

DESENVOLVIMENTO DE METOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE METILAÇÃO EM LINHAS CELULARES TUMORAIS SENSÍVEIS E RESISTENTES A CISPLATINO

**JULIA SALLABERRY PINTO¹; TAMARA IGLESIAS GONZÁLEZ²; MARÍA
 MONTES-BAYÓN³**

¹Universidade Federal de Pelotas – juhsallaberry@gmail.com

²Universidade de Oviedo – t_iglesias@hotmail.com

³Universidade de Oviedo – montesmaria@uniovi.es

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, no tratamento de câncer, um dos quimioterápicos mais utilizados são os antineoplásicos. O *cis*-platino (*cis*-diaminodicloroplatino II) é um exemplo deste tipo de fármaco amplamente utilizado no tratamento de diversos cânceres. O mecanismo de ação utilizado por este dentro da célula causa modificações na estrutura espacial do DNA (Brabec et al., 2002). Estas alterações inibem a replicação do DNA mediante a produção de erros de transcrição e assim impossibilitando que as cadeias se separem para a replicação. Se a reparação não é produzida ou é incompleta, o resultado é a morte celular por apoptose. Porém, em alguns casos estes erros são reparados, o que ocasiona, entre outros efeitos, a resistência ao fármaco (Jung & Lippard, 2007).

A resistência ao cisplatino encontra-se entre os problemas mais importantes a serem estudados devido aos índices de sobrevivência observados em pacientes de câncer tratados com este quimioterápico. Todavia, ainda não se conhece qual o mecanismo responsável por este efeito. Entre os fatores que podem ser associados observam-se as modificações epigenéticas, dentre elas 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, se transformando em 5'metil-citosina. Geralmente os genomas das células cancerosas apresentam modificações importantes nos níveis de metilação do DNA. Estas alterações podem ser avaliadas mediante a análise de uma série de biomoléculas que, se estabelecidas, poderiam servir como marcadores para identificar possível presença de 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 separação dos nucleotídeos e da 5-Metilcitosina (d5mCMP). Para detecção e quantificação das biomoléculas de interesse utilizamos a princípio 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 ³¹P. 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 DNA não está suficientemente purificado e/ou concentrado (Cela et al., 2003). Dado 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, é produzido íons de ³¹P que podem ser quantificados com alta sensibilidade (Chemale et al., 2012).

Portanto, este estudo teve como objetivo investigar novos sistemas analíticos para a detecção e quantificação do estado de metilação do DNA afim de posteriormente aplicar o protocolo desenvolvido em amostras reais de cultivos celulares das linhas de câncer de ovário A2780 e A2780cis sensíveis e resistentes respectivamente a cisplatino, afim de relacionar a porcentagem de metilação com a resistência ao fármaco em análise.

2. METODOLOGIA

As células A2780 são derivadas de câncer de ovário e obtidas comercialmente (European Collection Cell Cultures, ECACC, Sigma), estas são cultivadas e submetidas a extração de DNA procedendo segundo as instruções do fabricante (Kit Pure Link Genomic DNA MiniKit. 1820-01 de Invitrogen).

Para verificar a metilação do DNA, através de cada nucleotídeo separadamente, fizemos a digestão do material genético. Para isto colocamos 100µL da amostra de DNA (calf thymus ou extraído das células) em banho a 97°C por meia hora para desnaturalizar o DNA, e um banho de gelo por 5 minutos. Adicionamos nuclease, que é uma enzima hidrolasa que catalisa a ruptura das ligações fosfodiéster. Deixamos a enzima atuando por 14 horas em banho a 37°C e filtramos o conteúdo com uma membrana de ultrafiltração (Centrifugal Uniter).

Por fim fizemos a análise de amostras de DNA comercial (extraído de timo de bezerro – Invitrogen) através da técnica de separação cromatográfica de alta resolução de troca iônica por detecção UV e ICP-MS utilizando a coluna cromatográfica Healthcare Mono Q 5/50 GL, esta é uma coluna especial para trabalhar com biomoléculas, particularmente proteínas. Visando uma posterior comparação entre as técnicas HPLC-UV e HPLC-ICP-MS necessitamos estabelecer fases que não utilizassem fosfato em sua composição, tendo em conta que por HPLC-ICP-MS medimos o ³¹P dos nucleotídeos.

Durante o estudo foram ensaiadas diferentes condições, com uso de distintas colunas cromatográficas, utilizando padrões de nucleotídeos para assim definir quais os parâmetros seriam estipulados para melhor separá-los. Ao final, utilizamos para os dois tipos de metodologias em análise as seguintes condições: Como fase estacionária uma solução contendo 1mM de NH₃ e como fase móvel 1M NH₄Ac 1mM de NH₃ concentrado, o pH das fases encontrava-se em 6,8, variamos o gradiente conforme a Tabela 1. Além disso, em detecções realizadas por UV o comprimento de onda utilizado foi de 260 nm.

Tabela 1- Gradientes utilizados para HPLC-UV e HPLC-ICP-MS

<i>Tempo (min)</i>	<i>% B</i>
0	5
17	8
19	18
20	19
30	50

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a otimização da técnica de HPLC-UV verificamos dificuldade ao separar os nucleotídeos desoxicidina 5'-monofosfato (dCMP) e desoximidina 5'-monofosfato (dTMP) (picos 2 e 3 Figura 1). Isto se deve ao fato de que ao trabalhar com um pH ao redor da neutralidade (pH= 6.8), o pKb dos dois

nucleotídeos não é suficientemente distante para separá-los. Sabendo que a porcentagem de metilação é calculada conforme pico observado para citosina metilada (d5mCMP) com relação a dCMP total, é importante ter um nível mínimo de separação entre estes picos.

Dentre os diferentes parâmetros testados durante os experimentos escolhemos utilizar o gradiente de eluição encontrado na Tabela 1 para fazer análise do DNA de timo de bezerro. Esta metodologia se destacou porque proporcionou uma separação mais efetiva dos nucleotídeos de interesse. Os resultados encontram-se em forma de gráfico na Figura 1, nele podemos detectar tanto a presença de metil citosina, como verificar que esta se apresenta separada perfeitamente da citosina não metilada.

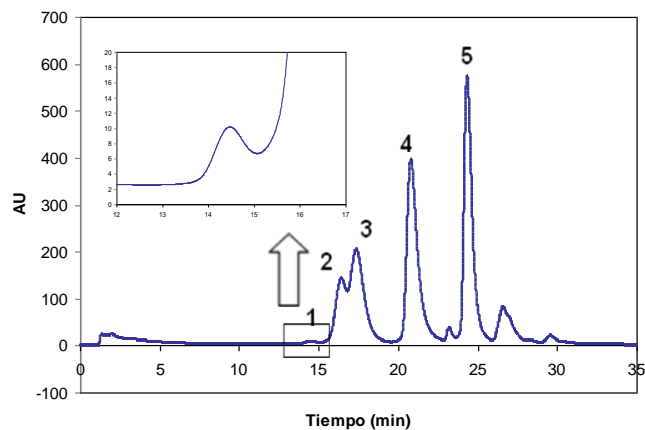


Figura1. Separação nucleotídeos de DNA comercial por HPLC-UV. 1) d5mCMP, 2) dCMP, 3) dTMP, 4) dAMP y 5) dGMP.

Com a finalidade de melhorar a sensibilidade dos resultados, utilizamos um detector de massas acoplado a cromatografia. As condições utilizadas para este método foram às mesmas anteriormente aplicadas para detecção UV. Como se pode observar na Figura 2, a interposição entre os picos de dCMP e dTMP encontra-se ainda maior, isto se deve ao mecanismo de conexão entre os dois equipamentos que incrementa o volume morto do sistema. De qualquer maneira, foi possível a detecção da presença de citosina metilada. Neste experimento decidimos abordar a quantificação utilizando o padrão de citosina metilada mediante calibração externa.

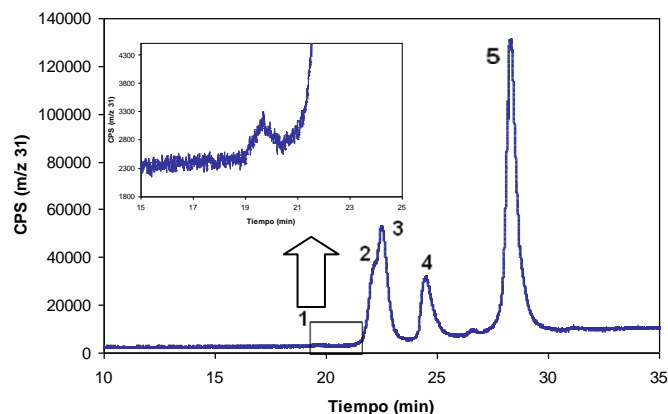


Figura 2. Separação 5mCMP dos nucleótidos de DNA comercial por HPLC-ICP-MS. 1) d5mCMP, 2 y 3) dCMP y dTMP, 4) dAMP y 5) dGMP.

Desta forma, observamos que a concentração de metil citosina existente na amostra estudada foi de 14,79 ppm, e, portanto, verificamos 2,8 % de metilação, o que se encontra compatível com a literatura existente sobre este tema onde se documenta porcentagens de metilação para este tipo de amostras entre 3-4%.

Além disso, para finalizar, fizemos a análise da linha celular A2780cis a fim de colocar em prática o que foi investigado até agora com amostras reais de células. Porém, até o fechamento deste trabalho não foi possível obter nenhum pico detectável para a d5mCMP, um dos motivos para este resultado foi que a concentração de DNA extraído das células era notavelmente inferior ao derivado do timo do bezerro.

Assim, com esta análise, ajustamos as condições necessárias para a separação cromatográfica da d5mCMP do restante dos nucleotídeos contidos no DNA, trabalhando em distintas condições de pH e fase móvel. Também estabeleceu-se o acoplamento direto da separação cromatográfica por ICP-MS através do detector específico de fósforo (^{31}P), que nos permitiu desenvolver uma metodologia analítica bastante sensível e seletiva para determinação de metilação no DNA. Portanto, conforme os dados obtidos e ao comparar os métodos utilizados podemos perceber que as técnicas de ambas as metodologias propostas proporcionam bons resultados analíticos, ainda que seja necessário melhorar a sensibilidade para poder detectar a metilação diretamente nas amostras de células.

4. CONCLUSÕES

Segundo os resultados analíticos, foi possível o desenvolvimento de duas metodologias eficientes para verificação da presença de d5mCMP em DNA comercial derivado de timo de bezerro. Porém, em ambas são necessários mais estudos que aperfeiçoem as técnicas até que seja possível a detecção de metilação diretamente em amostras de células sensíveis e resistentes a cisplatino.¹

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRABEC, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol**, 71:1–68, 2002.
- CELA, R.; LORENZO, R.; Casai, M. **Técnicas de separación en química analítica**. Madrid: Ed. Síntesis, 2002.
- JUNG, Y; LIPPARD, S. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chem. Rev.**, 107:1387–1407, 2007.
- STEWART, D. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 63:12–31, 2007.
- MARTIN, L.; HAMILTON, C; SCHILDER, J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. **Clin Cancer Res**, 14: 1291-1295, 2008.
- CHEMALE JR, Farid et al . U-Pb zircon in situ dating with LA-MC-ICP-MS using a mixed detector configuration. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 84, n. 2, 2012.

¹ Projeto realizado na Universidade de Oviedo (Asturias/Espanha) durante vigência da bolsa obtida através do Programa Ciências sem Fronteiras - Espanha fornecida pelo Governo Federal por meio dos Ministérios da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e do Ministério da Educação (MEC), e de suas respectivas instituições de fomento – CNPq e Capes –.