5mCMP). Para detecção e quantificação das biomoléculas de interesse utilizamos a técnica de espectrometria de absorção (UV/VIS) e posteriormente aplicamos o método de espectrometria de massas elementar como fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) mediante a detecção de  $^{31}\text{P}$ .

O estudo teve como objetivo investigar novos sistemas analíticos para a detecção e quantificação do estado de metilação do DNA, para posterior aplicação do protocolo desenvolvido em amostras reais de cultivos celulares das linhagens de células oriundas de câncer de ovário A2780 e A2780cis sensíveis e resistentes, respectivamente, à cisplatina, visando relacionar a porcentagem de metilação com a resistência ao fármaco em análise. Os resultados analíticos demonstraram a possibilidade de desenvolvimento de duas metodologias eficientes para verificação da presença de d5mCMP em DNA comercial derivado de timo de bezerro.

**Palavras-chave:** cisplatina; metilação do DNA; espectrometria; câncer.

## Abstract

PINTO, Júlia Sallaberry. **Development of analytical methods for the detection and quantification of the level of methylation in cancer cell lines sensitive and resistant to cisplatin.** 2014. 56p. Final Project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

Cisplatin is an antineoplastic drug used to chemotherapy in different types of cancer. In spite of its success, the major drawback is associated to the clinical use of cisplatin in chemotherapy: the acquired resistance to the drug the treatment. The aspects that may be associated with this resistance changes are observed in cellular methylation state which may occur in the use of this drug after the treatment. These cellular changes can be addressed by monitoring a given number of biomarkers of the cytosine methylation level (in the whole DNA sequence or in specific genes). Thus, this project has two methodologies for analysis of methylation percentage of the DNA that were used. For detection and quantification of biomolecules of interest we used the technique principle absorption spectrometry (UV/ VIS), and then, we applied the method of mass spectrometry as a source of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) upon detection 31P. Such detection systems were coupled to separation techniques, mainly liquid chromatography (conventional and capillary HPLC) and gel electrophoresis (GE).

Thus, this study aimed to inquire the development of new analytical strategies to measure the described biomarkers in ovarian tumoral cell cultures, sensitive and resistant to cisplatin to obtain any possible correlation between the measured biomarkers and the resistance to cisplatin. Our analytical results demonstrated that the development of two efficient methodologies were possible for checking of the presence of d5mCMP into commercial DNA derived calf thymus. However, for direct detection of methylation in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells, both techniques should be improved in further studies.

**Key words:** cisplatin; DNA methylation; spectrometry; cancer.

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de Literatura .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Câncer .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Introdução ao câncer .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	<b>A biologia do câncer .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3</b>	<b>A metilação do DNA e o câncer .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Fármacos antineoplásicos .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Cisplatina .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>A metilação no DNA e seu efeito sobre a ação da cisplatina.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Ferramentas para quantificar o nível de metilação no DNA .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Métodos baseados nas propriedades físico-químicas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Métodos baseados na conversão enzimática.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Métodos baseados na reatividade química.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentação.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiais e soluções .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Obtenção de células A2780 e extração de DNA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Digestão do DNA .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>38</b>

<b>5.1 Otimização HPLC-UV coluna tecknokroma SAX .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Análise DNA timo de bezerro por HPLC-UV - coluna tecknokroma SAX .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Otimização HPLC-UV coluna pharmacia .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4 Análise de DNA de timo de bezerro por HPLC-UV - coluna pharmacia.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5 Análise timo de bezerro por HPLC-ICP-MS.....</b>	<b>46</b>
<b>6 Conclusão e Perspectivas Futuras.....</b>	<b>49</b>
<b>Referências.....</b>	<b>50</b>



## 1 Introdução

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido nos Laboratórios de Proteômica e ICP-MS em conjunto com o Grupo de Investigação de Espectrometria Analítica no Departamento de Físico Química Analítica e Departamento de Biologia Funcional da Universidade de Oviedo, em Oviedo/Espanha, com embasamento no projeto "Avaliação das alterações epigenéticas e do estado redox celular em relação à resistência adquirida ao tratamento antineoplásico com cisplatina através de técnicas de Espectrometria de Massas" sob orientação da Prof. Dra. Maria Montes Bayón (orientadora de estágio) e da Prof. Dra. Sandra Beatriz Tarquínio (orientadora acadêmica) com o auxílio da Bolsa de Graduação Sanduíche do Programa Ciências Sem Fronteiras concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O Grupo de Pesquisa em Espectrometria Analítica da Universidade de Oviedo surgiu há quase 30 anos buscando manter um princípio em suas pesquisas: fazer ciência analítica com qualidade visando a resolução de deficiências atualmente enfrentadas na sociedade. Considerando que esses problemas podem pertencer a áreas extremamente distintas, os métodos devem ser os mais adequados para cada tipo de análise. Desta maneira o grupo projetou sua divisão em subgrupos relacionados a diversas áreas, a fim de obter especialistas em diferentes técnicas de grande projeção prática dentro das análises científicas. Dentre as áreas pesquisadas encontra-se o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes na detecção de marcadores biológicos relacionados aos danos causados ao DNA induzidos por agentes citotóxicos, tal como a cisplatina.

A cisplatina é uma droga utilizada no tratamento antineoplásico de diversos cânceres, seus benefícios foram conhecidos durante a década de setenta. Desde então, tem sido amplamente prescrita como medicamento quimioterápico (STARITZ, 2003). Contudo, apesar de ter uma eficiente função antitumoral, a cisplatina ainda possui uma eficácia clínica limitada, principalmente devido à resistência adquirida ao fármaco após o tratamento (JUNG & LIPPARD, 2007). Ainda não foi possível a identificação dos mecanismos determinantes para o surgimento dessa resistência, mas dentre os fatores epigenéticos já identificados destacam-se as alterações no estado de metilação celular (STEWART, 2007).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metila no carbono 5' do anel de citosina, transformando-o em 5-metilcitosina (d5mCMP). Geralmente o genoma de células cancerosas apresenta modificações importantes nos níveis de metilação do DNA. Estas alterações podem ser avaliadas mediante a análise de uma série de biomoléculas que podem servir como biomarcadores para identificar o possível desenvolvimento de resistência ao fármaco (MARTIN et al., 2008).

Em nosso estudo focamos em duas metodologias para análise da porcentagem de metilação encontrada no DNA. Primeiramente foi realizada a técnica de separação cromatográfica de alta resolução (HPLC) para desmembramento dos nucleotídeos e da 5-metilcitosina. Para detecção e quantificação das biomoléculas de interesse utilizamos a técnica de espectrometria de absorção (UV/VIS) e posteriormente aplicamos o método de espectrometria de massas elementar como fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) mediante a detecção de  $^{31}\text{P}$ .

A análise UV/VIS dos nucleotídeos do DNA implica na produção de uma mescla complexa de moléculas que faz com que seja difícil a detecção e quantificação de 5-metilcitosina quando o DNA não está suficientemente purificado e/ou concentrado (CELA et al., 2003). Tendo em vista a dificuldade encontrada, testamos a metodologia para a determinação de modificações no DNA utilizando como detecção o método de ICP-MS. Esta fonte de ionização rompe por completo as moléculas e produz íons elementares de seus componentes. No caso de nucleotídeos, são produzidos íons de  $^{31}\text{P}$  que podem ser quantificados com alta sensibilidade (RIBEIRO & ROAD, 2012).

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar novos sistemas analíticos para a detecção e quantificação do estado de metilação do DNA para posterior aplicação do protocolo desenvolvido em amostras reais de cultivos celulares das linhagens de células, de câncer de ovário, A2780 e A2780cis, sensíveis e resistentes, respectivamente, à cisplatina, visando relacionar a porcentagem de metilação com a resistência ao fármaco em análise.

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Câncer**

O câncer origina-se quando o equilíbrio entre a origem e a morte celular é direcionado para uma proliferação incontrolada, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo promovendo a geração de metástases (MICHOR et al., 2004). Estas invasões caracterizam os tumores como malignos ou benignos, em casos onde há a proliferação do tumor com a invasão dos tecidos vizinhos, o tumor é determinado maligno, já os tumores benignos são aqueles que crescem localizados sem invadir de tecidos adjacentes (ANAND et al., 2008).

#### **2.1.1 Introdução ao Câncer**

No Brasil, dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam uma estimativa de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer para o período de 2014 a 2015 sendo que destes cerca de 302 mil acometeriam mulheres e 274 mil homens. Ademais, segundo a mesma fonte os seis tipos de neoplasias malignas mais incidentes estimados para 2014 em nosso país são, câncer de próstata seguido por, mama feminina, colo do útero, pulmão, cólon e reto e estômago.

Já informações da Organização Mundial de Saúde (OMS), afirmam que a incidência da doença, pode aumentar em 50% nos próximos 20 anos, quando serão diagnosticados em todo o mundo cerca de 22 milhões de ocorrências em

comparação com os 14 milhões registrados no ano de 2012, em consequência disso as mortes por câncer deverão se encontrar entre 8,2 milhões a 13 milhões. No cenário mundial, o câncer é a segunda principal causa de morte depois das doenças cardiovasculares em países desenvolvidos, dados epidemiológicos mostram o início desta tendência também em países em desenvolvimento de renda média pertencentes a América do Sul e Ásia.

Conforme o Relatório Mundial sobre o Câncer, a OMS solicitou que governos, autoridades e público em geral empreendam ações urgentes para evitar a ampliação do número de vítimas dessa enfermidade. Pois, mesmo com significativa quantidade de pesquisas em biologia celular e molecular e os avanços nas áreas de oncologia e cirurgia, o índice de sobrevivência de cinco anos não tem aumentado muito nas últimas décadas permanecendo em torno de 53% (HAMANA et al., 2005; SMITH et al., 2009).

A classificação utilizada para diferenciar os tipos de câncer se refere aos vários tipos de células do corpo do qual este tem origem. Os principais cânceres podem ser classificados em: carcinomas, que se tratam de neoplasias originárias de tecidos epiteliais; leucemias, que se referem a neoplasias originárias da medula; linfomas, que consistem em neoplasias originárias de tecidos linfóides, e sarcomas, denominados neoplasias que possuem origem de tecidos conjuntivos ou de origem mesenquimal, de preenchimento ou de sustentação. Além disso, outras características são utilizadas para distinguir os vários tipos de câncer como a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (INCA; OMS).

Dentre os carcinomas, o câncer de ovário é considerado o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o com menor chance de cura. Já que aproximadamente 3/4 dos cânceres nesse órgão encontram-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. Atualmente os marcadores tumorais utilizados neste tipo de câncer são substâncias detectadas no exame de sangue e que aumentam na presença de tumores malignos como o CA 125, a Alfafetoproteína e o beta-HCG. Esses marcadores apesar de serem muito úteis no acompanhamento do paciente com câncer de ovário são pouco confiáveis para o diagnóstico inicial, dado que eles possuem baixa especificidade, com alto número de falsos positivos (INCA; OMS). Uma das ferramentas para detecção de novos biomarcadores são

estudos envolvendo a linhagem celular de carcinoma de ovário humano A2780. Esta foi estabelecida a partir de amostras de tecido tumoral de um paciente não tratado e são células que crescem como uma monocamada em suspensão. A A2780 é a linhagem mãe da A2780cis que assim é chamada por ser uma linhagem de células resistentes à cisplatina (ATCC).

### **2.1.2 A biologia do câncer**

O câncer é a expressão dada ao conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo estender-se para outras regiões do corpo gerando metástases. Dado a rapidez com que estas células se dividem, estas tendem a ser bastante agressivas e incontroláveis estabelecendo o acúmulo de células cancerosas, concretizando a formação de tumores ou também as chamadas neoplasias malignas. Já os tumores benignos raramente representam um risco de morte e são constituídos de uma massa localizada de células que se multiplicam lentamente assemelhando-se ao seu tecido original (INCA).

Um dos eventos essenciais para o estabelecimento de tumores é a predisposição genética em conjunto com outros fatores (CHOI& MYERS, 2008). Desta maneira, ainda que fatores não genéticos possuam papéis essenciais em diversas etapas da tumorigênese, o câncer ainda é considerada uma doença genética (MICHOR et al., 2004). A mutação em duas classes de genes tem grande importância no desenvolvimento do câncer, os protooncogenes estimulam a proliferação tumoral, enquanto os genes supressores inibem os processos de divisão celular. Em conjunto, estas duas classes de genes são responsáveis pela proliferação descontrolada encontrada nos cânceres em humanos (RIVOIRE et al., 2001).

Por outro lado, existem estudos epidemiológicos que sugerem que a etiologia do câncer é multifatorial (KURODA et al., 2007), onde atuam tanto fatores extrínsecos (incluindo agentes externos) como fatores intrínsecos que incluem estados sistêmicos ou generalizados (CHOI& MYERS, 2008). Os agentes externos

relacionados a esta enfermidade podem ser categorizados como: (1) agentes carcinogênicos químicos (amianto, componentes de fumaça do tabaco, arsênico; (2) agentes carcinogênicos biológicos (infecções causadas por vírus, bactérias ou parasitas); (3) agentes carcinogênicos físicos (radiação ultravioleta e ionizante) (OMS).

Além destes fatores ambientais e genéticos, atualmente é amplamente aceito o conceito de valoração dos mecanismos epigenéticos durante a oncogênese. A epigenética é o estudo das alterações hereditárias na expressão de genes que não são acompanhadas pela mudança correspondente na sequência de DNA. Pesquisas envolvendo este tema deixam evidente que alguns fatores ambientais são capazes de alterar o epigenoma e aumentar o risco de desenvolvimento de câncer (MIKESKA& CRAIG, 2014).Três processos epigenéticos atuam na regulação da expressão de genes ao nível da cromatina, a metilação do DNA, a remodelação nucleossomal e as modificações covalentes das histonas (LAKSHMAIAH, et al. 2014).

A maioria dos estudos sobre o papel da epigenética em câncer têm-se centrado em investigações abordando análises das alterações no padrão de metilação genéticos em indivíduos saudáveis e doentes, permitindo assim a identificação de potenciais biomarcadores de metilação em câncer. Porém, apesar de promissores poucos destes marcadores biológicos até o presente estudo conseguiram ser aplicados a nível clínico (LAKSHMAIAH, et al. 2014).

Desta maneira a evolução na busca por biomarcadores de metilação do DNA apresenta significativa importância na área oncológica tanto na detecção precoce como no diagnóstico da doença. A detecção precoce aumenta as chances da escolha do tratamento ser eficaz, já biomarcadores prognósticos proporcionam informações com relação a sobrevida do paciente, enquanto biomarcadores preditivos são adequados para a determinação da resposta de um paciente a um determinado fármaco, como é o caso do biomarcador de resistência à cisplatina. Para este último a atenção é maior, pois através destes pode-se minimizar os encargos de saúde dos pacientes, aumentar a eficácia do tratamento, bem como para diminuir os custos com o tratamentos ineficientes (BROOKES & SHI, 2014).

### 2.1.3 Metilação do DNA e o câncer

A epigenética é definida como o estudo das mudanças ocorridas na expressão de genes, herdáveis durante a divisão celular, que não são atribuíveis as alterações da sequência genômica. A maioria das células de um indivíduo ainda que possuam características diferentes entre elas, contêm o genoma idêntico. A utilização seletiva do genoma é necessária para o estabelecimento de padrões de expressão gênica apropriados para que as células exerçam suas funções especializadas dentro do organismo. Estados patológicos podem surgir quando os mecanismos que controlam a expressão gênica de cada tipo celular não funcionam corretamente. Pesquisas atuais confirmam que os mecanismos epigenéticos encontram-se fortemente envolvidos com diversas doenças humanas, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos, doenças coronárias e o câncer (BROOKES & SHI, 2014).

A primeira descoberta sobre alterações epigenéticas em câncer foi relatada em 1983, quando a hipometilação global do DNA foi demonstrada. Passada uma década, a hipermetilação regional do DNA foi descrita como a principal causadora do silenciamento de genes supressores tumorais. Desde então um grande número de estudos demonstrou que os genomas das células cancerosas apresentam modificações significativas nos níveis de metilação do DNA, envolvendo genes relacionados com todos aspectos do processo canceroso, englobando o princípio do desenvolvimento tumoral, sua progressão e a resistência ao tratamento (HATTORI & USHIJIMA, 2014).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metila no carbono 5' do anel de citosina, tornando-a uma 5-metilcitosina. Esta modificação pós-transcricional ocorre em citosinas que precedem guaninas na sequência de DNA, ou seja, dinucleotídeos CpG (COSTA, 2008). Nos mamíferos 70% dos dinucleotídeos CpG estão metilados, este processo é indispensável para o desenvolvimento normal das células e encontra-se amplamente controlado. As enzimas responsáveis por este efeito são denominadas metiltransferases do DNA (DNMT [DNA methyltransferases]). As DNMT catalisam a metilação da citosina ao facilitar a transferência do grupo metila da S-adenosilmetionina ao carbono 5 da

citidina dos grupos CpG durante a replicação da mesma, mantendo assim de forma hereditária, o padrão epigenético na molécula filha de DNA (LIM et al., 2011).

Observa-se duas visões globais e contrapostas sobre esse tema; a hipometilação de regiões pobres em CpG, que deveriam permanecer metiladas; e a hipermetilação das ilhotas CpG localizada na zona promotora do gene (GOELZ et al., 1985). A hipometilação de genes pode contribuir com a carcinogênese através de três mecanismos: (1) instabilidade cromossômica; (2) reativação de transposons; (3) ativação de oncogenes. Por outro lado, a hipermetilação do DNA em regiões promotoras pode ocasionar a inativação de genes supressores tumorais assim como genes reparadores do DNA, resultando no aumento do dano genético de células cancerígenas (ESTELLER; 2003).

Além disso, o próprio tratamento com fármacos antineoplásicos, como a cisplatina pode favorecer a hipermetilação do DNA e os efeitos disso podem ser a inibição da expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose; como também de genes supressores de tumores diversos tipos de câncer (SHULZ, 2005). Atualmente o nível de metilação do DNA de determinadas regiões promotoras de genes específicos vem ganhando importância no campo epigenético como uma poderosa ferramenta de diagnóstico, terapia e prognóstico de câncer (MARTIN et al., 2008). Assim, analisa-se a hipótese de utilizar o estado de metilação de genes envolvidos na resposta celular a danos no DNA induzidos por drogas antineoplásicas como um potencial biomarcador de resistência ao fármaco. Alguns genes que poderiam ser utilizados para este fim seriam:

- a. ERCC1, ERCC4 e POLQ por possuírem papel na resposta aos danos induzidos pela cisplatina no DNA, os dois primeiros genes funcionam em conjunto durante processos de reparação do DNA (MARTIN et al., 2008)
- b. POLQ envolvido no processamento de danos no DNA produzidos por agentes indutores de ligações cruzadas, como a cisplatina (AGUIRREZABALAGA & SIERRA, 1995).
- c. TP53 gene supressor de tumoral, as proteínas P53 são chamadas de “guardiãs do genoma”, atuam como um sensor de danos no DNA e auxiliam o sistema de reparo. Mutações neste gene são observadas em mais de 50 tipos de tumores (PETITJEAN et al., 2007)

- d. BCL-2, BAX y CASP3 responsáveis por codificar proteínas que possuem um papel importante no processo de apoptose (ESTELLER; 2003).

## 2.2 Fármacos antineoplásicos

A quimioterapia é o termo utilizado para denominar todo método em que são utilizados compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é denominada quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral. O desenvolvimento do primeiro quimioterápico antineoplásico foi a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Posteriormente à exposição de soldados a este composto, analisou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos (INCA).

Os fármacos antineoplásicos atualmente são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação citotóxica (agentes alquilantes e antimetabólitos); a sua ação fisiológica (hormônios) e sua origem (produtos naturais). Já agentes que não se enquadram em nenhuma dessas categorias, como a cisplatina, são classificados como miscelânea. Na prática clínica a terapia medicamentosa antineoplásica subdivide-se em: (1) adjuvante (após tratamento cirúrgico e/ou radioterápico);(2) neo-adjuvante (antes do tratamento cirúrgico ou radioterápico definitivo); (3) paliativa; (4) curativa (ANVISA, 2014).

A maior parte dos antineoplásicos atua sobre células que encontram-se em qualquer ponto do ciclo celular, necessitando assim de proliferação celular para exercer seus efeitos citotóxicos, estes são denominados agentes dependentes do ciclo fase não específicos, neste grupo encontra-se a cisplatina. Alguns desses têm ação preferencial em uma fase específica do ciclo celular, sendo chamados de agentes dependentes do ciclo fase específicos. Existem ainda fármacos independentes do ciclo celular, estes agem sobre células que estão fora desse ciclo. Assim, as associações medicamentosas com agentes que atuam em diferentes

fases aparentemente possuem ação sinérgica no combate ao crescimento e evolução do tumor (ROITHMANN, 1998).

São conhecidos alguns princípios básicos neste tipo de tratamento, dentre estes sabe-se que a eficiência do tratamento depende da concentração efetiva do fármaco antineoplásico e do tempo em que as células são expostas a este. Por conseguinte, para obter a cura, são necessárias múltiplas injeções de quimioterápicos utilizando doses que condicionem que a taxa de destruição celular seja maior do que a de "repopulação" do tumor. Sendo assim, o objetivo fundamental do tratamento antitumoral é reduzir a zero o número de células neoplásicas cancerosas afetando o menos possível as células normais. Visando esses aspectos, na maioria dos casos utiliza-se a associação de antineoplásicos, tornando o tratamento mais eficaz e diminuindo o risco de aparecimento de resistência das células tumorais a quimioterapia (NEWELL, 2005).

O fator decisivo no sucesso da escolha do tratamento é o diagnóstico histológico da doença. Cada tipo de tumor, e conforme sua localização, tem história natural própria e resposta particular à quimioterapia. É importante conhecer a resistência da célula tumoral aos diversos antineoplásicos. A resistência pode aparecer no tratamento inicial (primária) ou emergir no momento de recidiva da doença (adquirida). Para controle da resistência são usadas associações medicamentosas, porém nem sempre este protocolo apresenta a eficiência necessária (ANVISA, 2014).

### **2.3 Cisplatina**

A cisplatina ou cis-diaminodicloroplatina (II) é um composto metálico, macroscopicamente descrito como um pó branco ou amarelo escuro com consistência cristalina à temperatura ambiente, estável sob temperaturas e pressões normais, ligeiramente solúvel em água e em N-Dimetilpropanamida e N-Dimetilformamida (IARC, 1981). A cisplatina possui peso molecular de 301,1g/mol e solubilidade em água de 2,53g/L a 251°C (HSDB, 2014).

Apesar do primeiro relato de síntese de cisplatina ter ocorrido em 1844 por A. Peyrone e sua estrutura química ter sido elucidada por A. Werner em 1893, o

interesse científico pelo composto foi despertado apenas um século depois. Rosenberg, no ano de 1960, durante seus estudos na Universidade Estadual de Michigan apontou que certos produtos de eletrólise da malha de platina seriam capazes de inibir a divisão celular em *Escherichia coli*, instigando o interesse dos pesquisadores da época quanto à possibilidade de utilização deste produto na quimioterapia do câncer. Até o final da década de 1970 a cisplatina já estava sendo considerada um componente essencial no tratamento sistêmico de células cancerígenas. Em 1978 este foi primeiro composto de platina aprovado pelo FDA para o tratamento do câncer (DASARI & TCHOUNWOU, 2014).

Desde então a cisplatina vem sendo amplamente utilizada como medicamento quimioterápico no tratamento de diversos cânceres, tais como pulmão, testículos, ovários, cabeça e pescoço, mama, bexiga, próstata e esôfago (STARITZ, 2003). O mecanismo de ação deste fármaco tem sido o foco de numerosos estudos (AEBI et al., 1996). Embora não esteja claramente estabelecido atualmente se considera que a entrada do quimioterápico na célula ocorre por difusão passiva, transporte ativo ou por combinação de ambos. Já a estrutura química da cisplatina, como mostrado na figura 1, trata-se de um complexo coordenado formado por um átomo central de platina, rodeado por dois átomos de cloro e duas moléculas de amônia na posição *cis* (FONTES et al, 2005).

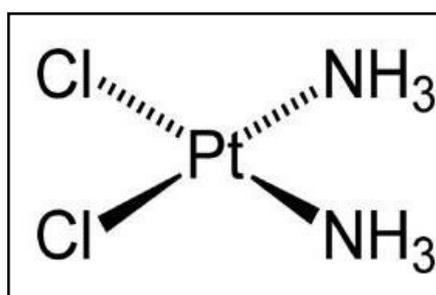


Figura 1 - Estrutura química da cisplatina. (Adaptado de Weiss and Christian, 1993).

Estudos demonstram que, antes de alcançar as células, os complexos passam por reações de substituição, sendo a mais importante a reação de hidrólise. Do lado externo da célula, no plasma sanguíneo, a concentração de cloreto é alta (cerca de 100 mmol/L), o que impede a hidrólise dos ligantes cloretos e mantém a molécula de cisplatina no estado neutro. Já no espaço celular interno, a diminuição na concentração de cloreto (cerca de 4 mmol/L) permite a hidrólise do complexo,

formando outras espécies que podem reagir mais prontamente (FONTES et al, 2005).

Sabe-se que o principal alvo de citotoxicidade da cisplatina é o DNA, assim em seguida de sua entrada no espaço celular, ocorre a interação covalente entre bases nucleicas de DNA (adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T)) e o monohidrato de cisplatina, gerando o aduto monofuncional denominado monoaduto. A ligação da platina com o DNA ocorre preferencialmente através de um dos átomos de nitrogênio de guanina ou de adenina. A interação mais estável é com o nitrogênio da guanina, pois é possível a formação de uma ligação de hidrogênio, conforme a figura 2, porém esta interação não ocorre com a adenina (BRABEC et al. 2005).

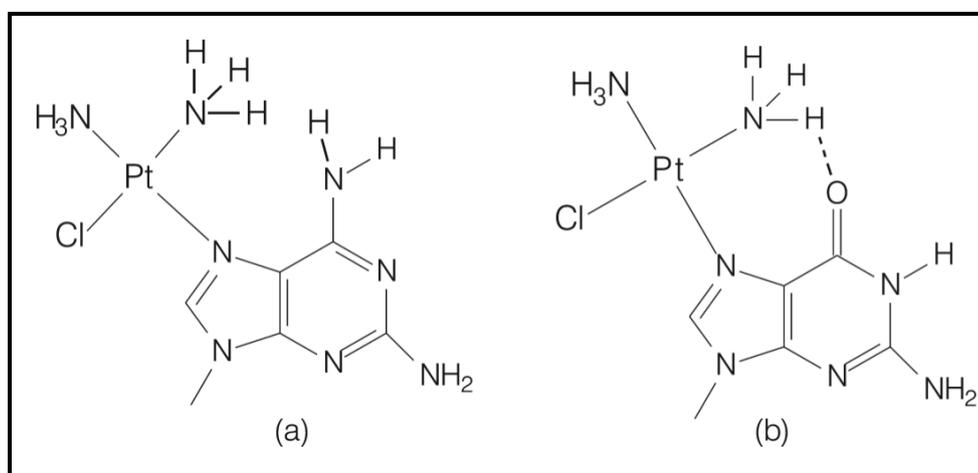


Figura 2 - Interações da platina com as bases adenina (a) e guanina (b). (Adaptado de Fontes et al, 2005).

Na sequência, o segundo átomo de cloro é hidrolizado, gerando um aduto estável bifuncional, também chamado de aduto bifuncional que por sua vez é capaz de distorcer a estrutura espacial do DNA (BRABEC et al. 2005). Assim, são dois os principais adutos que podem ser formados com o DNA, sendo eles, adutos monofuncionais (cada átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA) e adutos bifuncionais (cada átomo de platina se liga a duas posições do DNA). Este tipo de ligação pode ocorrer de três formas, (1) intrafita, quando as duas ligações ocorrem na mesma fita do DNA; (2) interfita, quando cada ligação é feita em uma fita diferente do DNA; (3) intermolecular: quando uma ligação da platina é feita com o DNA e a outra com uma proteína ou aminoácido (Figura 3) (JUNG & LIPPARD, 2007).

Sabe-se que dentre os adutos gerados neste processo, o mais estável e abundante (65%) é aquele obtido através da reação entre a cisplatina e duas guaninas adjacentes da mesma cadeia de DNA. Em menor frequência se formam adutos através da reação entre a cisplatina com a adenina ou guanina da mesma fita de DNA (25%) ou também com duas guaninas na mesma cadeia mas não adjacentes (6-10%). Apenas 1-2% dos adutos são formados com duas guaninas uma de cada cadeia de DNA (BRABEC, 2002). Ainda que as porcentagens sejam variáveis, a formação favorecida é a relação entre adutos intrafitas. (Figura 3) (DASARI et al. 2014).

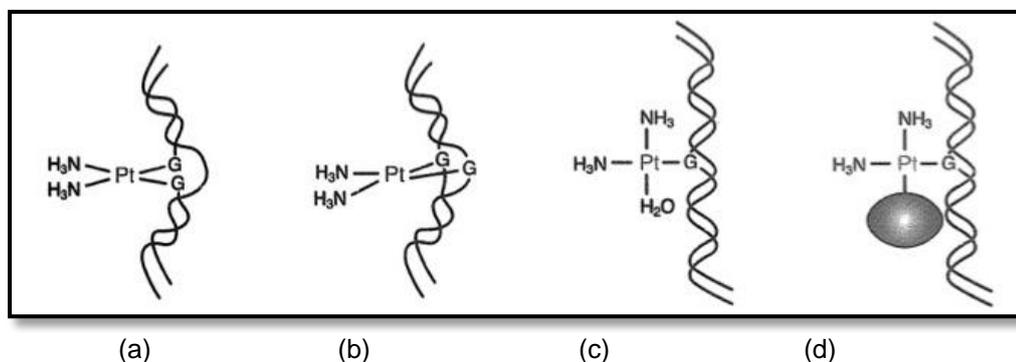


Figura 3 - União entre cisplatino e nucleobases do DNA. Tipos de adutos formados, (a) adutos intrafitas; (b) adutos interfitas; (c) monoadutos e (d) intermoleculares. (Adaptado de Jung & Lippard, 2007).

Desta forma, os adutos formados por cisplatina e os nucleotídeos de DNA são capazes de distorcer a estrutura espacial do DNA inibindo a replicação celular por produzirem erros de transcrição bloqueando a capacidade das cadeias de se separarem para que ocorra a replicação destas. Em alguns casos estes erros podem ser reparados, podendo ocasionar mutações genéticas. No entanto, quando este reparo não ocorre ou ocorre de maneira falha o próximo passo é a morte desta célula por apoptose (LIEBERTHAL et al., 1996; JAMIESON & LIPPARD, 1999).

Estudos demonstram resultados positivos tanto na regressão tumoral como na sobrevivência dos pacientes que apresentam altos níveis de adutos cisplatina. Dentro desta linha de pesquisa verificou-se que a coleta de células da mucosa bucal uma hora e cinco dias após a administração de cisplatina; pacientes com níveis elevados de adutos de cisplatina apresentaram uma sobrevivência de 30 meses, em comparação a 5 meses em pacientes com baixos níveis destes adutos. Desta maneira foi

observada uma forte associação entre os níveis de adutos e sobrevivência (DOOLS et al., 2006).

No entanto, embora a atividade antitumoral da cisplatina seja potente e amplamente utilizada, seu uso na clínica é limitado, principalmente devido a dois fatores: os efeitos colaterais ocasionados e o desenvolvimento de resistência ao fármaco (JUNG & LIPPARD, 2007). A resistência adquirida a cisplatina após seu tratamento é um dos fatores mais estudados atualmente, dado seu impacto sobre as taxas de sobrevivência dos pacientes com câncer. Atualmente o mecanismo específico causador desta resistência ainda não foi elucidado (STEWART, 2007). Contudo, algumas hipóteses vem sendo sugeridas no meio científico afirmando que os processos envolvidos estão relacionados com causas multifatoriais. Dentre estas as modificações antes da formação de adutos que resultam na alteração da concentração de fármaco intracelular, a falta de absorção do fármaco pela célula ou a sua inativação por tióis intracelulares, como a glutatona. Já após a formação dos adutos, a resistência pode ocorrer através de alterações nos mecanismos de reparação de DNA ou de disfunção de sistemas reguladores da apoptose (SIDDIK, 2003). Neste sentido, a hipermetilação do DNA atua como mecanismo de resposta às substâncias tóxicas como a cisplatina e aparentemente inibe a expressão de genes pró-apoptóticos, conferindo assim resistência da célula ao fármaco (NYCE et al. 1997).

#### **2.4 A metilação no DNA e seu efeito sobre a ação da cisplatina**

Atualmente um significativo número de pesquisadores vem buscando, em seus estudos, relacionar a metilação de diferentes genes importantes nas etapas da carcinogênese com o efeito deste acontecimento epigenético sobre a eficiência da ação da cisplatina. A fim de agrupar de forma resumida os principais estudos sobre o tema utilizou-se a pesquisa online como estratégia de coleta de dados, as fontes de pesquisa utilizadas foram: a National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO).

Durante a coleta das informações utilizou-se um protocolo de extração de dados onde para cada estudo foram analisado as seguintes: sobrenome do primeiro autor, tipo de câncer, metodologia empregada e principal resultado obtido. No total analisou-se 14 trabalhos, nos quais, os tipos diferentes de câncer incluídos resultaram em seis, entre eles câncer de pulmão, ovário, colorretal, esôfago, gástrico e glioma.

Ao final dentre todos os estudos incluídos, que tinham por objetivo investigar a correlação entre a metilação do DNA e a ação da cisplatina, dois apresentaram resultados significativos no que diz respeito ao aumento da sobrevida dos pacientes. Seis constataram aumento na sensibilidade ao fármaco quando os genes encontravam-se metilados positivamente e os seis restantes observaram maior resistência a cisplatina com a hipermetilação de seus promotores (Tabela 1).

Tabela 1 - Estudos associando a metilação do DNA com a atividade da cisplatina

Referência	Tipo de Câncer	Gene em estudo	Metodologia	Resultados
1. Rosell (2007)	Câncer de Pulmão	14-3-3 $\sigma$	PCR (metilação específico)	Aumento sobrevida
2. Ramirez et al. (2005)	Câncer de Pulmão	14-3-3 $\sigma$	PCR (metilação específico)	Aumento sobrevida
3. Menéndez (2012)	Câncer de Colo Retal	MLH1	-	Aumento sensibilidade à cisplatina
4. Zeller et al. (2012)	Câncer de Ovário	MLH1	HumanMethylation27 BeadChip	Aumento sensibilidade à cisplatina
5. Esteller (2003)	Tumores Sólidos	BRCA1	-	Aumento sensibilidade à cisplatina
6. Stefansson et al. (2012)	Câncer de Ovário	BRCA1	Imuno-histoquímica	Aumento sensibilidade à cisplatina
7. Chen et al. (2009)	Glioma	ERCC1	Imuno-histoquímica	Aumento sensibilidade à cisplatina
8. Zhang et al. (2014)	Câncer de Pulmão	GAS1	Microarrays	Aumento sensibilidade à cisplatina
9. Shen et al (2013)	Câncer Gástrico	SULF2	PCR (metilação específico)	Aumento resistência à cisplatina
10. Chang et al. (2010)	Tumores Sólidos	SAT	PCR (metilação específico)	Aumento resistência à cisplatina
11. Li et al. (2013)	Câncer de Pulmão	SOX1	PCR (metilação específico)	Aumento resistência à cisplatina
12. Lin et al. (2013)	Câncer de Esôfago	OCT1	Imuno-histoquímica	Aumento resistência à cisplatina
13. Cortés et al. (2013)	Câncer de Pulmão	IGFBP-3	Imuno-histoquímica	Aumento resistência à cisplatina
14. Caceres et al. (2010)	Câncer de Pulmão	IGFBP-3	Microarrays	Aumento resistência à cisplatina

Algumas das proteínas mais estudadas com relação ao câncer são as da família 14-3-3, estas desempenham funções importantes, incluindo a regulação da

apoptose e o controle do ciclo celular. Rosell (2007) avaliou a metilação de 14-3-3  $\sigma$  em DNA de pacientes tratados com cisplatina e observou que o tempo médio de sobrevivência foi significativamente maior no grupo com maior nível de metilação. Assim a metilação do tem sido considerada um novo fator prognóstico de sobrevivência. Em contraponto em um estudo onde participaram 115 pacientes com câncer de pulmão observou-se que o gene 14-3-3 $\sigma$  encontrava-se metilado em 34% dos pacientes, ao dividir os pacientes em respondedores e não respondedores ao tratamento com cisplatina, os primeiros pacientes quando não metilados apresentaram vezes mais possibilidade de não responder ao tratamento e morrer, do que os respondedores metilados para este gene (RAMIREZ et al., 2005).

Com relação ao gene MLH1, verificou-se tanto em câncer de ovário como colorretal que a desmetilação de seu promotor induz a maior sensibilidade ao tratamento com fármacos como a cisplatina (MENÉNDEZ, 2012). Em outros dois artigos concluiu-se o mesmo efeito porém desta vez com relação ao gene BRCA1, sendo este um gene supressor de tumoral envolvido com a regulação o ciclo celular (ESTELLER, 2003). Ademais, o do estado de metilação do promotores de ERCC1 (envolvido com a reparação do DNA) e GAS1 podem ser considerados como indicadores de quimiossensibilidade a cisplatina tanto em gliomas quanto em câncer de pulmão respectivamente (CHEN et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

Os genes IGFBP3, OCT1, SOX1, SAT e SULF2 quando hipermetilados foram associados ao aumento da resistência a cisplatina durante e após o tratamento quimioterápico. A metilação do promotor IGFBP3 foi analisada por dois estudos em linhas celulares de câncer de pulmão e ambos obtiveram resultados semelhantes (CORTÉS et al., 2013; CACERES et al., 2010). Tratando-se de OCT1, gene importante na captação celular de cisplatina, a relação entre a metilação e a cisplatina havia sido estudada em câncer de fígado e rim, nesta pesquisa o resultado anterior confirmou-se também em linhagem celulares de câncer de esôfago (LIN et al., 2013). Além disso, era conhecido que a longa exposição a cisplatina favorecia a metilação de SOX1 nas células de câncer do ovário, o objetivo do estudo foi testar a hipótese de que a resistência à cisplatina estava associada a alterações da expressão SOX1 em linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC), os resultados deste estudo comprovaram que a inativação

de SOX1 por hipermetilação do promotor, pelo menos em parte, é responsável pela resistência à cisplatina em NSCLC humana (LI et al., 2013).

Esses dados demonstram que o desenvolvimento científico atual nos permite estabelecer padrões de metilação genômicos que possibilitarão a identificação de potenciais biomarcadores confiáveis de metilação para o câncer. Porém, até então apenas alguns poucos marcadores biológicos candidatos à base de metilação do DNA atingem potencial para uso em âmbito clínico. Isso se deve ao fato de que cada biomarcador deve ser medido com precisão e de forma reprodutível, as diferenças na metilação entre casos e controles devem ser significativas (por exemplo, mais do que 50%) e os métodos utilizados para medição devem ser extremamente precisos (MIKESKA et al., 2014). Portanto, visto o grande potencial que estes biomarcadores possuem para contribuir para a medicina personalizada e as dificuldades encontradas até o momento, é fundamental conhecer, estudar e padronizar as metodologias utilizadas para detectar a metilação do DNA.

## **2.5 Ferramentas para quantificar o nível de metilação no DNA**

Atualmente há uma ampla gama de metodologias disponíveis para o estudo da ocorrência e localização da metilcitosina no genoma. Cada técnica possui suas próprias peculiaridades, assim ainda não foi encontrado um método que tenha demonstrado eficiência suficiente para ser aplicado a todos os tipos de estudos que visam a detecção e quantificação da metilação no DNA. Portanto, a metodologia a ser empregada deve ser escolhida conforme o objetivo específico da análise e caso seja necessário aplicando distintas técnicas simultaneamente.

### **2.5.1 Métodos baseados nas propriedades físico-química**

A separação entre bases nucleicas que compõe o DNA implica o uso de separações cromatográficas tanto de camada fina (TLC) como de alta resolução

(HPLC) utilizando distintos detectores. Atualmente o uso de detectores de massas (MS) permite a identificação e quantificação dos nucleotídeos de forma eficiente sem necessitar de um DNA puro ou de alta qualidade. Normalmente os sistemas HPLC-MS tornam necessária a digestão enzimática das amostras com nucleases e posterior desfosforilação das mesmas seguidas pela separação em colunas de fase inversa. Nestes sistemas além do tempo de retenção do nucleotídeo também pode-se utilizar o seu padrão de fragmentação para identificá-los em uma amostra em particular, as aplicações destas estratégias geram limites de detecção desejáveis valorizando a metodologia em questão (TRETAKOVA et al., 2013).

Outra possibilidade viável é utilizar a espectrometria de absorção (UV/VIS) para a detecção dos nucleotídeos. Uma das desvantagens da liberação das bases de DNA por meio químicos é que este método, antes mesmo da quantificação, envolve durante sua metodologia a produção de uma mistura complexa de moléculas tornando ainda mais difícil a detecção e quantificação da metilcitosina quando o DNA não encontra-se suficientemente purificado e/ou concentrado. Visto essa dificuldade uma possível solução seria utilizar a técnica de espectrometria de massas elementar como fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) mediante a detecção de  $^{31}\text{P}$ , dado que esta fonte de ionização rompe completamente as moléculas produzindo íons elementares de seus componentes (McGinnis et al., 2012).

Estudos atuais já vem empregando essa metodologia para determinação de modificações no genoma, como exemplo, na verificação de alterações na estrutura por danos oxidativos. No caso da detecção de nucleotídeos são produzidos íons de fósforo que podem ser quantificados com elevada sensibilidade neste tipo de equipamento. No entanto, uma vez que todos os nucleotídeos possuem semelhante composição elementar se tornará necessário que estes sejam separados previamente através de um sistema de cromatográfico visando distinguir estas moléculas (TRETAKOVA et al., 2013).

O equipamento ICP-MS vem sendo usado como um detector de especiação de compostos metálicos, semimetálicos e não metálicos, sendo que este último destaca-se devido à sua importância a nível biológico, por exemplo, o fósforo é um composto presente tanto nas fitas de DNA quanto em proteínas em modificações pós-traducionais que sofrem fosforilação. Portanto, uma possível maneira de

analisar a metilação do DNA poderia ser o acoplamento de um sistema cromatográfico em conjunto com espectrometria de massas elementar como fonte de plasma de acoplamento indutivo mediante a detecção de  $^{31}\text{P}$  (EDLER et al., 2005).

### **2.5.2 Métodos baseados na conversão enzimática**

Sabe-se que a quantificação do grau de metilação do DNA utilizando as metodologias de HPLC requerem o acesso a equipamentos sofisticados que nem sempre estão disponíveis. A marcação radioativa de sítios CpG utilizando ensaio metil receptor foi desenvolvida para resolver este problema, mas entre outras desvantagens da técnica, esta só pode monitorar mudanças na metilação CpG, e portanto metilações em sítios CpNpG não podem ser detectadas (WU et al., 1993).

O método de análise do estado de metilação é baseado na digestão enzimática do DNA para a obtenção das sequências de nucleotídeos ou nucleosídeos metilados e posterior detecção e quantificação destas (WU et al., 1993). Assim, a metodologia empregada utiliza a enzima DNA metiltransferase SssI bacteriana com a finalidade de transferir grupos metilas marcados com trítio a partir de S-adenosilmetionina (SAM) para citosinas não metiladas nos dinucleotídeos CpG. Os dados são obtidos a partir de um medidor de cintilação utilizado para calcular o número de grupos metila incorporados no DNA, desta maneira, a quantidade de trítio incorporada é inversamente proporcional ao nível de metilação de sítios CpGs (DUTHIE et al., 2000).

Esta forma de análise se consolidou com a verificação de modificações nos padrões de metilação do DNA em pacientes que sofreram de alguns tipos de enfermidades incluindo o câncer. Para permitir a quantificação do grau de metilação do DNA em regiões específicas do DNA atualmente, costuma-se fazer algumas alterações no protocolo do ensaios de SssI. Este enfoque quantitativo denominado metilação de ensaio regional enzimático (ERMA) proporciona informação de alta qualidade em relação a intensidade de metilação encontrada em uma sequência de DNA (GALM et al., 2001; GLORIA et al., 1996).

### 2.5.3 Métodos baseados na reatividade química

Geralmente, os métodos enzimáticos com base na admissão de grupos metil *in vitro* apresentam resultados imprecisos, mas reproduzíveis. Ainda assim, a metil citosina (5mC) possui diferentes sítios suscetíveis para reagir com diferentes moléculas que irão ser eficientes na distinção entre a metilcitosina e a citosina. A metilação do anel aromático provoca um aumento da densidade de elétrons deste promovendo as reações de adição de eletrofílicas e oxidação, enquanto são desfavorecidos reações de adição nucleofílicas (JORDÀ & PEINADO, 2010).

A presença de citosinas metiladas pode ser verificada através da oxidação da pirimidina. Assim, reativos como o  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{OsO}_4$  ou reativos de Fenton mostraram a característica de se gerar o glicol correspondente por oxidação da dupla ligação entre o C5 e C6 da pirimidina. Estes resultados também podem ser produzidos com a oxidação da timina que podem ser controlados para melhorar a seletividade da reação. Portanto, esta abordagem parece oferecer grande potencial para a detecção de citosina metilada em amostras de DNA (JORDÀ & PEINADO, 2010).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar novos sistemas analíticos para a detecção e quantificação do estado de metilação do DNA para posterior aplicação do protocolo desenvolvido em amostras reais de cultivos celulares das linhagens de câncer de ovário A2780 e A2780cis sensíveis e resistentes, respectivamente, à cisplatina, visando relacionar a porcentagem de metilação com a resistência ao fármaco em análise.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Separação cromatográfica dos nucleotídeos utilizando sistemas de cromatografia de troca iônica, buscando a melhor resolução entre citosina e metilcitosina.

3.2.2 Detecção e quantificação das biomoléculas de interesse através da técnica de espectrometria de absorção (UV/VIS) e posteriormente aplicando o método de espectrometria de massas elementar como fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) mediante a detecção de  $^{31}\text{P}$ .

3.2.3 Aplicação das metodologias desenvolvidas em amostras reais de cultivos celulares das linhagens tumorais A2780 e A2780cis.

3.2.4 Relacionar os resultados percentuais de metilação do DNA obtidos com resistência à cisplatina.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Instrumentação

- a. Equipamento ICP-MS 7500 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipado com célula de colisão. A introdução da amostra para ao plasma foi realizada através de um nebulizador convencional tipo Meinhart ou por meio de um nebulizador microfluxo de PFA (Agilent microflow nebulizer)
- b. Equipamento HPLC composto por uma bomba de alta pressão (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) modelo 7125, com válvula de injeção de 20 $\mu$ L.
- c. Equipamento HPLC 1100 series (Serial DE43632518) Colcom (Agilent Technologies, Tokyo, Japan)

### 4.2 Materiais e Soluções

- a. Coluna analítica HPLC Teknokroma – Tracer Extrasil SAX 5 5 $\mu$ m 20 x 0,46
- b. Coluna analítica HPLC de troca iônica GE Healthcare Mono Q 5/50 GL 1/16"
- c. Padrões sólidos dos cinco nucleotídeos (nucleótidos 5'-monofosfato): 2'-deoxi-guanosina 5'-monofosfato (dGMP), 2'-deoxi-adenosina 5'-monofosfato (dAMP), 2'-deoxi-timidina 5'-monofosfato (dTMP), 2'-deoxi-citidina 5'-

- monofosfato (dCMP) (Sigma-Aldrich) e 2´deoxi-metil citidina (d5mCMP) de Fisher Scientific.
- d. Padrão sólido Calf Thymus DNA (Sigma-Aldrich)
  - e. Enzima Nuclease (Sigma-Aldrich)
  - f. H<sub>2</sub>O ultra pura obtida através sistema Milli-Q (Millipore Bedford, MA, USA)
  - g. Acetato de Amônio (NH<sub>4</sub>Ac) (Riedel-de-Haën, Honeywell Chemicals, Seelze, Germany)
  - h. Amônia (NH<sub>4</sub>OH) (Sigma-Aldrich)
  - i. Diidrogenofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>) (Merk)
  - j. Ácido fosfórico 99% (H<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P) (Fluka-Chemika)
  - k. Kit de extração de DNA (Kit Pure Link Genomic DNA MiniKit Cat. No. 1820-01 de Invitrogen)

### **4.3 Obtenção de células A2780 e extração de DNA**

A linhagem celular A2780 é derivada de câncer de ovário, sendo as células obtidas comercialmente e cultivadas em garrafas próprias para o cultivo nas seguintes condições: temperatura a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, meio RPMI, soro fetal bovino (10%) e antibiótico Plasmocín de uso comercial em uma concentração de 5µg/mL. Visando a obtenção destas células para análise, primeiro o meio foi retirado das garrafas, as células foram lavadas com PBS e dissociadas pela ação da tripsina, após adicionamos o meio de cultivo e passamos para um tubo separado, centrifugamos a 1100rcf por 5min, retiramos mais uma vez o meio e suspendemos as células em PBS. Para o manter cultivo celular foram realizadas a mesmas etapas até ao ponto de adicionar o meio de cultivo de acordo com a diluição desejada.

Posteriormente à obtenção das células as amostras foram submetidas a extração de DNA seguindo a metodologia determinada pelo fabricante (Kit Pure Link Genomic DNA MiniKit Cat. No. 1820-01 de Invitrogen). O volume final obtido de DNA foi de 100µL. A metodologia geral deste estudo pode ser verificada na Figura 4 de forma resumida.

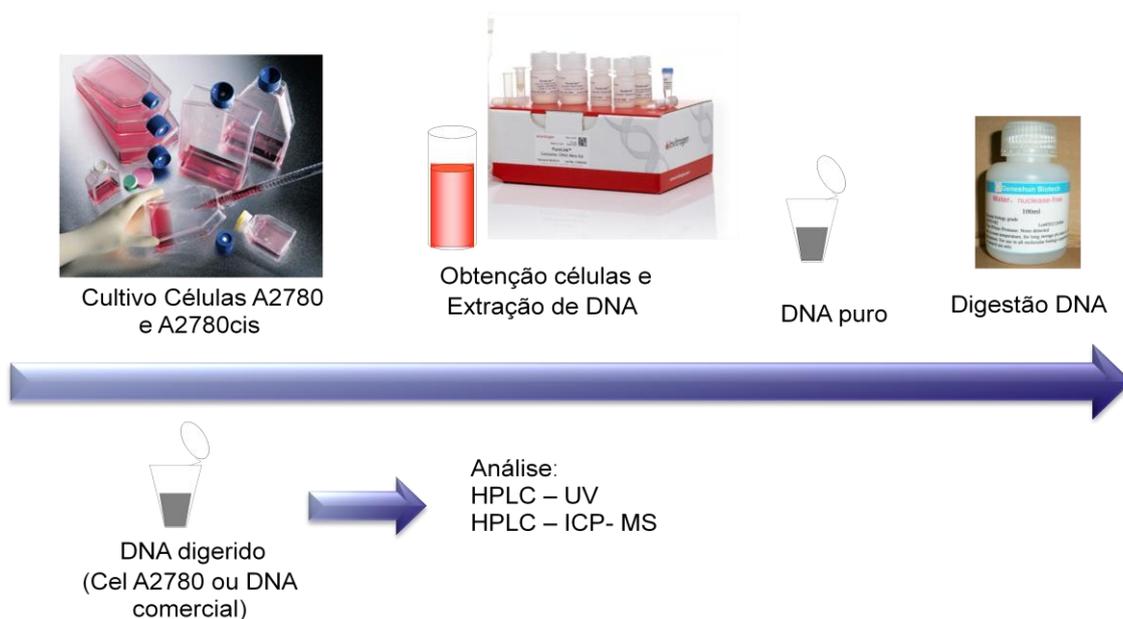


Figura 4 - Metodologia aplicada no estudo.

#### 4.4 Digestão do DNA

Para verificação da metilação do DNA e nucleotídeos separadamente foi necessária a digestão do DNA proveniente das amostras derivadas de DNA comercial e amostras extraídas de células A2780. Assim, foram utilizados 100 $\mu$ L de amostra de DNA em banho a 97°C por meia hora a fim de desnaturalizar o DNA, em seguida passamos ao banho de gelo por 5min. Por fim, adicionamos nuclease, enzima esta responsável por catalisar a ruptura de ligações fosfodiéster, como as encontradas nos ácidos nucléicos entre a pentose de um nucleotídeo e o fosfato de outro. Deixamos a enzima atuando por 14h em banho a 37°C e filtramos o conteúdo com uma membrana de ultrafiltração de 10KDA por 35min a 12RPM para eliminar a enzima.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Otimização HPLC-UV coluna tecknokroma SAX

Uma das formas de quantificar o estado de metilação do DNA é medir a relação existente entre citosinas metiladas e não metiladas através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No entanto a separação destas moléculas é complexa devido a similaridade encontrada entre as duas estruturas como mostrado na figura 5.



Figura 5 - Estrutura Citosina e Citosina Metilada.

Desta maneira, estudamos a composição da fase móvel a fim de comprovar se seria viável esta separação com a coluna de troca iônica. Utilizamos como dissolução de partida, o recomendado pelo estabelecimento comercial para separar este tipo de moléculas, fase móvel de 10mM de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Introduzimos padrões de citosina metilada e citosina não metilada com concentração de 100ppm utilizando a modalidade isocrática, ou seja, mantendo a mesma composição e concentração tanto na fase estacionária quanto na móvel sem variações durante o procedimento.

O restante das condições empregadas foram pH 3,5 e fluxo de 1mL/min. O gráfico obtido nesta análise encontra-se na figura 6.

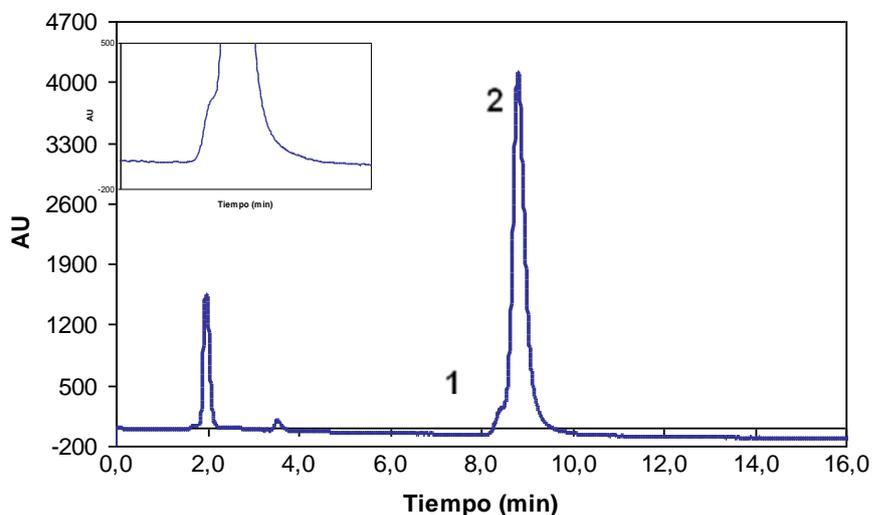


Figura 6 - Separação cromatográfica padrões de citosina metilada (1) e citosina não metilada (2) utilizando  $\text{HPO}_4^{2-}$  como fase móvel com concentração de 10mM, detecção UV a 260nm.

Analisando o cromatograma e partindo do princípio que estamos trabalhando com cromatografia aniônica podemos entender porque estruturas semelhantes são tão difíceis de saírem em tempos diferentes da coluna. Este tipo de cromatografia possui durante a fase móvel um tampão que controla a cargas dos solutos e um sal que compete com estes, devido a interação com as cargas da fase estacionária. Desta forma, através da fase móvel com íons de mesma carga que os contra-íons da coluna, podem provocar a retenção dos íons da amostra.

Sabendo que as moléculas em análise são estruturalmente parecidas e tendem a ter tempos de retenção na coluna semelhantes e não se desmembraram, bem com a metodologia inicialmente empregada, começamos os testes para modificar a composição da fase móvel visando obter picos distintos de citosina não metilada e metilada. A figura 7 retrata a mesma separação de citosina metilada e não metilada desta vez com fase móvel de 5mM de  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

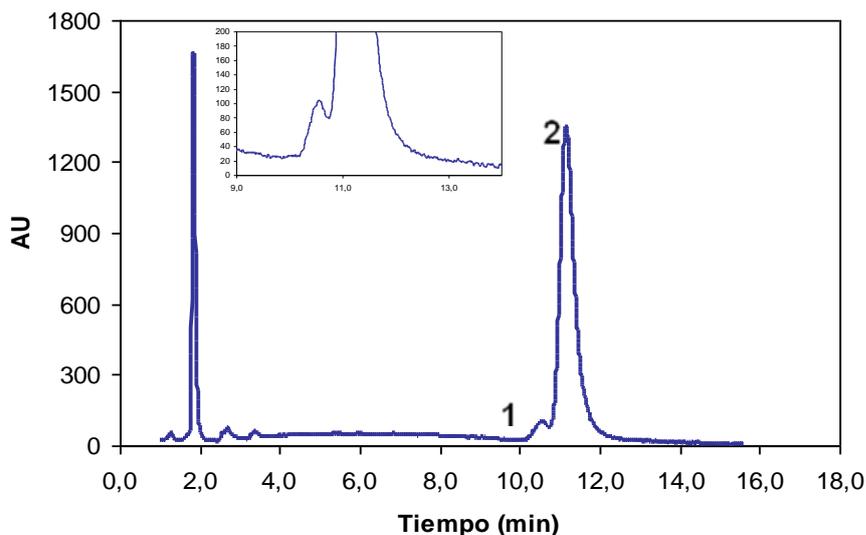


Figura 7 - Separação cromatográfica padrões de citosina metilada (1) e citosina não metilada (2) utilizando  $\text{HPO}_4^{2-}$  como fase móvel com concentração de 5mM, detecção UV a 260nm.

Quando colocamos em comparação os cromatogramas da figura 6 e 7 torna-se bastante claro que ao diminuir a concentração de  $\text{HPO}_4^{2-}$  da fase móvel de 10mM para 5mM conseguimos uma melhor separação entre a citosina não metilada e a citosina metilada (detalhes ampliados no bloco ao lado). Através desta separação podemos estimar os limites de detecção para a d5mCMP através da fórmula:

$$L.D. = \frac{3\sigma_{n-1}}{\text{sensibilidad}}$$

Resumidamente a fórmula quantifica a sensibilidade a partir da altura do pico por concentração de amostra (ppm) injetada no sistema. Segundo estes cálculos estimamos o limite de detecção de 0.4ppb de citosina metilada no cromatograma representado na figura 7.

## 5.2 Análise de DNA de timo de bezerro por HPLC-UV - coluna tecknokroma SAX

Durante o primeiro experimento com padrões de nucleotídeos ao diminuir a concentração da fase móvel obtivemos uma melhor separação entre as moléculas

de interesse, já que as diferenças sutis no coeficiente de partição dos compostos resulta na retenção diferencial durante a fase estacionária, e, portanto uma separação efetiva em função dos tempos de retenção de cada componente da amostra. Este fato afeta diretamente a separação a citosina metilada e não metilada. Portanto, podemos analisar que os picos encontravam-se totalmente unidos na figura 6. Utilizando a segunda metodologia a separação dos nucleotídeos ocorreu de forma mais eficiente, o que pode ser analisado com mais qualidade nas ampliações nas figura 6 e 7, demonstrando que obtivemos uma otimização efetiva do protocolo.

Tendo como princípio que tanto a resolução como os limites de detecção da d5mCMP obtidos na metodologia empregada demonstraram estar adequada a modificação do protocolo realizada, passamos à próxima etapa do experimento visando separar os demais nucleotídeos do DNA, citosina metilada(d5mCMP), citosina (dCMP), timina (dTMP), adenina(dAMP) e guanina(dGMP) em DNA obtido comercialmente a partir de timo de bezerro (calf thymus) digerido com nucleasa S1.

Desta forma o experimento foi realizado com as seguintes condições, separação no modo gradiente com fase A de 5mM e fase B 100mM de hidrogenosfosfato, ambas com pH 3,5, trabalhando com fluxo de 1ml/min e detecção a 260nm. Esta separação em modo gradiente permite acelerar a eluição dos compostos que em regime isocrático demorariam mais tempo para serem separados. Para isto programamos a combinação de fases móveis A e B utilizando um gradiente específico para a separação dos nucleotídeos de DNA comercial (Tabela 2).

Tabela 2 - Gradiente utilizado na separação de nucleotídeos

Tempo (min)	% B
0	0
12	0
25	50
27	50
27,5	0

Esse gradiente foi determinado dado que pode-se perceber na figura 6 que passados cerca de 10 minutos a metilcitosina e posteriormente a citosina começam a ser eluídas pela coluna. Portanto, mantivemos a concentração constante da fase móvel até que ambos estivessem eluídos e em seguida aumentamos até 50% da

fase B (100mM hidrogreno fosfato) buscando eluir os nucleotídeos restantes. Na figura 8, observa-se o cromatograma correspondente a amostra de DNA de timo de bezerro digerido com nucleasa S1, verificamos sinais para citosina e metilcitosina dentro do tempo esperado, seguidas por timina (22.5min), adenina (25min) e guanina (27min). Assim, obtivemos uma separação adequada de todas as moléculas em estudo em menos de 30 minutos utilizando o gradiente proposto.

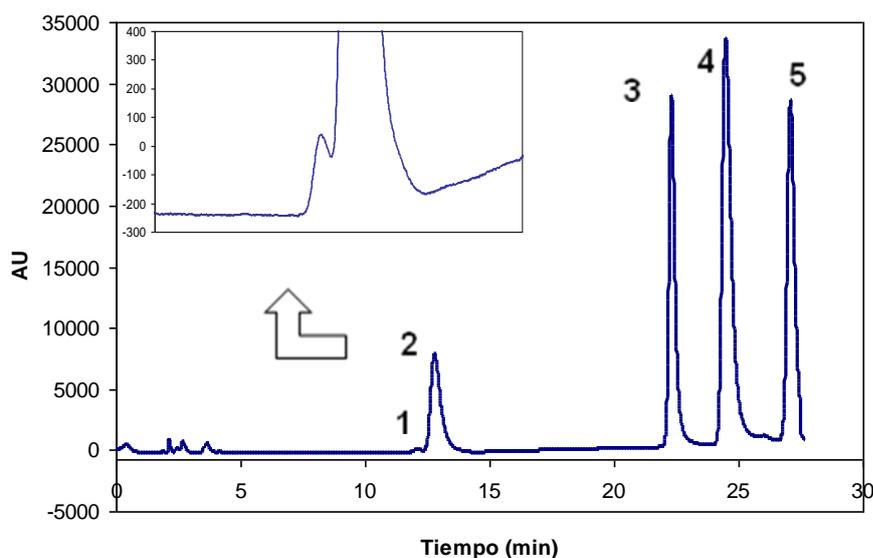


Figura 8 - Separação dos nucleotídeos do DNA comercial utilizando cromatografia de troca iônica e utilizando  $\text{HPO}_4^{2-}$  como fase móvel com concentração de 5mM, detecção UV a 260nm. Ordem de eluição: 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP e 5) dGMP.

Por meio dos picos demonstrados nos gráficos poderemos relacionar o pico de citosina metilada e citosina não metilada e assim obter a percentage de metilação encontrada nas amostras de timo de bezerra utilizando a fórmula:

$$\% \text{Metilación} = \frac{\text{Alturad5mCMP}}{\text{Alturad5CMP} + \text{AlturadCMP}} \times 100$$

Segundo a altura dos sinais obtidos na figura 8 podemos estimar a percentage de metilação do DNA de timo de bezerro de aproximadamente 3,2%. Este dado encontra-se em concordância com a literatura existente sobre o tema onde postula-se que as percentages de metilação para este tipo de amostras variam entre 3-4% .

### 5.3 Otimização HPLC-UV coluna Pharmacia

Continuamos os experimentos visando a posterior comparação entre as técnicas HPLC-UV e HPLC-ICP-MS. Para isto necessitávamos de fases que não possuíssem em sua composição fosfato, tendo em conta que pelo método HPLC-ICP-MS medimos o  $^{31}\text{P}$  dos nucleotídeos do DNA e neste sentido uma fase contendo este composto interferiria totalmente nos resultados. Assim, foi realizada a separação dos nucleotídeos do DNA (padrões) utilizando cromatografia de troca iônica e modificamos a coluna Tecknokroma SAX 5 pela coluna GE Healthcare Mono Q 5/50 GL. Essa é uma coluna de Pharmacia especial para trabalhar com biomoléculas, particularmente proteínas, mas também baseada na troca iônica. A diferença mais importante entre as duas técnicas é que neste caso o polímero suporte das partículas monodispersas da fase estacionária é hidrofílico e o tamanho das partículas é regular, o que permite esta metodologia trabalhar com pressões baixas.

Foram realizados diferentes ensaios em distintas condições com os padrões de nucleotídeos de 1mg/ml, o pH das fases encontrava-se em 6,8. Utilizamos como fase A uma solução contendo 1mM de  $\text{NH}^3$  e como fase B 1M  $\text{NH}^4\text{Ac}$  1mM de  $\text{NH}^3$  concentrado, com detecção UV a 260 nm, além disso variamos o gradiente (Tabela 3) tendo como objetivo selecionar qual destes seria o gradiente mais eficiente para separar os nucleotídeos em análise.

Tabela 3 - Gradientes de eluição C e D respectivamente

<b>Grad C</b>		<b>Grad D</b>	
Tempo (min)	% B	Tempo (min)	% B
0	5	0	5
17	8	17	8
19	18	19	18
25	30	20	19
30	50	30	50

A comparação entre metodologias utilizando diferentes gradientes pode ser realizada com o auxílio das figuras 9 e 10. Nestes métodos em ambos os gradientes não são encontrados problemas em separar a citosina metilada e citosina

não metilada. Contudo, ambos os apresentam problemas na separação entre os picos 2 e 3 (citosina e timina), provavelmente este efeito se deve ao fato que ao trabalhar com pH em torno da (pH= 6.8), por sua vez distante do realizado no experimento anterior, o pKb da citosina e timina é suficientemente próximo para que estas não consigam se separar mesmo nestas condições de gradiente.

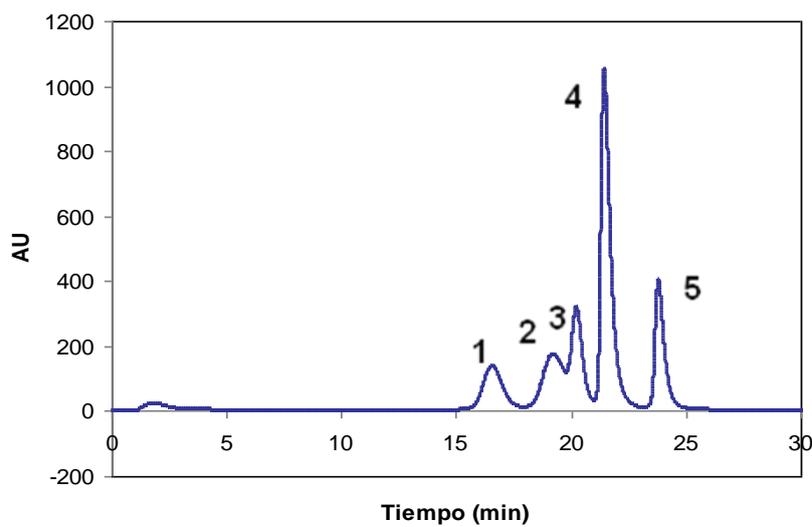


Figura 9 - Separação através da coluna Pharmacia dos nucleotídeos (padrões), detecção UV a 260nm. Utilizando acetato como fase móvel com o gradiente C (Tabela 3). Ordem de eluição: 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP e 5) dGMP.

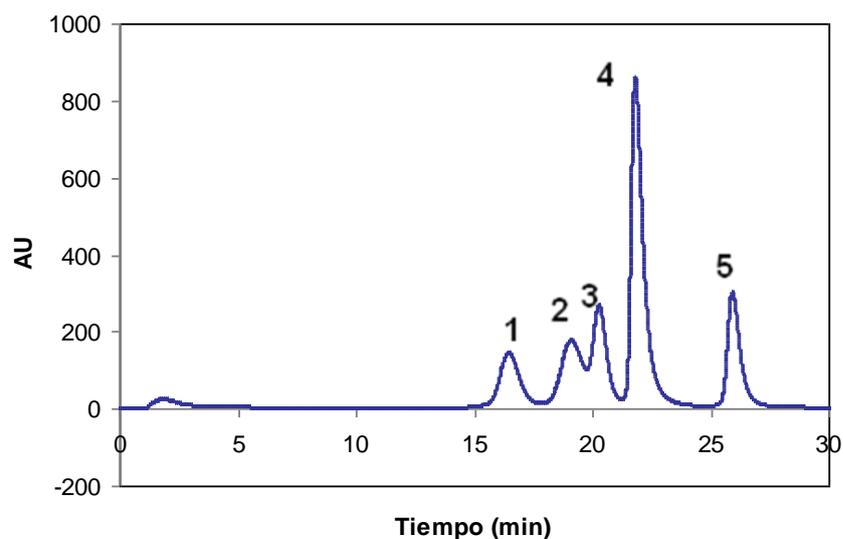


Figura 10 - Separação através da coluna Pharmacia dos nucleotídeos (padrões), detecção UV a 260nm. Utilizando acetato como fase móvel com o gradiente D (Tabela 3). Ordem de eluição: 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP e 5) dGMP.

Tendo em vista que a percentagem de metilação é calculada em relação a citosina total, obter uma separação adequada entre timina e citosina representa bastante importância para o método em questão. Deste modo, ao tentar otimizar o protocolo variando o gradiente verificamos que o gradiente D proporcionou a separação dos nucleotídeos de interesse mais efetiva. Por conseguinte, escolhemos o gradiente D para testar a separação dos nucleotídeos em DNA comercial de timo de bezerro (1mg/ml) digeridos com nuclease S1, utilizando as mesmas condições anteriores. O resultado obtido encontra-se na figura 11.

#### 5.4 Análise de DNA de Timo de Bezerro por HPLC-UV - Coluna Pharmacia

Durante esta etapa do estudo utilizamos as mesmas condições de gradiente da figura 9, abordou-se a separação dos nucleotídeos do DNA comercial depois de sua digestão enzimática com nuclease S1 como encontra-se especificado na parte experimental. Os resultados aparecem na figura 11, como observou-se no caso anterior, foi possível detectar a presença de metilcitosina no cromatograma (ver a ampliação) separada perfeitamente da citosina não metilada. O tempo total de eluição obtido foi similar ao que se verificou na figura 8.

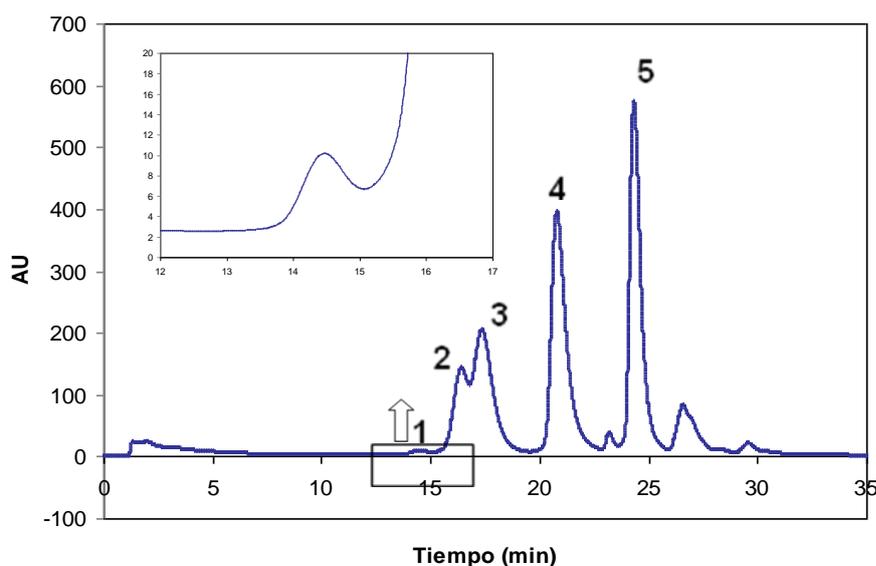


Figura 10 - Separação dos nucleotídeos de DNA comercial de timo de bezerro por cromatografia de troca iônica com coluna Pharmacia, detecção UV a 260nm, utilizando como fase móvel acetato com o gradiente D. Ordem de eluição: 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP e 5) dGMP.

## 5.5 Análise timo de bezerro por HPLC-ICP-MS

Tendo em vista a melhora da sensibilidade do método em estudo utilizou-se um detector de massas (ICP-MS) acoplado a cromatografia onde a partindo dos resultados positivos anteriores escolhemos empregar a coluna Pharmacia neste ensaio. A fim de realizar este tipo de medição foi necessário o acoplamento HPLC-ICP-MS, para isto foi preciso um tubo de tygon ser conectado a saída da coluna cromatográfica com o nebulizador do ICP-MS. Dado que os tipos de fases móveis empregadas nos ensaios anteriores são compatíveis com o uso do ICP pode-se conduzir o experimento utilizando apenas o acoplamento direto.

Sendo assim realizamos a detecção por ICP-MS ( $m/z$  31 del P) da separação da citosina metilada dos nucleotídeos de DNA de timo de bezerro, utilizando a coluna Pharmacia, a solução 1mM de  $NH^3$  concentrada como fase estacionária e 1M  $NH^4Ac$  1mM de NH como fase móvel, ambas possuindo pH igual a 6,8 e adotamos o gradiente D que já havia comprovada a sua qualidade de separação em HPLC-UV. A verificação dos resultados deste método pode ser visualizada no cromatograma da figura 12.

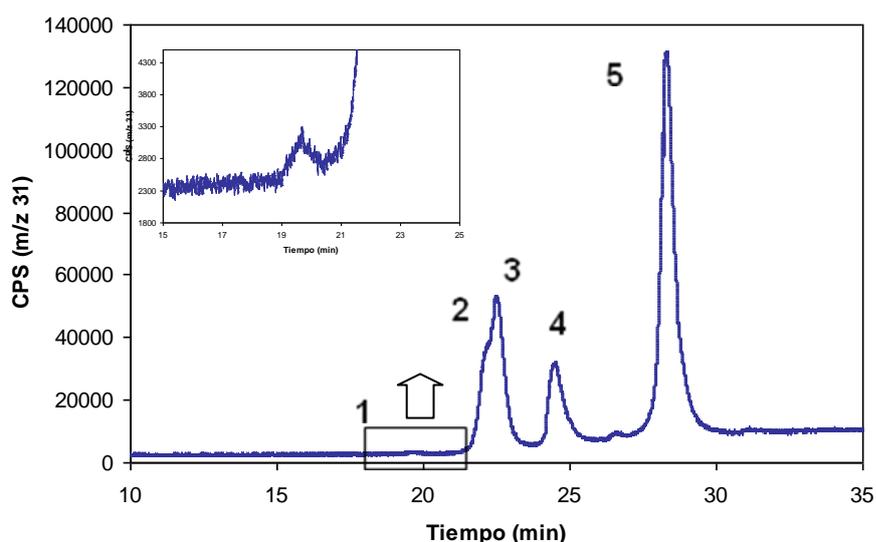


Figura 12 - Separação da 5mC dos nucleotídeos de DNA comercial de timo de bezerro utilizando cromatografia de troca iônica com coluna Pharmacia, detecção ICP-MS, acetato como fase móvel e gradiente D. Ordem de eluição: 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP e 5) dGMP.

Como pode-se observar, existe uma sobreposição entre os sinais de citosina e timina. Este efeito seguramente ocorre devido ao tubo de tygon utilizado para conectar o equipamento de HPLC ao ICP-MS que desta forma incrementa o volume morto do sistema e por consequência a ampliação parcial dos picos. Independentemente deste fato pode-se detectar a presença da citosina metilada (Figura 12) e neste caso, dado a sobreposição entre os picos da timina e citosina, decidimos abordar a quantificação diretamente com padrões de citosina metilada mediante a calibração externa.

A calibração proporcionou o ajuste de  $y = 534x + 10724$  ( $r^2 = 0.98$ ). Desta maneira através da equação da reta ao substituir a intensidade em altura do pico de 31P encontrada no pico 1 da Figura 12 obtivemos a concentração de metilcitosina analisada na amostra de timo de bezerro quantificada em 14,79ppm. Neste caso, calculamos a percentagem de metilação através da fórmula:

$$\% \text{Metilación} = \frac{[d5mCMP]}{[ADN]} \times 100$$

Assim, obteve-se 2,8% de metilação, o que resulta similar ao obtido com a outra coluna e o outro método de quantificação e mais uma vez concordando com os valores encontrados na literatura para metilação em DNA comercial de origem de timo de bezerro.

Por fim, foi realizada a análise da linhagens celulares de câncer de ovário resistentes e sensíveis à cisplatina (A2780cis, A2780 respectivamente), a fim de obter a comparação de todos os métodos que desenvolvemos até então em amostras DNA provenientes de cultivos celulares. Porém, até o fechamento deste trabalho nos experimentos aplicando as metodologias desenvolvidas não foi possível obter nenhum pico detectável para a d5mCMP. Uma justificativa provável para este resultado seria a baixa concentração de DNA do extraído das células que por sua vez é notavelmente inferior ao derivado comercial de timo do bezerro. Assim, uma solução cabível para esta questão seria aumentar a concentração de DNA extraído das linhagens de câncer de ovário.

Desse modo, com este trabalho de conclusão de curso ajustamos as condições necessárias para detecção por radiação ultravioleta e separação

cromatográfica da citosina metilada do restante dos nucleotídeos contidos no DNA, trabalhando em distintas condições de pH e fase móvel. Também estabelecemos o acoplamento direto da separação cromatográfica com ICP-MS através do detector específico de fósforo ( $^{31}\text{P}$ ), que nos permitiu desenvolver uma metodologia analítica bastante sensível e seletiva para determinação de metilação no DNA. Portanto, conforme os dados obtidos podemos concluir que ambas as metodologias proporcionam bons resultados analíticos, ainda que haja a necessidade de estudos que aperfeiçoem as técnicas melhorando a sensibilidade destas, até que seja possível a detecção de metilação diretamente em amostras de células sensíveis e resistentes à cisplatina.

## 6 Conclusão e Perspectivas futuras

A resistência adquirida como consequência do tratamento com cisplatina é um dos fatores que limita a atuação deste fármaco como agente antineoplásico, razão pela qual são necessários novos estudos para aprimorar o entendimento destes mecanismos, permitindo assim estabelecer biomarcadores confiáveis de resistência à cisplatina.

Nosso estudo demonstrou que o acoplamento direto da separação cromatográfica com ICP-MS como detector específico de fósforo ( $^{31}\text{P}$ ) permitiu a obtenção de uma técnica analítica sensível e seletiva para determinação da metilação do DNA, resultados estes confirmáveis através do limite de detecção obtido para a metodologia em questão. Assim, foi possível a separação cromatográfica da 5-metilcitosina dos outros nucleotídeos mediante ao uso de HPLC por detecção ultravioleta com dois tipos de coluna cromatográficas distintas, trabalhando em distintas condições de pH e fase móvel. Desta maneira, segundo nossos resultados analíticos, foi possível o desenvolvimento de três metodologias eficientes para verificação da presença de 5-metilcitosina em DNA derivado de timo de bezerro.

A continuidade deste projeto se dará visando o aperfeiçoamento de ambas metodologias na busca pela otimização dos protocolos aqui desenvolvidos para que seja possível a detecção da metilação diretamente em amostras de células sensíveis e resistentes à cisplatina, visando assim relacionar a porcentagem de metilação no DNA com a resistência do fármaco em análise.

## Referências

AEBI, S.; KURDI-HAIDAR, B.; GORDON, R.; AEBI, S.; KURDI-HAIDAR, B.; GORDON, R.; CENNI, B.; ZHENG, H.; FINK, D.; CHRISTEN, R.; BOLAND, R.; KOI, M.; FISHEL, R.; HOWELL, S. Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. **Cancer Research**, p. 3087–3090, 1996.

AGUIRREZABALAGA, I.; SIERRA, L. M.; COMENDADOR, M. A. The hypermutability conferred by the mus308 mutation of *Drosophila* is not specific for cross-linking agents. **Mutat. Res.**, v.336, p. 243–250, 1995.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, K.; KUNNUMAKKARA, A.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.; THARAKAN, S.; LAI, O.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097–116, 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).  
Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro\\_eletronico/neoplasia](http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia)>  
Acesso em: 05 nov 2014.

ATCC (American Type Culture Collection) .  
Disponível em: < <http://www.atcc.org/>>  
Acesso em: 10 nov 2014.

BAKKER, ANKE; FALK, L. A.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Hypomethylation of DNA from Benign and Malignant Human Colon Neoplasms. **Science**, v. 228, p.187–190, 1985.

BLANCO, A.; PLASENCIA, C.; CARDENAS, E.; LEGLEU, C.; LÓPEZ, E.; PACHECO, B. Antineoplásicos efectos de la metilación del ADN y la hidralazina

inhibidor de la histona deacetilasa inhibidor de ácido valproico en líneas celulares de cáncer. **BioMed Central.**, v. 6, p. 2-2, 2006.

BRABEC, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, 71:1–68, 2002.

BREVES, O. Cáncer de pulmón y tabaco en Asturias. Un estudio de casos y controles. **Originales Breves**, v. 17, n. 3, p. 226–230, 2003.

BROOKES, E.; SHI, Y. Diverse Epigenetic Mechanisms of Human Disease. **Annu Rev Genet.**, p. 237–268, 2014.

CACERES, I.; MORATILLA, C; CASTROCARPEN, J De. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, n. 29, p. 1681–1690, 2010.

CELA, R.; LORENZO, R.A.; CASAIS, M. C. Técnicas de separación en Química Analítica. **Ed. Síntesis**, 2002.

CHEN, Y.-T; LEE, P.; SHIN, J.; MHAWACH, P.; ODUNSI, K.; ALTORI, N.; SONG, C.; JIN, B.; SIMPSON, A.; OLD, L. Cancer/testis antigen CT45: analysis of mRNA and protein expression in human cancer. **International journal of cancer**, v. 124, n. 12, p. 2893–8, 2009.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, p. 14–33, 2007.

CORTÉS-SEMPERE, M; DE MIGUEL, M P; PERNÍA, O; *et al.* IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 10, p. 1274–83, 2013.

DASARI, S. & BERNARD, P.. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DUTHIE, S J; NARAYANAN, S; BLUM, S; *et al.* Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. **Nutrition and cancer**, v. 37, n. 2, p. 245-241, 2000.

EDLER, M.; JAKUBOWSKI, N.; LINSCHIED, N. Styrene oxide DNA adducts: quantitative determination using <sup>31</sup>P monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 205-211, 2004;

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncology**, v. 4, p. 351-358, 2003.

FONTES, A. P.; TEIXEIRA, C. E.; BERALDO, H. A química orgânica na terapia do câncer. **Cadernos Tem. Qui. na Esc.**, n. 6, p. 2–7, 2005.

GALM, Oliver; ROUNTREE, Michael R; BACHMAN, Kurtis E; *et al.* Enzymatic Regional Methylation Assay : A Novel Method to Quantify Regional CpG Methylation Density. **Methods**, v. 12, p.153–157, 2001.

GLORIA, Luisa; CRAVO, Marília; SOARES, Jorge. DNA Hypomethylation and Proliferative Activity Are Increased in the Rectal Mucosa of Patients with Long-standing Ulcerative Colitis. **Cancer**, v.78, n. 11, p. 6–8, 1996.

HATTORI, N.; USHIJIMA, T. Biochemical and Biophysical Research Communications Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer, **Biochemical and biophysical research communications**, 2014.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank.National Library of Medicine).  
Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen>>  
Acesso em: 06 nov 2014.

IARC, 1981. Cisplatin. In Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, pp. 151–164.

INCA (Instituto Nacional do Câncer).  
Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>  
Acesso em: 24 out 2014.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2014 – Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2014, 124 p.  
Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf)>  
Acesso em: 24 out 2014.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure , Recognition , and Processing of Cisplatin – DNA Adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, 1999.

JORDÀ, M.; PEINADO, A. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer. **Mutation Research**, v. 693, p. 84–93, 2010.

JUNG, W & LIPPARD, J. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA. **Damage. Chem. Rev.**, v. 107, p. 1387–1407, 2007.

KURODA, Y.; AISHIMA, S.; TAKETOMI, A.; NISHIHARA, Y.; IGUCHI, T.; TAGUCHI, K.; MAEHARA, Y.; TSUNEYOSHI, M. 14-3-3 Sigma Negatively Regulates the Cell Cycle, and Its Down-Regulation Is Associated With Poor Outcome in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. **Human pathology**, v. 38, n. 7, p. 1014–22, 2007.

LAKSHMAIAH, K. C. et al. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 469–78, 2014.

LI, Ning; LI, Xiaobing; LI, Suyun; *et al.* Cisplatin-induced downregulation of SOX1 increases drug resistance by activating autophagy in non-small cell lung cancer cell. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 439, n. 2, p. 187–90, 2013.

LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. **Am J Physiol**, V. 270, P. 700-8, 1996

LIM, S.; NEILSEN, P.; KUMAR, R. The Application of Delivery Systems for DNA Methyltransferase Inhibitors. **Biodrugs**, v. 25, p. 227-242, 2011.

LIN, R.; LI, X.; LI, J.; *et al.* Long-term cisplatin exposure promotes methylation of the OCT1 gene in human esophageal cancer cells. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 3, p. 694–8, 2013.

MARTIN, L. P.; HAMILTON, T. C.; SCHILDER, R. J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1291–5, 2008.

MCGINNIS, C., CHEN, B., & BARTLETT, G. Chromatographic methods for the determination of therapeutic. **Journal of Chromatography**, v. 883, p. 76–94, 2012.

MENÉNDEZ, Pablo; VILLAREJO, Pedro; PADILLA, David. **Epigenetics and colorectal cancer**. **Cirurgía española**, v. 90, n. 5, p. 277–83, 2012.

MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Dynamics of cancer progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 3, p. 197–205, 2004.

MIKESKA, T.; CRAIG, J. M. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. **Genes**, v. 5, n. 3, p. 821–864, 2014.

NEWELL, R. How to develop a successful cancer drug—molecules to medicines or targets to treatments. **Eur J Cancer**, v. 41, p. 676–682, 2005.

NYCE, W. Drug-induced DNA hypermethylation: a potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. **Mutat. Res.**, v. 386, p. 153–161, 1997.

OMS (Organização Mundial da Saúde).  
Disponível em: <http://www.who.int/en/>  
Acesso em: 22 out 2014.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; SEAN, V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of Mutant p53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53. **Human Mutation**, v. 28, p. 622–629, 2007.

RAMIREZ, J.; ROSELL, R.; TARON, M.; SANCHEZ-RONCO, M. . V. 14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9105–12, 2005.

RIBEIRO, C. D.; ROAD, D. U-Pb zircon in situ dating with LA-MC-ICP-MS using a mixed detector configuration. **Anais Acad. Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 275–295, 2012.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CARLETA, H. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p.179-184, 2001.

ROITHMANN, S. Fármacos antineoplásicos. Farmacologia clínica. Fundamentos da terapêutica racional. 2nd ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 317-27, 1998.

SCHULZ, W. Qualified Promise: DNA Methylation Assays for the Detection and Classification of Human Cancers. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 3, p. 227–229, 2005.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–79, 20 out. 2003.

SMITH, B.; SMITH, G.; HURRIA, A; HORTOBAGYI, N.; BUCHHOLZ, A. Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 17, p. 2758–65, 2009.

STARITZ, P.; KIENLE, P.; KOCH, M.; BENNER, A.; KNEBEL, M.; RUDI, J.; WEITZ, J. Detection of disseminated tumour cells as a potential surrogate-marker for monitoring palliative chemotherapy in colorectal cancer patients. **J Exp Clin Cancer**, v. 23, p. 633–639, 2004.

STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 63, p. 12–31, 2007.

TRETYAKOVA, N.; GOGGIN, M.; JANIS, G. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 25, n. 10, p. 2007–2035, 2013.

WU, Jianjun; ISSA, Jean-pierre; HERMAN, James; *et al.* Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 8891–8895, 1993.

Zeller, C.; DAI, W.; Steele, L.; *et al.* Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. **Oncogene**, v. 31, n. 42, p. 4567–76, 2012.

ZHANG, Y.; ZHENG, Y.; WANG.; Z.; LU, X.; WANG, Z.; CHEN.; GUAN, X.; TONG, D. Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. **Epigenetics**, v. 9, p. 896-909, 2014.