



**LUCIANA SOUTO MOFATTO**

**“ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE SEQUÊNCIAS DE  
DNA COM POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE G-QUADRUPLEX”**

**PIRACICABA  
2013**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**LUCIANA SOUTO MOFATTO**

**“ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE SEQUÊNCIAS DE  
DNA COM POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE G-QUADRUPLEX”**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA  
EM BIOLOGIA BUCO-DENTAL, NA ÁREA  
DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA.**

**Orientador: Sérgio Roberto Peres Line**

**Este exemplar corresponde à versão final da Tese  
defendida pela aluna Luciana Souto Mofatto  
e orientada pelo Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**

Assinatura do Orientador:

**PIRACICABA  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

M723a Mofatto, Luciana Souto, 1979-  
Análise estrutural e funcional de sequências de DNA com potencial de formação de G-quadruplex / Luciana Souto Mofatto. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Metilação de DNA. 2. Câncer. 3. Inflamação. 4. Própolis. I. Line, Sérgio Roberto Peres, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Structural and functional analysis of DNA sequences with potential for forming G-quadruplex

**Palavras-chave em inglês:**

DNA methylation

Cancer

Inflammation

Propolis

**Área de concentração:** Histologia e Embriologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Sérgio Roberto Peres Line [Orientador]

Paula Cristina Trevilatto

Marisi Aidar

Nilva de Karla Cervigne

Ana Paula de Souza Pardo

**Data de defesa:** 13-09-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 13 de Setembro de 2013, considerou a candidata LUCIANA SOUTO MOFATTO aprovada.

Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO

Profa. Dra. MARISI AIDAR

Profa. Dra. NILVA DE KARLA CERVIGNE

Profa. Dra. ANA PAULA DE SOUZA PARDO



## RESUMO

Os G-quadruplexes são estruturas secundárias de DNA altamente organizadas, constituídas por sequências ricas em guaninas capazes de formar tétrades ligadas por pontes de hidrogênio. Essas sequências são capazes de modular a transcrição gênica e o splicing alternativo de éxons. Além disso, estudos também mostraram que os G-quadruplexes estão presentes na região promotora de oncogenes (como *c-MYC*) e nas regiões terminais dos telômeros, indicando que o G-quadruplex pode ser um possível alvo terapêutico contra o câncer.

A metilação do DNA é uma modificação bioquímica que frequentemente aparece na posição C5 de citosinas da sequência do dinucleotídeo 5'- citosina guanina - 3' (CpG) em células eucarióticas. As alterações no padrão normal de metilação do DNA estão associadas a situações patológicas, como inflamação e câncer. Assim, a metilação anormal de citosinas pode ser responsável pela indução de câncer através de mutações pontuais em genes supressores de tumor presentes em células somáticas e germinativas.

Este trabalho propôs estudar a estrutura e estabilidade de G-quadruplexes de DNA e sua influência na metilação do DNA. Neste intuito foram realizadas análises para verificar se a formação de G-quadruplex no DNA dupla fita poderia influenciar no padrão de metilação de citosinas, utilizando oligonucleotídeos (ricos em guaninas e com sítio para metilação) que mimetizam a fita dupla de DNA. Também foi estudado: (1) a estabilidade de G-quadruplexes contendo mais de quatro tríades de G e a possível formação de G-quadruplexes em DNA fita dupla em ensaio "*in vitro*"; (2) a interação entre extratos de própolis e G-quadruplexes de DNA e (3) o efeito de estabilizadores de G-quadruplex (*TMPyP4* e *360A*) no padrão de metilação do DNA em cultura de linhagens de células normais e tumorais.

Palavras-chave: G-quadruplexes, metilação de DNA, câncer, inflamação, própolis, 360A, *TMPyP4*.





## ABSTRACT

G-quadruplexes are highly organized secondary structures of DNA, consisting of guanine rich sequences that form tetrads linked by hydrogen bonds. These sequences can modulate gene transcription and the alternative splicing of exons. Studies also showed that G-quadruplexes are present in the promoter of oncogenes (such as *c-MYC*) and terminal telomere regions, suggesting that the G-quadruplex can be a therapeutic target in cancer.

DNA methylation is a frequent biochemical modification that appears in C5 position of cytosine in the dinucleotide sequence 5' - cytosine guanine - 3' (CpG) in eukaryotic cells. Changes in the normal patterns of DNA methylation are frequently associated with pathologic situations, such as inflammation and cancer. Abnormal methylated cytosine may be responsible for induction of cancer due to mutations in tumor suppressor genes of somatic and germline cells.

The aim of this study was to analyze the structure and stability of G-quadruplexes of DNA and its influence on DNA methylation. It was verified if G-quadruplex formation of double-stranded DNA could influence the pattern of cytosine methylation, using oligonucleotides (sequences with methylation site and rich in guanine) that simulated double-stranded DNA. We also evaluated: (1) the stability of G-quadruplexes containing more than four triads of guanine and the possible formation of G-quadruplexes in double-stranded DNA by "*in vitro*" test; (2) the interaction between propolis ethanolic extracts and DNA G-quadruplexes and (3) the effect of G-quadruplex ligands (*TMPyP4* and *360A*) for DNA methylation in normal and tumor cell lines.

Keywords: G-quadruplex, DNA methylation, cancer, inflammation, propolis, 360A, *TMPyP4*.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1 - ESTUDO DA COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE DE G- QUADRUPLEX COM MAIS DE QUATRO TRIADES DE G E SUA POSSÍVEL FORMAÇÃO EM DNA FITA DUPLA .....	8
CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E QUADRUPLEXES DE DNA .....	26
CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO EFEITO DA PORFIRINA TMPyP4 NO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO DE MURINO.....	49
CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DO EFEITO DO ESTABILIZADOR DE G-QUADRUPLEX 360A NO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA.....	72
CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO.....	94



*Dedico este trabalho, em especial:  
À minha mãe Celia, por estar sempre  
presente em todos os momentos  
importantes da minha vida e por ser um  
exemplo de perseverança.  
Ao meu pai Paulo, pelo apoio, incentivo e  
sábios conselhos que me guiam.  
Aos meus irmãos Ana Paula, Ana Lucia e  
Paulo por sempre me incentivarem.  
Ao Alexandre, pelo companheirismo, total  
apoio e amor.  
Às saudosas vó Flora (i.m.) e tia Angela  
(i.m.), por terem sido exemplos como  
excelentes professoras e pessoas.*



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, **UNICAMP**, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **FOP**, por meio do Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, **coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP** e à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata de Oliveira Mattos-Graner, **coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP**.

Ao meu **orientador** Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, pela atenção, paciência, ensinamentos, confiança e amizade.

Aos docentes da **Área de Histologia e Embriologia**, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Paula de Souza Pardo, Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Darcy Tosello, pelos ensinamentos e convívio.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de doutorado e financiamento desta tese (#2010/07731-2).

À **minha família**: minha mãe Celia, minhas irmãs Ana Paula e Ana Lucia, minha avó materna Maria Flora (i.m.), Angela (i.m.), Celso (i.m.), Eneide (i.m.), Fernanda, Alberto, Ricardos, meus avós paternos Clarice (i.m.) e Narciso (i.m.), além de meu pai Paulo Marcelo, Cássia e meu irmão Paulo. Obrigada por todo respeito, inspiração, ensinamento, confiança, amizade, união e companheirismo. Sem vocês não conseguiria chegar onde estou hoje. Agradeço também à minha família agregada Dias Marangoni: José Tadeu, Maria Inês, Adriano e Glauce Crivelaro Nascimento. Obrigada pela consideração, pelo convívio, respeito e ótimos momentos que passamos juntos.

Ao **meu marido** Alexandre, pelo companheirismo, ótimo convívio, muita paciência, respeito, amizade, além de aceitar e apoiar as minhas escolhas. Muito obrigada e amo você.

Aos **queridos amigos** Danielle Portinho, Rodrigo Augusto da Silva e Denise Andia, companheiros de laboratório, risadas, discussões acadêmicas e

*estudo. Muito obrigada pela ajuda, pela amizade verdadeira e ótimo convívio com vocês.*

*A Renata Rocha de Oliveira, Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Migliorini Figueira, Dr<sup>a</sup> Beatriz Santos Capela Alves, do **Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LnBio)**, pelo auxílio técnico com as análises de dicroísmo circular e CD Melting.*

*Aos Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Marcos Guilherme da Cunha, Marcelo Franchin, Myrella Castro e Bruno Bueno Silva, do **Departamento de Farmacologia da FOP/UNICAMP**, pela parceria e doação dos extratos etanólicos e frações da geoprópolis e da própolis vermelha, além de toda atenção e paciência dispensadas.*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miriam Galvonas Jasiulionis e equipe, em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Fillipini Ierardi, do **Laboratório de Epigenética do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**, pela parceria, amizade, toda ajuda com os ensaios de metilação global dos melanócitos e células de melanoma e por toda atenção dispensada.*

*Aos pesquisadores Dr<sup>a</sup> Marie-Paule Teulade-Fichou, Dr<sup>a</sup> Corinne Guetta e Dr. Florian Hamon, do **Chemistry Laboratory (UMR 176) do Institut Curie – França**, pela atenção e doação da droga 360A.*

*Aos Prof. Dr. Edgar Graner e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, do **Departamento de Patologia da FOP/UNICAMP**, pelo auxílio das análises de citometria de fluxo das células HaCaT e KB.*

*Ao Dr. Paulo Baraldi, do **Departamento de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Limeira**, pela doação de amostras de sangue canino para o ensaio de influência do G-quadruplex no padrão de metilação de DNA. Infelizmente, não consegui padronizar o ensaio com essas amostras, que foram substituídas por oligonucleotídeos, mas mesmo assim muito obrigada por toda ajuda.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Célia Rocha Peres, pela amizade, compreensão e por também ter me orientado na iniciação científica durante a minha graduação em Odontologia, sempre me incentivando a seguir carreira acadêmica.*



À equipe do **Laboratório de Genômica e Expressão (LGE)**, em especial Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira, Marcelo Falsarella Carazzolle, Gustavo Lacerda, Ramon Vidal, Roberto Herai, Melline Fontes, Osvaldo Reis, Leandro Nascimento e Osmar V.C. Netto, pela amizade, convívio e pela oportunidade para trabalhar com bioinformática.

Aos meus **colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental**, Nádía Fayez, José Rosa Gomes, Juliana Neves, Naiana Viana Viola, Yamba Carla Lara Pereira, Rosario Martha De La Torre Vera, Leonardo Soriano de Mello Santos, Roger Antoniacci Guedes, Eduardo Arcanjo Urioste, Natássia Cristina Martins Oliveira, Juliana Pires Lance Francisco, Marta Delfina Bazzano Gonzáles, pelo ótimo convívio, momentos compartilhados e estudo.

A Adriano Luis Martins, Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Santiago Varella (Cidinha) e Ivani Demétrio, **funcionários da Área de Histologia do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP**, por toda ajuda, pelo divertido convívio e pela amizade.

A Suzete Neder, **secretária do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP**, pela atenção, paciência e por sempre estar disposta a me ajudar.

Aos meus **amigos da turma 48 de Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP**, especialmente Juliana F. Gaspar, Nádía F. Sinoti, Mariana Amade, Kelly S. Pimentel, Regiane do Amaral, Marília Okamoto, Mayra F. Leite e Luciana Ruiz, pela amizade de longa data e à distância, porém verdadeira.

E a **DEUS**, por me dar saúde, paciência e entusiasmo para seguir o meu caminho.



*“O truque está em não pensar muito a fundo naquilo que você quer fazer. Apenas deixe acontecer, como se fosse algo perfeitamente natural”.*  
*Douglas N. Adams (1952 – 2001) em “A Vida, o Universo e Tudo mais”.*



## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, aumentou a procura por alvos terapêuticos contra várias doenças, incluindo o câncer. Uma dessas abordagens iniciou-se com o estudo do G-quadruplex. Por sua vez, G-quadruplexes são estruturas secundárias de DNA compostas por sequências repetitivas ricas em guaninas (G) e organizadas em tétrades ligadas por pontes de hidrogênio do tipo *Hoogsteen* (Burge *et al.*, 2006). Estas estruturas são formadas por G-tétrades, isto é, arranjos compostos por quatro guaninas que se alinham no mesmo plano (devido às ligações por pontes de hidrogênio), deste modo, constituindo um quadrado coplanar (figura 1). Os G-quadruplexes foram descritos pela primeira vez por Gellert *et al.* (1962) como sequências ricas em bases de guanina que poderiam ser arranjadas de forma tetramérica e observadas por cristalografia por difração de raios X.

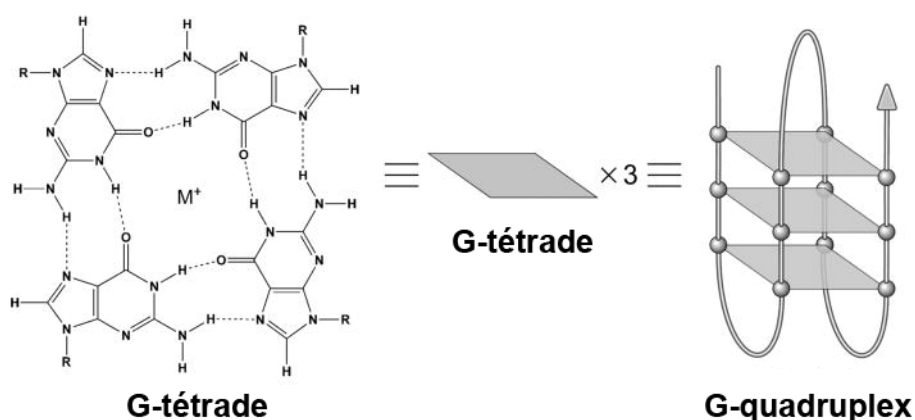


Figura 1 – A imagem mostra a associação entre guaninas formando uma G-tétrade. Depois de formadas, as G-tétrades se empilham umas sobre as outras constituindo a estrutura de G-quadruplex (Imagem adaptada e traduzida de Sun & Hurley, 2010).

As estruturas de G-quadruplex são dependentes de um meio contendo cátions, desde a sua formação até sua estabilização. No processo de empilhamento das G-tétrades, o potencial eletrostático negativo exercido por átomos de oxigênio das guaninas compõe um canal central ocupado pelos cátions

monovalentes (figura 1) (Gellert *et al.*, 1962; Burge *et al.*, 2006). O espaço entre duas G-tétrades também é ocupado por cátions, graças a interações cátion-dipolo com oito guaninas. Essas interações diminuem a repulsão eletrostática dos átomos de oxigênio centrais, aumentando a força das pontes de hidrogênio e estabilizando o empilhamento das G-tétrades (Parkinson, 2006).

Quanto à topologia dos G-quadruplexes, a associação mais simples dessas estruturas ocorre na presença de quatro fitas de DNA contendo curtas sequências de guanina repetidas (“*G-runs*”) intercaladas por nucleotídeos intervenientes de sequências mistas (“*loops*”), os quais normalmente não estão envolvidos na formação das G-tétrades (Parkinson, 2006). A topologia mais simples de G-quadruplexes foi descrita por Huppert & Balasubramanian (2005), baseada na equação:

$$d(G_{3+} N_{1-n} G_{3+} N_{1-n} G_{3+} N_{1-n} G_{3+})$$

Onde: *G* = número de guaninas envolvidas na formação de G-tétrades com comprimento de 3 ou mais guaninas; *N* = qualquer nucleotídeo formando uma sequência com comprimento igual a 1 ou *n*.

Para que ocorra a formação de G-tétrades, as fitas devem ter pelo menos quatro “*G-runs*”, as quais precisam ter três guaninas no mínimo cada um. A estabilização do G-quadruplex necessita do empilhamento de ao menos três G-tétrades. Quanto mais longos os “*G-runs*”, maior será a estabilidade do G-quadruplex (Hazel, 2004; Guédin *et al.*, 2010). Além disso, diferenças nos comprimentos e nas posições de “*G-runs*” e dos nucleotídeos que os separam (“*loops*”) podem interferir na formação e estabilização dos G-quadruplexes (Smirnov *et al.*, 2000; Hazel, 2004). Os “*loops*” são capazes de determinar a natureza do dobramento e a estabilidade de G-quadruplexes. Trabalhos mostraram que a presença de bases entre as G-tétrades pode afetar significativamente a estabilidade dos G-quadruplexes. Os nucleotídeos localizados nas regiões de ligação para sequências de formação de G-quadruplex são geralmente timinas e adeninas. A seleção de timinas ao invés de adeninas em “*loops*” conectantes pode ser um fator determinante para a estabilização do G-

quadruplex, já que a substituição de TTA no "loop" da sequência do telômero humano por AAA resultou na completa desestabilização da estrutura do G-quadruplex (Risitano *et al.*, 2003; Risitano *et al.*, 2004; Rachwal *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o estudo de G-quadruplex aumentou porque essas estruturas têm sido usadas como alvo para intervenção terapêutica, devido à sua presença nas extremidades teloméricas (Riou, 2004; Maizels, 2006; Neidle & Balasubramanian, 2006; Bates *et al.*, 2007). Blackburn (1991) descreveu a presença de sequências repetitivas ricas em G, localizadas no telômero, que eram capazes de formar estruturas estáveis e complexas, provavelmente envolvidas na manutenção dos cromossomos. Por sua vez, a telomerase é uma ribonucleoproteína transcriptase reversa capaz de prevenir o encurtamento progressivo do cromossomo após sucessivas divisões celulares através da adição de sequências repetitivas na extremidade 3', como repetições de d(AGGGTT) em humanos (Blackburn, 1991). Além disso, a telomerase possui baixa ou nenhuma atividade em células somáticas normais, mas é ativa em 90% das linhagens de células tumorais humanas, resultando em proliferação ilimitada dessas células (Han *et al.*, 1999; Neidle *et al.*, 2006). Alguns trabalhos desenvolveram drogas para estabilização do G-quadruplex com a finalidade de inibir a ação da telomerase, interferindo na replicação dos telômeros e sendo utilizados como agentes anticâncer (Hurley *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1997; Fedoroff *et al.*, 1998; Wheelhouse *et al.*, 1998; Mergny *et al.*, 1998). Dentre os ligantes de G-quadruplex descritos na literatura estão: porfirinas (TMPyP4), perilenos (PIPER), antraquinonas (1,4-bis-piperidino amido anthraquinone), carbocianinas (DODC), piridodicarboxiamidas (PDC) e piridodicarboxiamidas de nova geração (360A, 307A). Todas essas drogas são capazes de interagir com o G-quadruplex (Rangan *et al.*, 2001; Monchaud & Teulade-Fichou, 2008; Pennarun *et al.*, 2005).

A presença de G-quadruplex também está relacionada à regulação da expressão gênica. Vários estudos mostraram que essas estruturas estão presentes na região promotora de diversos oncogenes, tais como *c-MYC*, *K-ras* e *c-kit* (Eddy & Maizels, 2006; Rangan *et al.*, 2001; Huppert *et al.*, 2008; Cogoi *et al.*,

2004; Bejugam *et al.*, 2007). O oncogene *c-MYC*, quando expresso, está relacionado ao potencial de proliferação celular e inibição da diferenciação. Por isso, o *c-MYC* parece estar associado com vários tipos de cânceres, incluindo carcinomas de mama, cólon e útero, câncer de pulmão, osteossarcomas, glioblastomas e leucemias mielóides. Foi demonstrado que a estabilização do G-quadruplex pela porfirina *TMPyP4* gera a repressão do oncogene *c-MYC*, o que sugere os os G-quadruplexes como potenciais alvos moleculares para o design de pequenas moléculas para que interferiram seletivamente na expressão de oncogenes (Siddiqui-Jain *et al.*, 2002).

A epigenética pode ser entendida como mudanças herdáveis, pelos processos de mitose e meiose, na expressão dos genes sem que ocorra alteração na sequência de DNA (de Carvalho *et al.*, 2012; Yoo & Jones, 2006). Entre as regulações epigenéticas estão a metilação do DNA e as modificações de histonas (Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011). Por sua vez, a metilação do DNA é uma modificação bioquímica que ocorre frequentemente na posição C5 da citosina da sequência do dinucleotídeo 5'- citosina guanina - 3' (CpG), em células eucarióticas (Robertson & Jones, 2000; Jaenish *et al.*, 2003).

Em todo o genoma, as metilcitosinas aparecem distribuídas de forma não-aleatória. A maior parte das metilcitosinas estão próximas uma das outras e em regiões promotoras de sequências codificantes. Embora aproximadamente 4% das citosinas presentes no genoma são metiladas, as metilcitosinas são encontradas em cerca de 70-80% dos dinucleotídeos CpG (Attwood *et al.*, 2002). Neste contexto, são comumente encontrados no DNA genômico pequenos agrupamentos de sequências CG, denominados ilhas CpG. Apesar das ilhas CpG constituírem apenas 1% de todo o genoma e 15% do total de sítios CpG presentes no genoma, essas regiões possuem cerca de 50% dos dinucleotídeos CpG não-metilados (Robertson & Jones, 2000). No genoma humano existem cerca de 45.000 ilhas CpG localizadas, na sua maioria, dentro e próximas às regiões promotoras e aos primeiros éxons (Antequera *et al.*, 1993). Essas ilhas aparecem não-metiladas em células somáticas normais e metiladas nas ilhas CpG presentes



no cromossomo X inativo, no imprinting genômico (silenciamento epigenético de genes), em cultura de células “*in vitro*” e em células envelhecidas (Robertson & Jones, 2000; Laird, 2003). O restante dos nucleotídeos CG se encontram fora das ilhas CpG e estão, na sua maior parte, metilados (Attwood *et al.*, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, o DNA tende estar hipermetilado e esse perfil tende a alterar após o nascimento. O surgimento de DNA metilado pós-nascimento pode estar associado a situações patológicas. As alterações nos padrões normais de metilação do DNA podem levar a condições patológicas, incluindo câncer. Durante a tumorigênese, ocorrem mudanças nos padrões de metilação global resultando em hipermetilação de ilhas CpG e hipometilação de regiões fora dessas ilhas. Essa hipermetilação pode levar a silenciamento anormal de vários genes supressores de tumor de diversos tipos de câncer (de Carvalho *et al.*, 2012). A inibição da transcrição de um gene devido à metilação do DNA pode ser descrita pelo seguinte mecanismo (figura 2) (Attwood *et al.*, 2002): (A) A metilação dos CpGs inibe a ligação dos fatores de transcrição e a consequente transcrição do gene. (B) A presença das proteínas conectadas à metilcitosina (methylcytosine-binding proteins - MBPs) ligadas aos CpGs dentro de uma região promotora também bloqueia o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios de ligação. (C) As MBPs ligadas aos CpGs na região promotora formam complexos com desacetilases da histona e co-repressores, causando a desacetilação da histona, a condensação da cromatina e a inativação da estrutura transcricional da cromatina. A metilação da citosina pode ser responsável pela indução de câncer, por poder causar mutações pontuais em genes supressores tumorais (TSG) presentes em células somáticas e germinativas (Jones *et al.*, 1999). Ainda que a metilação de ilhas CpG resultam na inativação do gene e que as sequências metiladas silenciadas podem ser herdadas (Atwood *et al.*, 2002). A metilação anormal das ilhas CpG ocorrem comumente em células tumorais e podem servir para inativar genes como: Rb(6/77) (Retinoblastomas), VHL(5/26) (Células tumorais renais), Myf3 (3/3) (Câncer na bexiga), E-caderina (7/11) (linhagem de células), entre outros (Jones, 1996).

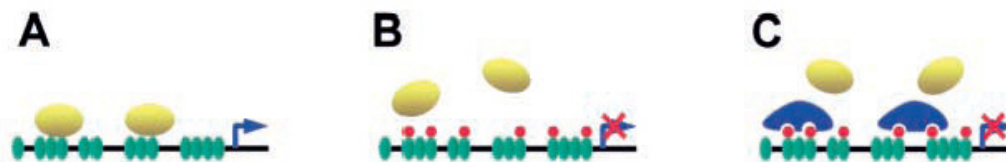


Figura 2 - Mecanismos nos quais a metilação do DNA inibe a transcrição do gene. Legenda: Ponto vermelho = radical metil ( $\text{CH}_3$ ); Linha preta = dupla fita de DNA; Oval verde = CpG; Oval amarelo = fator de transcrição; Triângulo azul = MBP; Seta azul = início da transcrição (imagem retirada de Attwood *et al.*, 2002).

Na literatura há relatos de correlação entre a estrutura de G-quadruplex e alterações epigenéticas como metilação de DNA (Majewski *et al.*, 2002; Hardin *et al.*, 1993; Halder *et al.*, 2010; De & Michor, 2011). Um destes trabalhos mostrou a existência de co-localização de regiões ricas em repetições de GGG e CpG no genoma humano, que se concentram principalmente nas regiões promotoras, no primeiro éxon e no início do primeiro íntron dos genes (Majewski *et al.*, 2002). Já em outro estudo foi demonstrado que a metilação de citosinas em bases vizinhas ao GGG estabiliza o complexo G-quadruplex (Hardin *et al.*, 1993). Halder *et al.* (2010) comprovaram através de análises de bioinformática que CpGs presentes em sequências de DNA com potencial para formação de G-quadruplex possuem baixo padrão de metilação, enquanto CpGs fora dessas regiões estão relativamente hipermetilados. Tsumagari *et al.* (2008) estudaram o padrão de metilação na região repetitiva do DNA D4Z4 em tumores primários humanos. Estes autores mostraram que em tecidos onde esta região aparecia hipermetilada existia uma sub-região que aparecia hipometilada. Esta região possuía G-quadruplex, sugerindo que a formação de quadruplex de guaninas podem interferir na metilação do DNA.

## JUSTIFICATIVA

A relação entre sequências com potencial de formação de G-quadruplex e metilação do DNA pode estar associada com possíveis alvos para

terapia anti-câncer. Para isso é necessária a compreensão desses mecanismos, deste modo, auxiliando no diagnóstico genético preditivo de sequências genômicas com potencial tumoral.

## **OBJETIVOS**

Esta tese possui como objetivos:

(1) Analisar a estabilidade e a frequência dos padrões de sequências de DNA com potencial para formar G-quadruplexes. Por este motivo, foram executados em ensaios “*in vitro*” que analisaram a estabilidade de oligonucleotídeos contendo G-quadruplex com mais de quatro tríades de guaninas e também a possibilidade de detecção da formação de G-quadruplex em DNA fita dupla.

(2) Estudar a interação entre extratos de própolis e oligonucleotídeos contendo G-quadruplexes de DNA, já que a própolis tem sido vastamente utilizada na medicina popular como um agente antiinflamatório.

(3) Verificar a possível influência de sequências com potencial de formação de G-quadruplexes no padrão de metilação do DNA. Com este intuito, foi analisado o efeito de estabilizadores de G-quadruplex, como as drogas *TMPyP4* e *360A*, no padrão de metilação do DNA em cultura de linhagens de células normais e tumorais.

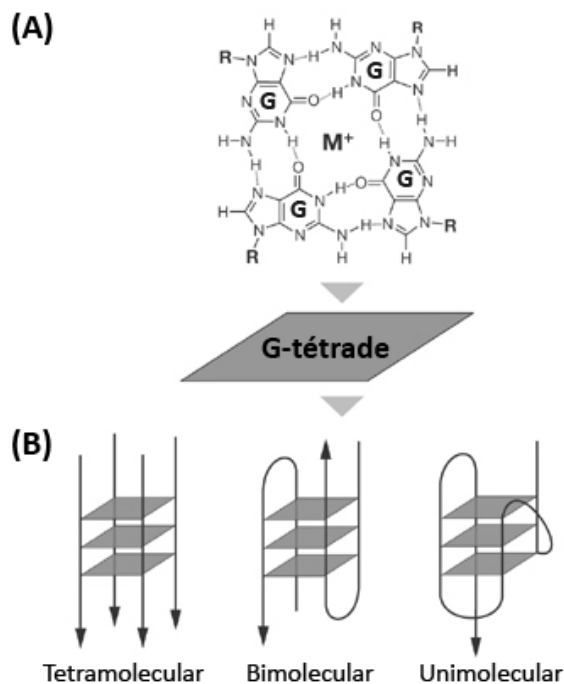
# CAPÍTULO 1 - ESTUDO DA COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE DE G-QUADRUPLIX COM MAIS DE QUATRO TRIADES DE G E SUA POSSÍVEL FORMAÇÃO EM DNA FITA DUPLA

## 1.1. INTRODUÇÃO

G-quadruplexes são estruturas secundárias de DNA (ou RNA) compostas por sequências repetitivas ricas em guaninas (G) e organizadas em tétrades ligadas por pontes de hidrogênio do tipo *Hoogsteen* (Burge *et al.*, 2006). Essas tétrades, então denominadas *G-tétrades*, são constituídas por quatro guaninas capazes de formar um quadrado coplanar. Além disso, a formação e a estabilização do G-quadruplex é cátion-dependente e está relacionada ao forte potencial eletrostático negativo exercido por átomos de oxigênio das guaninas, que constituem um canal central juntamente com os cátions no empilhamento da *G-tétrade* (figura 3A) (Gellert *et al.*, 1962; Burge *et al.*, 2006). Os cátions, geralmente monovalentes, localizam-se entre duas *G-tétrades* e, devido a isto, interagem de modo “cátion-dipolo” com oito guaninas. Essas interações diminuem a repulsão eletrostática dos átomos de oxigênio centrais, aumentando a força das pontes de hidrogênio e estabilizando o empilhamento das *G-tétrades* (Parkinson, 2006). Foi mostrado por Han *et al.* (2000) que sequências ricas em guaninas são capazes de formar rapidamente estruturas de G-quadruplex “*in vitro*” sob concentrações fisiológicas dos íons sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>).

Em relação à organização e à composição dos G-quadruplexes, estas estruturas requerem uma topologia específica para se auto-associarem. A topologia mais estabelecida está relacionada a quatro fitas de DNA contendo curtas sequências de guanina repetidas (“*G-runs*”), como  $[X_n G_p X_n]$ . Na equação anterior  $X_n$  constitui qualquer seqüência de nucleotídeo de comprimento  $n$  (denominado “*loop*”) e  $G_p$  é número qualquer de guaninas envolvidas na formação de tétrades com comprimento  $p$  (“*G-run*”) (Parkinson, 2006). Uma *G-tétrade* pode ser formada quando há, no mínimo, quatro “*G-runs*”, sendo que cada “*G-run*” deve ter, no mínimo, três guaninas. Além disso, quanto maior o tamanho dos “*G-runs*”,

maior será a estabilidade da estrutura G-quadruplex. Diferenças nos comprimentos e posições de “*G-runs*” e os nucleotídeos que as separam (“*loops*”) contribuem para a variedade estrutural do G-quadruplex (Burge *et al.*, 2006; Eddy *et al.*, 2006; Maizels, 2006).



**Figura 3 – Estrutura de G-quadruplex (traduzido de Bates *et al.*, 2007). (A) Associação de guaninas em G-tétrades, as quais são estabilizadas por pontes de hidrogênio do tipo Hoogsteen na presença de cátion monovalente (M<sup>+</sup>). (B) Tipos de topologias de G-quadruplexes de acordo com a quantidade de fitas de DNA: Tetramolecular (quatro fitas), bimolecular (duas fitas) e unimolecular (fita única).**

Há também diferentes topologias que estão relacionadas com a formação de G-quadruplex, as quais podem ocorrer de diversas maneiras: uma, duas ou quatro fitas separadas de DNA (ou RNA) podem determinar as formas uni, bi ou tetramoleculares respectivamente (figura 3B). Essas formas são consequências de várias combinações possíveis de direção de fita, assim como variações no tamanho do “*loop*” e da sequência. (Burge *et al.*, 2006). Além disso, outras características importantes relacionadas à estabilização de G-quadruplex

são os tamanhos dos “G-runs” e dos “loops”. Os “loops” são capazes de determinar como ocorrerá o dobramento e a estabilidade de G-quadruplexes (Smirnov *et al.*, 2000; Hazel *et al.*, 2004).

Este estudo possui como objetivos analisar a estrutura e estabilidade dos padrões de sequências de DNA com potencial para formar G-quadruplexes contendo mais de quatro tríades de guaninas. Também foi avaliado se é possível formar G-quadruplex em DNA fita dupla por ensaio “*in vitro*”.

## 1.2. MATERIAL E MÉTODOS

### ***Comparação da estabilidade de quadruplex contendo mais de quatro tríades de G em DNA fita simples.***

Sabe-se que G-quadruplexes com “loop” contendo somente uma base são mais estáveis do que G-quadruplexes contendo “loops” maiores (Kumar *et al.*, 2008). Sequências com uma base no “loop” tendem a ter conformação paralela (determinada pela espectroscopia de dicroísmo circular) enquanto que “loops” maiores tendem a conferir uma conformação antiparalela (Paramasivan *et al.*, 2007). Como há experimentos na literatura que utilizam oligonucleotídeos contendo sequências com apenas quatro tríades de guanina, e que sequências contendo regiões com mais de quatro tríades de guanina são abundantes no genoma humano (Huppert & Balasubramanian, 2005), analisamos a estabilidade (temperatura de desnaturação) e conformação (paralelo ou antiparalelo) de sequências que contém potencial para formação de mais de uma estrutura de G-quadruplex, ou seja, com mais de quatro repetições de tríades de guanina (mais de quatro “G-runs”). A base A foi escolhida nas regiões de “loop” devido ao fato de esta base ser a mais comumente encontrada nestas regiões em G-quadruplexes presentes no genoma humano (Todd *et al.*, 2005). Para isto, foram adquiridos oligonucleotídeos com as sequências listadas a seguir:

Nome	Sequência dos oligonucleotídeos	Descrição
L1	5' GGGAGGGAGGGAGGGATGGG	5 "G-runs" e "loops" de tamanhos (1,1,1,2).
L2	5' GGGAGGGAGGGAGGGATAATGGG	5 "G-runs" e "loops" de tamanhos (1,1,1,5).
L3	5' GGGAGGGAGGGAGGGATAATAATGGG	5 "G-runs" e "loops" de tamanhos (1,1,1,8).
L4	5' GGGAGGGAGGGAGGGATAATGGGAGGG	6 "G-runs" e "loops" de tamanhos (1,1,1,5,1).
L5	5' GGGAGGGAGGGAGGGATAATGGGAGGGAGGGAGGG	8 "G-runs" e "loops" de tamanhos(1,1,1,5,1,1,1)

As análises utilizaram as seguintes técnicas:

Dicroísmo circular (CD – circular dichroism):

Para o estudo do dicroísmo circular da região de repetição GGGGA os oligonucleotídeos (na concentração 10  $\mu$ M) foram ressuspensos em solução contendo TE (Tris-EDTA, pH 5.0) com concentrações de 5 mM e 100 mM de KCl (Paramasivan *et al.*, 2007). Também foram realizados experimentos usando amostras que continham 10  $\mu$ M de oligonucleotídeos e tampão (10 mM de cacodilato de lítio, pH 7.0) e 5 mM de KCl (Mergny *et al.*, 1998; Mergny *et al.*, 2009). A quantificação foi feita por análise espectrofotométrica de 220 a 320 nm. A análise espectral foi realizada em espectropolarímetro de Dicroísmo Circular *J-810* (Jasco, USA).

CD Melting:

A técnica de *CD Melting* tem sido amplamente utilizada para o estudo de G-quadruplex, pois permite realizar cálculos termodinâmicos dessas estruturas. A partir dos perfis de temperatura de *melting* é possível ter informações sobre a estabilidade dos G-quadruplexes. As mesmas amostras utilizadas no ensaio de dicroísmo circular foram utilizadas neste experimento, isto é, foram usadas soluções contendo 10  $\mu$ M de oligonucleotídeos em (1) tampão TE (pH 5.0) e 5 mM

KCl; (2) tampão TE e 100 mM KCl; e (3) tampão de 10 mM de cacodilato de lítio (pH 7.0) e 5 mM KCl. Essas soluções, com volume final de 400 µL, foram transferidas para cubetas de quartzo com comprimento óptico de 2 cm e seladas com 60 µL de óleo mineral (para evitar evaporação da amostra). Os perfis de *CD Melting* foram obtidos através do espectropolarímetro de Dicroísmo Circular *J-810* (*Jasco, USA*) com um controlador de temperatura tipo *Peltier* acoplado (*FDCD Cell Holder PFD-425S, Jasco, USA*). As amostras foram aquecidas em um gradiente térmico de 1°C/min iniciando em 0°C até 100°C, depois resfriadas em um gradiente térmico de 1°C/min de 100°C até 0°C. Os dados foram registrados durante este gradiente e o valor de absorvância foi configurado para ser o de maior pico obtido pela análise de dicroísmo circular. As temperaturas de *melting* foram calculadas de acordo com Mergny & Lacroix (2003).

Os experimentos de CD e *CD melting* foram realizados no laboratório de espectroscopia e calorimetria do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, SP.

### ***Estudo sobre a possível formação de quadruplex em DNA fita dupla.***

Este experimento foi realizado para verificar se é possível a detecção de G-quadruplexes em DNA fita dupla por meio das técnicas de dicroísmo circular e *CD melting*, descritas no item anterior.

Para tal, desenhou-se um experimento que simulou a fita dupla de DNA utilizando oligonucleotídeos complementares reversos. Assim, o oligonucleotídeo de escolha foi L5 e o seu complemento reverso (RL5), por apresentar maior valor de elipticidade no experimento anterior, isto é, L5 apresentou maior potencial para formar G-quadruplex. Desta maneira, os óligos utilizados foram:

<b>Nome</b>	<b>Sequência dos oligonucleotídeos</b>
L5	5' GGGAGGGAGGGAGGGATAATGGGAGGGAGGGAGGG
RL5	5' CCCTCCCTCCCTCCCATTTATCCCTCCCTCCCTCCC



Os ensaios “fita dupla de DNA” foram realizados com as seguintes reações:

(1) L5 na concentração de 10  $\mu$ M, com apenas tampão de cacodilato de lítio a 10 mM e KCl a 5 mM;

(2) L5 na concentração de 10  $\mu$ M, com tampão de cacodilato de lítio a 10 mM, KCl a 5 mM e RL5 a 2,5  $\mu$ M;

(3) L5 na concentração de 10  $\mu$ M, com tampão de cacodilato de lítio a 10 mM, KCl a 5 mM e RL5 a 5  $\mu$ M;

(4) L5 na concentração de 10  $\mu$ M, com tampão de cacodilato de lítio a 10 mM, KCl a 5 mM e RL5 a 10  $\mu$ M;

As amostras foram submetidas às análises por dicroísmo circular e *CD Melting*.

### 1.3. RESULTADOS

#### ***Comparação da estabilidade de G-quadruplex contendo mais de quatro tríades de G em DNA fita simples.***

##### *Dicroísmo Circular (CD)*

A análise de CD foi realizada com o intuito de comparar as amostras com os modelos pré-estabelecidos de conformação de G-quadruplex. Deste modo, pela característica da elipticidade, vista pelos gráficos (figuras 5, 6 e 7), concluímos que as amostras são formadas por quatro fitas paralelas, assim como foi demonstrado por Paramasivan *et al.* (2007) (figura 4C).

Em relação aos picos do CD, observamos que para eluição em TE e 5 mM de KCl (figura 5), não houve diferença entre as amostras L1, L2 e L3. Entretanto, as amostras L4 e L5 apresentaram maior quantidade de moléculas de G-quadruplex formadas, como já era esperado, devido à maior presença de *G-runs*. Já nas amostras contendo 100 mM de KCl e TE (figura 6) difere da análise anterior, pois apenas a amostra L3 apresentou graficamente pico maior em relação a L1 e L2, inferindo que haveria maior quantidade de moléculas de G-

quadruplex formadas devido à maior concentração de potássio. Na presença de cacodilato de lítio (figura 7), as cinco amostras se comportaram de modo semelhante à figuras 5, no entanto, a amostra L5 mostrou maior elipticidade.

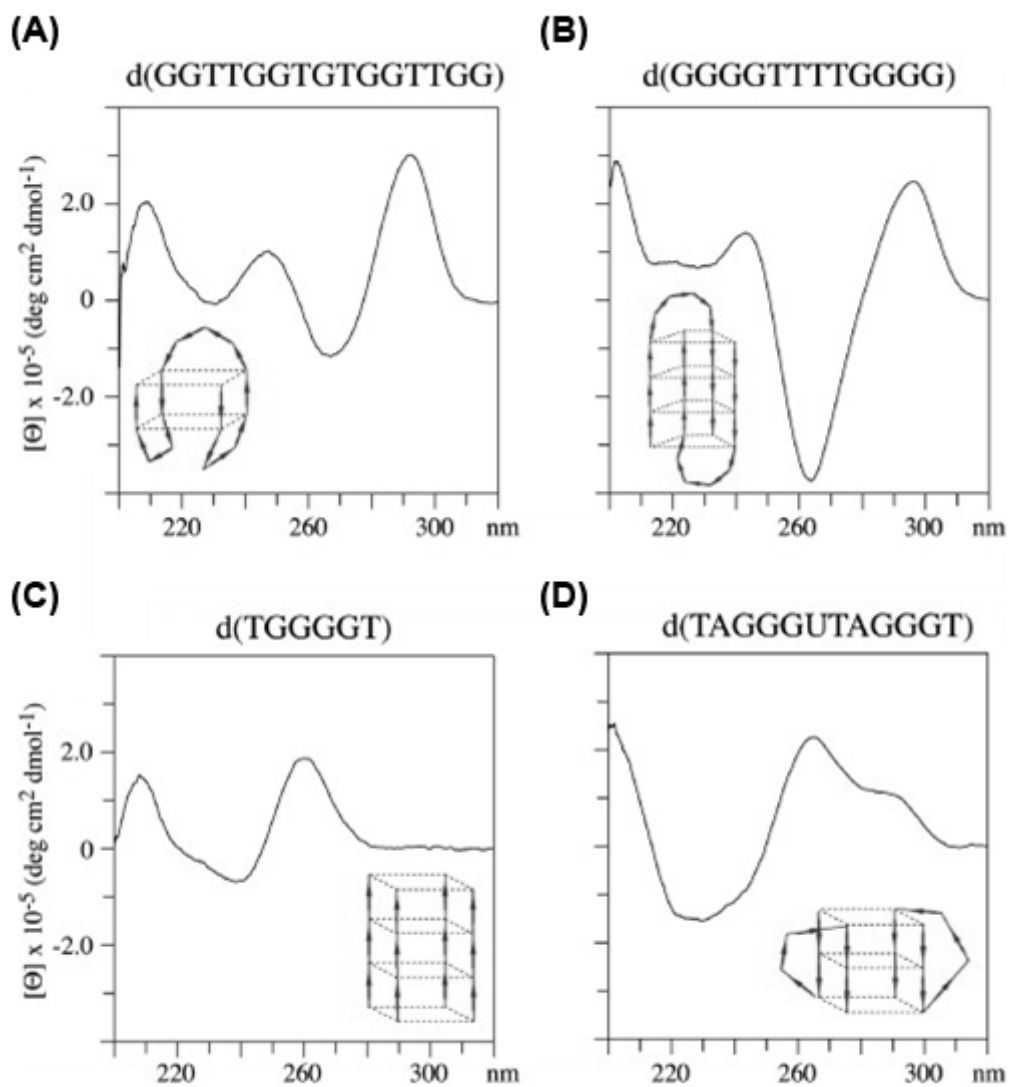


Figura 4 – Curvas determinadas pela metodologia de Dicroísmo Circular, as quais demonstram as conformações de G-quadruplex (Paramasivan *et al.*, 2007).

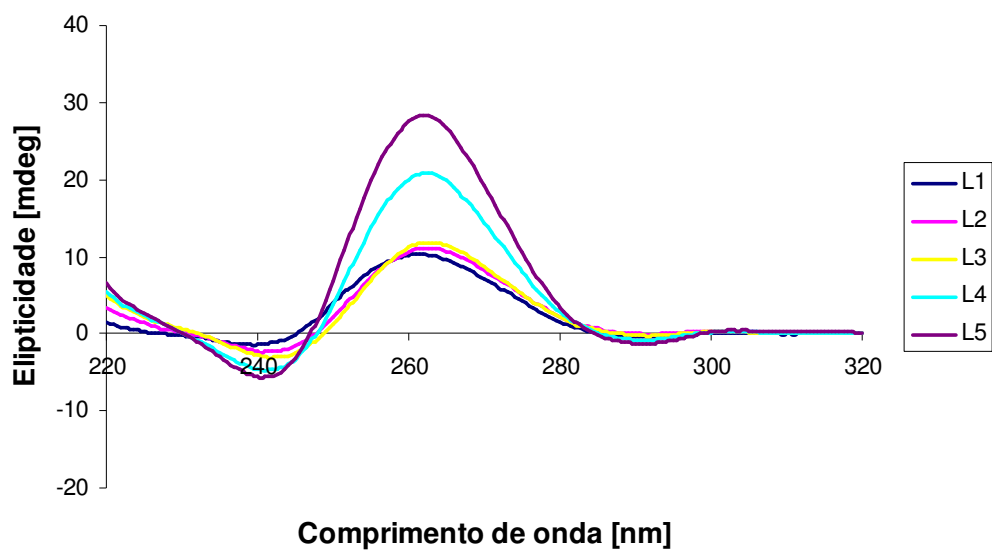


Figura 5 – Gráfico resultante da análise de Dicroísmo Circular com amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo TE e 5 mM KCl. O gráfico está expresso em graus de elipticidade (milidegrees = mdeg) por comprimento de onda (nm).

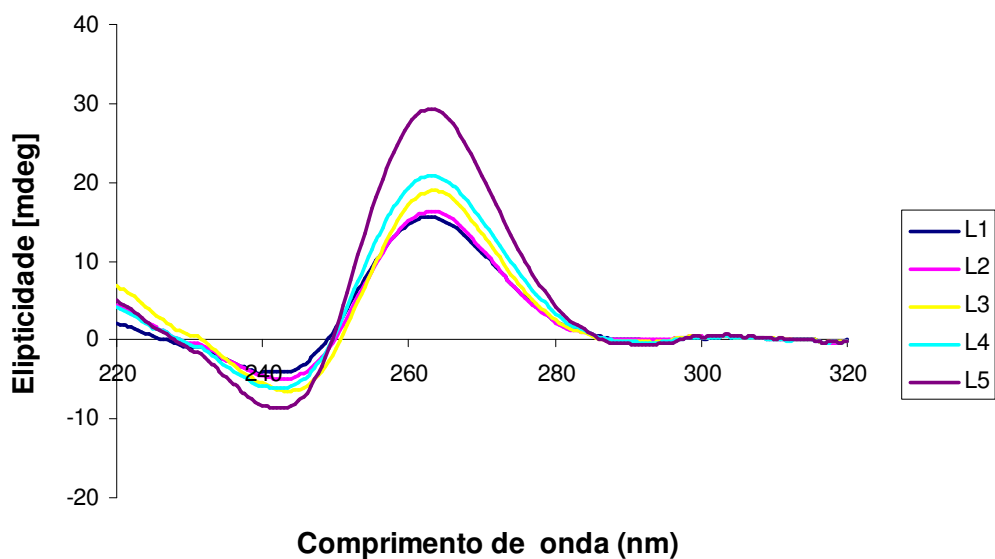


Figura 6 - Gráfico resultante da análise de Dicroísmo Circular com amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo TE e 100 mM KCl. O gráfico está expresso em graus de elipticidade (milidegrees = mdeg) por comprimento de onda (nm).

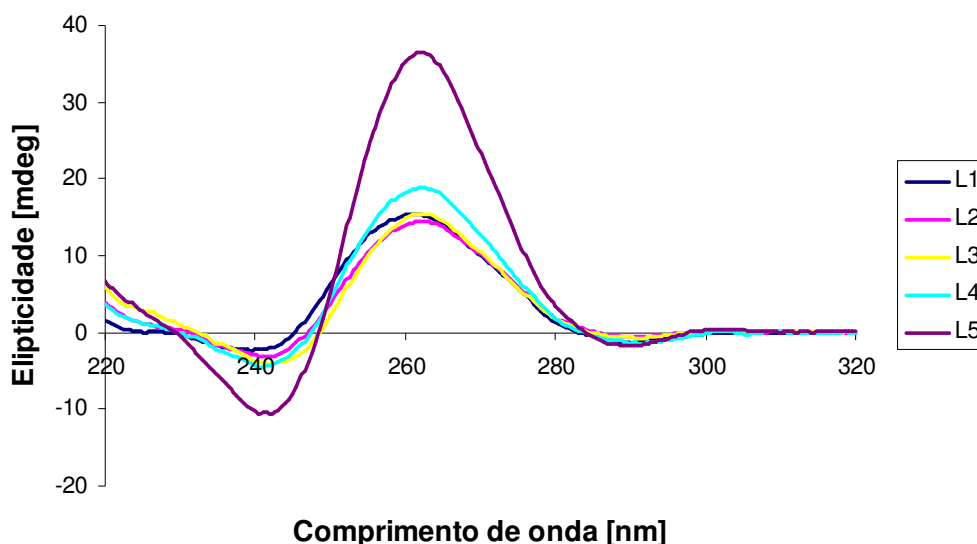


Figura 7 - Gráfico resultante da análise de Dicroísmo Circular com amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo cacodilato de lítio (tampão) e 5 mM KCl. O gráfico está expresso em graus de elipticidade (milidegrees = mdeg) por comprimento de onda (nm).

### CD Melting

Comparando os três ensaios (usando TE e 5mM de KCl; TE e 100 mM de KCl; cacodilato de lítio e 5 mM de KCl) inferimos que as amostras submetidas a maior concentração de KCl são mais estáveis à degradação térmica (tabela 1). A amostra L1, que possui menor “loop”, foi a que se manteve mais estável em todos os ensaios corroborando com dados da literatura (Kumar *et al.*, 2008) (figuras 8-10; tabela 1).

Quando comparamos as médias das elipticidades das cinco amostras a 100°C nos três ensaios, não observamos diferença entre TE com 5 mM e 100 mM de KCl. Entretanto, as amostras submetidas ao cacodilato de lítio com 5 mM de KCl apresentaram maior média, indicando que este tampão provém maior estabilidade (figura 11), além da amostra L1 apresentar maior temperatura de *melting* (tabela 1). Esses resultados também demonstraram que a estabilidade reduzida do G-quadruplex em soluções contendo TE ocorre devido à alteração de

pH deste tampão à medida que a temperatura aumenta, corroborando com dados apresentados por Hardin *et al.* (1992).

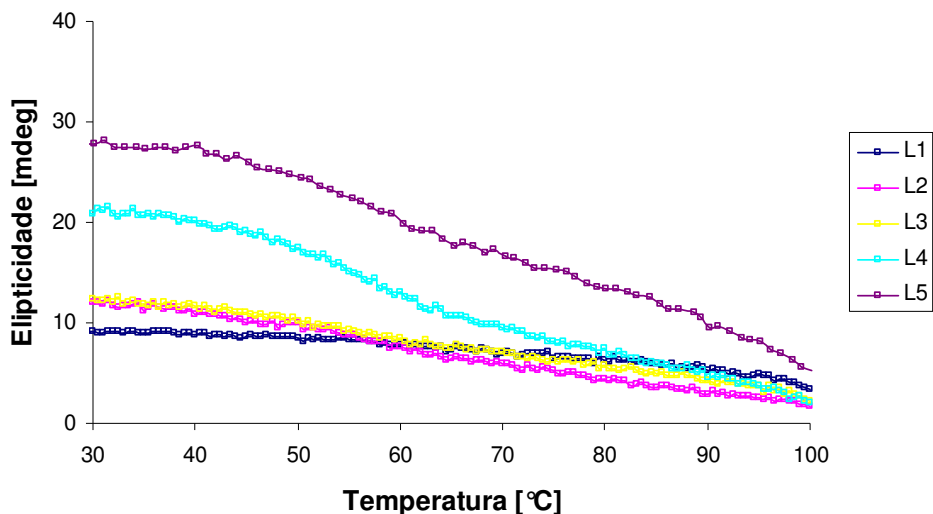


Figura 8 – Gráfico resultante da análise de *CD Melting* do comprimento de onda de 263 nm, em amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo TE e 5 mM KCl. O comprimento de onda de 263 nm é referente ao maior pico de elipticidade encontrado no ensaio de dicroísmo circular. O gráfico foi expresso em grau de elipticidade (em milidegrees = mdeg) por temperatura em graus Celsius (°C).

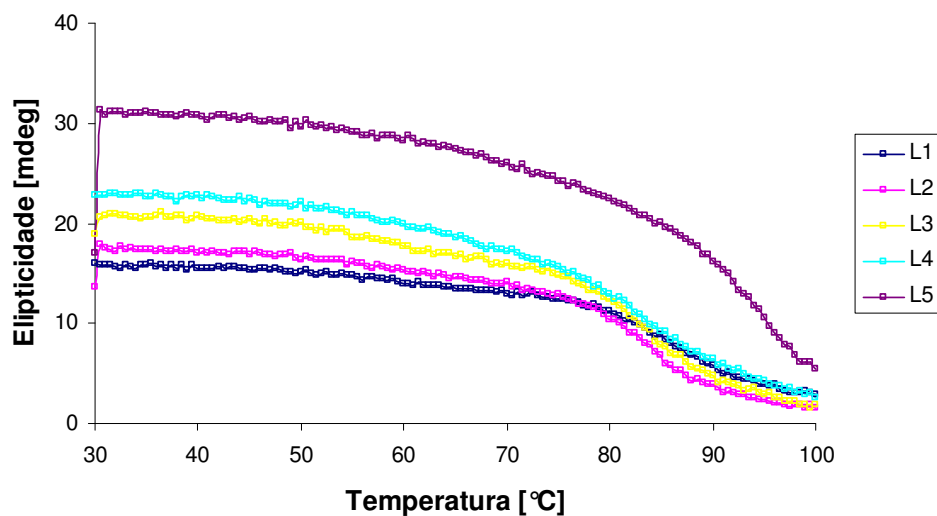


Figura 9 - Gráfico resultante da análise de *CD Melting* do comprimento de onda de 263 nm, em amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo TE e 100 mM KCl. O comprimento de onda de 263 nm é referente ao maior pico de elipticidade encontrado no ensaio de dicroísmo circular. O gráfico foi expresso em grau de elipticidade (em milidegrees = mdeg) por temperatura em graus Celsius (°C).

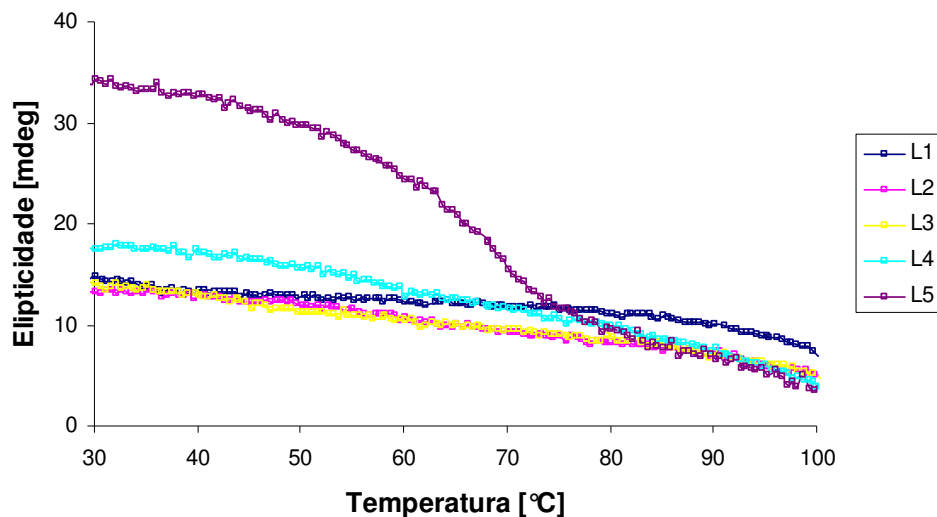


Figura 10 – Gráfico resultante da análise de *CD Melting* do comprimento de onda de 263 nm, em amostras (L1, L2, L3, L4 e L5) contendo cacodilato de lítio (tampão) e 5 mM KCl. O comprimento de onda de 263 nm é referente ao maior pico de elipticidade encontrado no ensaio de dicroísmo circular. O gráfico foi expresso em grau de elipticidade (em milidegrees = mdeg) por temperatura em graus Celsius (°C).

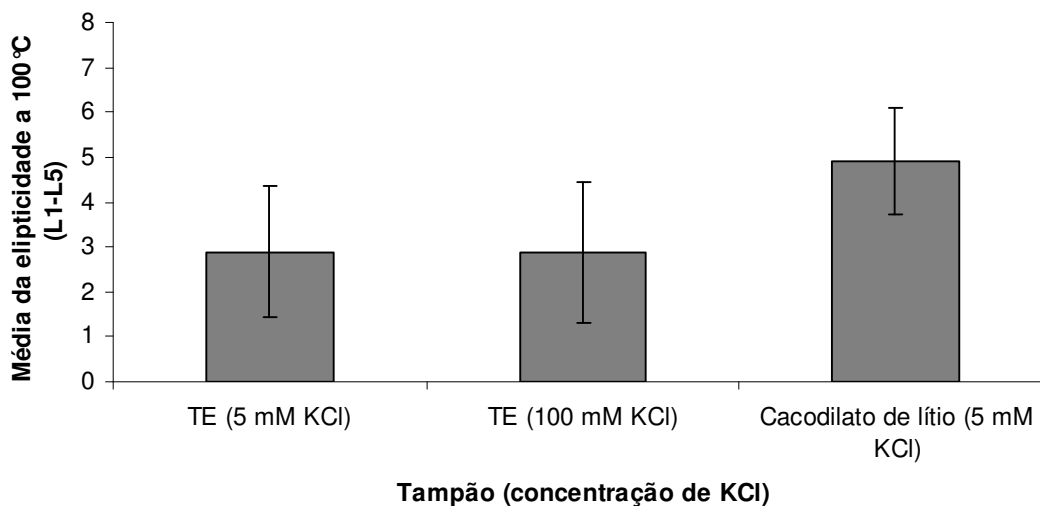


Figura 11 - Comparação entre as médias dos graus de elipticidade a 100 °C das amostras contendo TE (5 mM e 100 mM de KCl) e cacodilato de lítio (5 mM de KCl).

**Tabela 1 – Cálculo das temperaturas de *melting* (°C) nos diferentes ensaios, de acordo com (Mergny & Lacroix, 2003).**

<b>Tm (°C)</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>
TE (5 mM KCl)	81.5°C	61°C	67°C	61.5°C	68.33°C
TE (100 mM KCl)	83.5°C	81.5°C	81.5°C	80°C	87.5°C
Cacodilato de lítio (5 mM KCl)	85.2°C	67.18°C	62.13°C	72.63°C	66.12°C

***Estudo sobre a possível formação de quadruplex em DNA fita dupla – Análises por Dicroísmo Circular e CD Melting.***

De modo similar ao que foi feito no ensaio usando fita simples, formulamos a hipótese na qual verificamos se os métodos de dicroísmo circular e *CD Melting* seriam capazes de detectar a presença de G-quadruplex em DNA fita dupla. A figura 12 mostra o ensaio de dicroísmo circular para inferir a conformação de G-quadruplex. Independente da concentração do complemento reverso em fita simples, não houve variação no valor da elipticidade. O mesmo comportamento foi observado no estudo de *CD Melting*, no qual a estabilidade se manteve para as diferentes concentrações de fita simples do complemento reverso de L5 (figura 13). Também não houve alterações nas temperaturas de *melting* com o aumento da concentração do oligonucleotídeo RL5 (Tabela 2). Portanto sugerimos que *CD Melting* e o CD não parecem ser úteis para detecção de G-quadruplex em DNA fita dupla.

**Tabela 2 – Cálculo das temperaturas de *melting* referentes ao ensaio usando fita dupla e o oligonucleotídeo L5, de acordo com (Mergny & Lacroix, 2003).**

	<b>L5 + 5 mM KCl</b>	<b>L5 + RL5 2.5 µM + 5 mM KCl</b>	<b>L5 + RL5 5 µM + 5 mM KCl</b>	<b>L5 + RL5 10 µM + 5 mM KCl</b>
Tm (°C)	66.12°C	66.66°C	65.2°C	63.25°C

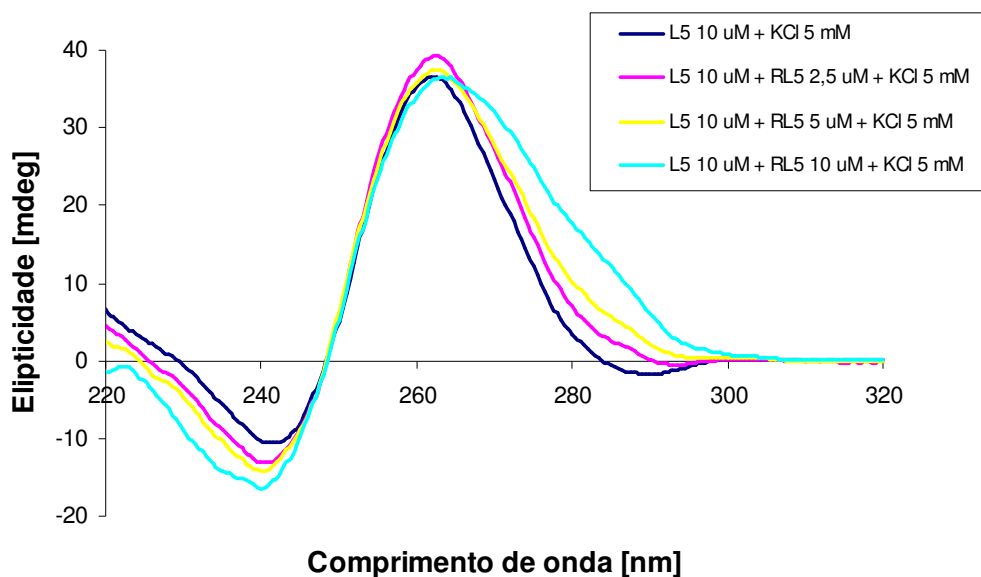


Figura 12 - Gráfico resultante da análise de Dicroísmo Circular do oligonucleotídeo L5 e diferentes concentrações do seu óligo reverso (RL5). As reações continham cacodilato de lítio (tampão) e 5 mM KCl. O gráfico está expresso em graus de elipticidade (milidegrees = mdeg) por comprimento de onda (nm).

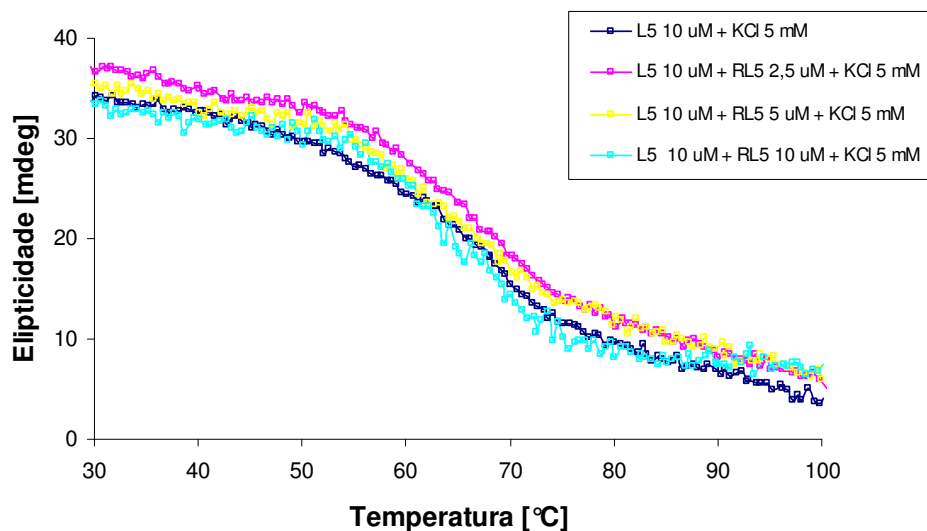


Figura 13 – Gráfico resultante da análise de *CD Melting* do comprimento de onda de 263 nm, na amostra L5 e diferentes concentrações do seu complemento reverso (RL5). As reações continham cacodilato de lítio (tampão) e 5 mM KCl. O comprimento de onda de 263 nm é referente ao maior pico de elipticidade encontrado no ensaio de dicroísmo circular. O gráfico foi expresso em grau de elipticidade (em milidegrees = mdeg) por temperatura em graus Celsius (°C).



## 1.4 DISCUSSÃO

Na literatura já foram descritos alguns métodos experimentais que geralmente foram utilizados para a caracterização do G-quadruplex em ensaios “*in vitro*”. Dentre essas metodologias estão: a espectroscopia de dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*) e o “*UV melting*” (Parkinson, 2006). O dicroísmo circular é um método indireto para a caracterização da topologia de G-quadruplex baseado em motivos estruturais conhecidos para comparação. Esta técnica é utilizada para examinar as estruturas de G-quadruplex e seus ligantes, assim como os efeitos de cátions em sua estrutura (Parkinson, 2006). O CD também tem sido amplamente utilizado para monitorar a cinética de formação do G-quadruplex em fita simples (Paramasivan *et al.*, 2007). Neste trabalho utilizamos o CD para verificar como seriam as conformações de G-quadruplexes de amostras contendo mais de quatro tríades de guaninas e também em fita dupla de DNA. Como resultado observamos que todas as amostras apresentaram a conformação tetramolecular, isto é, continham quatro fitas de DNA paralelas, corroborando com o modelo proposto por Paramasivan *et al.* (2007). Além disso, as amostras que continham maior quantidade de “*G-runs*” apresentou o maior pico de elipticidade referindo-se à fase em que há formação de maior quantidade de moléculas de G-quadruplex. Resultados semelhantes foram observados no ensaio de fita dupla de DNA, demonstrando que o dicroísmo circular é um método que não consegue distinguir se a formação de G-quadruplexes está ocorrendo em fita dupla ou em fita simples.

Outro método bastante usado para analisar características de G-quadruplex é o “*UV melting*”, que é uma espectroscopia de absorção de luz ultravioleta (UV) com temperatura variável. O “*UV melting*” é capaz de fornecer perfis de temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) através da absorção de luzes UV, desta maneira, monitorando a estabilidade de estruturas G-quadruplex (Phan *et al.*, 2002; Mergny *et al.*, 2009). Estudos na literatura que utilizaram dessa técnica demonstraram que a adição de *G-tétrades* ao G-quadruplex fornece maior estabilidade a essas estruturas, através do aumento da temperatura de *melting* (Petraccone *et al.*, 2005; Risitano *et al.*, 2004). Por este motivo, neste trabalho

testamos amostras contendo mais de quatro tríades de guaninas e diferentes tamanhos de *loop*, assim como fita dupla de DNA, com o intuito de saber se há alterações no perfil de estabilização do G-quadruplex na presença de diferentes tampões (TE, cacodilato de lítio). Essas análises foram realizadas através da técnica de “*CD Melting*”, a qual atua de modo similar ao “*UV melting*”.

Guédin *et al.* (2010) analisaram a estabilidade de G-quadruplexes de 80 diferentes oligonucleotídeos contendo 3 guaninas (GGG) e tamanho de *loops* variável (1 a 15) e verificaram que houve uma correlação negativa dos resultados, isto é, quanto maior o tamanho do “*loop*”, menor era a temperatura de *melting*, reduzindo a estabilidade dos G-quadruplexes. Neste estudo, em todos os ensaios, a amostra L1 apresentou maior temperatura de *melting* quando comparada com os demais óligos, possuindo maior estabilidade de G-quadruplex devido a características como menor tamanho de “*loop*”. Além disso, outro fator que pode interferir na estabilização do G-quadruplex é a composição do “*loop*”. Guédin *et al.* (2009) mostraram que, mesmo na presença de potássio, óligos em que as sequências do “*loop*” central iniciavam com A (adenina) apresentavam menor estabilidade do que os que começavam com C (citosina) ou T (timina). Aqui neste trabalho, todos os óligos continham adenina no início do “*loop*”, podendo ser um fator a ser considerado nas análises das estabilizações de G-quadruplex. Aliado a esse fator, a composição e concentração de cátions monovalentes, além do pH (abaixo de 5) do tampão da solução, podem afetar a formação e estabilização das estruturas G-quadruplex (Tran *et al.*, 2012). Isto pode explicar porque as amostras contendo cacodilato de lítio (pH 7.0) e cloreto de potássio a 5 mM apresentaram maior temperatura de *melting* (exceto em L3 e L5). As amostras contendo TE e cloreto de potássio a 5 mM tiveram um pH mais ácido, influenciando na estabilidade da reação. Porém, quando as amostras continham TE e 100 mM de KCl, todas as temperaturas de *melting* eram altas, entre 80 a 87 °C, mostrando que a estabilização dos G-quadruplexes é dependente da concentração do cátion.

Em relação ao ensaio de fita dupla, a estabilização dos G-quadruplexes, assim como as temperaturas de *melting*, não mostraram alterações.

Deste modo, podemos concluir que o “*CD Melting*” também não é um método eficaz para distinguir a formação de estruturas secundárias presentes em fita dupla de fita simples.

## 1.5 CONCLUSÃO

Levando em consideração todos os resultados e a discussão dos mesmos, podemos concluir que:

(1) Após analisar sequências contendo G-quadruplexes com mais de quatro tríades de guaninas, podemos inferir que o G-quadruplex formado pelo oligonucleotídeo com menor “*loop*” foi o mais estável, mesmo usando diferentes tampões na sua reação. Pode-se afirmar que a concentração de cloreto de potássio também interferiu na estabilidade dessas estruturas, tendo as maiores temperaturas de *melting* as reações que continham maior concentração deste cátion.

(2) Os métodos de dicroísmo circular e “*CD Melting*” não são suficientes para diferenciar características de G-quadruplex entre DNA fita dupla e fita simples, havendo necessidade de mais estudos para encontrar metodologias capazes de observar a estabilização e a conformação dessas estruturas.

## 1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bates P, Mergny JL, Yang D. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. EMBO reports. 2007 Nov;8(11):1003-10.

Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. Nucleic acids research. 2006;34(19):5402-15.

Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. Nucleic acids research. 2006;34(14):3887-96.

Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1962 Dec 15;48:2013-8.

Guedin A, Alberti P, Mergny JL. Stability of intramolecular quadruplexes: sequence effects in the central loop. Nucleic acids research. 2009 Sep;37(16):5559-67.

Guedin A, Gros J, Alberti P, Mergny JL. How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. Nucleic acids research. 2010 Nov;38(21):7858-68.

Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. Trends in pharmacological sciences. 2000 Apr;21(4):136-42.

Hardin CC, Watson T, Corregan M, Bailey C. Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). Biochemistry. 1992 Jan 28;31(3):833-41.

Hazel P, Huppert J, Balasubramanian S, Neidle S. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. Journal of the American Chemical Society. 2004 Dec 22;126(50):16405-15.

Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. Nucleic acids research. 2005;33(9):2908-16.

Kumar N, Sahoo B, Varun KA, Maiti S, Maiti S. Effect of loop length variation on quadruplex-Watson Crick duplex competition. Nucleic acids research. 2008 Aug;36(13):4433-42.

Maizels N. Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nature structural & molecular biology*. 2006 Dec;13(12):1055-9.

Mergny JL, Lacroix L. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*. 2003;13(6):515-37.

Mergny JL, Lacroix L. UV Melting of G-Quadruplexes. *Current protocols in nucleic acid chemistry* / edited by Serge L Beaucage [et al. 2009 Jun;Chapter 17:Unit 17 1.

Mergny JL, Phan AT, Lacroix L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS letters*. 1998 Sep 11;435(1):74-8.

Paramasivan S, Rujan I, Bolton PH. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods (San Diego, Calif)*. 2007 Dec;43(4):324-31.

Parkinson GN. Fundamentals of Quadruplex Structures. In: Neidle S, Balasubramanian S, eds. *Quadruplex Nucleic Acids: RSC Biomolecular Sciences* 2006:1-27.

Petraccone L, Erra E, Duro I, Esposito V, Randazzo A, Mayol L, et al. Relative stability of quadruplexes containing different number of G-tetrads. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. 2005;24(5-7):757-60.

Phan AT, Mergny JL. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic acids research*. 2002 Nov 1;30(21):4618-25.

Risitano A, Fox KR. Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic acids research*. 2004;32(8):2598-606.

Smirnov I, Shafer RH. Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability. *Biochemistry*. 2000 Feb 15;39(6):1462-8.

Todd AK, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic acids research*. 2005;33(9):2901-7.

Tran PL, De Cian A, Gros J, Moriyama R, Mergny JL. Tetramolecular quadruplex stability and assembly. *Topics in current chemistry*. 2012;330:243-73.

## CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E QUADRUPLEXES DE DNA

### 2.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve uma busca por compostos de origem natural para fins terapêuticos com características analgésicas, antimicrobianas e, até mesmo, anti-tumorais. Entre esses extratos de fontes naturais podemos destacar a própolis, que é uma substância resinosa não tóxica coletada de flores por abelhas produtoras de mel (Silva *et al.*, 2008). A própolis tem sido usada por muito tempo na medicina popular na forma de alimentos e bebidas para melhorar a saúde e prevenir doenças (Paviani *et al.*, 2010). O estudo da própolis aumentou nos últimos anos devido à presença de propriedades biológicas e farmacêuticas que incluem atividades anti-viral, analgésica, anti-oxidante, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticariogênicas, anticarcinogênica, antioxidante, anti-úlceras e características imuno-moduladoras (Silva *et al.*, 2008; Alencar *et al.*, 2007; Da Cunha *et al.*, 2013; Franchin *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 1999, 2000 e 2002).

A própolis não pode ser usada na sua forma bruta, devendo ser purificada antes de seu uso terapêutico (Pietta *et al.*, 2002). Com o intuito de remover todo material insolúvel (como cera e detritos vindos da colméia), a própolis deverá ser dissolvida em etanol resultando no extrato etanólico de própolis (EEP). Assim, a purificação da própolis em EEP deverá aumentar a concentração de flavonóides em relação ao seu extrato bruto original. A composição do EEP final depende, entre outros fatores, da localização das colméias e árvores adequadas, locais de origem e sazonalidade (Paviani *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2013). Neste trabalho foram estudados extratos etanólicos de própolis vermelha (EEPV) e geoprópolis (EEGP). Adicionalmente, a maior parte dos estudos encontrados na literatura se focaliza em própolis produzida pela *Apis mellifera* e há poucos estudos descrevendo outras espécies de abelha.

A própolis vermelha é um tipo de própolis brasileira encontrada na cidade de Maceió (estado do Alagoas) e é assim denominada por causa de sua

cor (Silva *et al.*, 2008). Seu material é coletado por abelhas *Apis mellifera* através dos exsudatos vermelhos da planta *Dalbergia ecastophyllum* (Siqueira *et al.*, 2009). Por causa da presença de flavonóides (Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013) e de outros compostos fenólicos, a própolis vermelha tem apresentado várias propriedades: anti-oxidante (Frozza *et al.*, 2013; Righi *et al.*, 2011), anti-microbiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Righi *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Alencar *et al.*, 2007), anti-fúngica (Siqueira *et al.*, 2009). Além dessas propriedades, a própolis vermelha se mostrou ser citotóxica quando adicionada ao meio de cultura de células infectadas por patógenos ou células tumorais, tais como: macrófagos normais infectados por *Leishmania amazonensis* (Ayres *et al.*, 2007); carcinoma epidermóide de laringe humano (Hep-2); adenocarcinoma cervical humano (HeLa) (Frozza *et al.*, 2013; Alencar *et al.*, 2007); células de câncer pancreático humano (PANC-1) em meio privado de nutrientes (Awale *et al.*, 2008); melanoma murino (B16-BL6); adenocarcinoma de pulmão humano (A549); fibrossarcoma humano (HT-1080) (Li *et al.*, 2008); células de câncer de mama MCF-7 (apoptose e estresse do retículo endoplasmático) (Kamiya *et al.*, 2012); células de leucemia humanas (Franchi *et al.*, 2012). Em adição às suas características, a própolis vermelha também se mostrou com atividade inibitória para a proliferação de adipócitos, podendo ser utilizada como suplemento de dietas para tratamento contra obesidade (Iio *et al.*, 2010).

Na literatura há poucos trabalhos sobre tipos de própolis provenientes de outras abelhas que não a da espécie *A. mellifera*. Entre eles está o estudo da geoprópolis, que é um tipo de própolis produzido por abelhas sem ferrão nativas da colméia *Meliponini*. A geoprópolis consiste em uma mistura resinosa que contém material coletado de plantas, cera e solo, podendo ser encontrada na região Norte/Nordeste do Brasil (Liberio *et al.*, 2011; Franchin *et al.*, 2012). Pouco foi estudado sobre as propriedades biológicas da geoprópolis, entre elas estão atividades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans* (Duailibe *et al.*, 2007; Liberio *et al.*, 2011) e *Staphylococcus aureus* (Velikova *et al.*, 2000; Da Cunha *et al.*, 2013); e também foi descrita atividade anti-fúngica contra *Candida albicans*

(Liberio *et al.*, 2011). Além disso, a geoprópolis exerce um efeito citotóxico sobre células de osteosarcoma canino (Cinegaglia *et al.*, 2013) e sobre outras culturas de células tumorais humanas como a UACC-62 (melanoma), a PC-3 (câncer de próstata) e a OVCAR-03 (câncer de ovário) (Da Cunha *et al.*, 2013). Desta maneira, a geoprópolis pode atuar como um possível agente terapêutico *in vivo*, contribuindo para o tratamento de vários tipos de tumores.

Quando testada em modelo animal, a geoprópolis baseada em gel mostrou ser não tóxica (Liberio *et al.*, 2011). Franchin *et al.* (2012; 2013) também mostraram que tanto o EEGP como a fração aquosa da geoprópolis possuem efeitos anti-inflamatórios através da inibição de imunomediadores como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (citocinas pró-inflamatórias). Este estudo também demonstrou a redução da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e a diminuição da interação dos leucócitos com as células endoteliais de camundongos *BALB/c*.

Ao mesmo tempo em que a própolis tem sido usada na medicina popular como um agente terapêutico, o estudo de G-quadruplex de DNA aumentou nos últimos anos devido ao interesse dessas estruturas como alvo para intervenção terapêutica (Riou, 2004; Maizels, 2006; Neidle & Balasubramanian, 2006 apud Bates, 2007). Como definição, as estruturas de G-quadruplex são constituídas por sequências de ácidos nucleicos que são ricas em guaninas capazes de formar uma estrutura secundária de DNA através de pontes de hidrogênio do tipo *Hoogsteen*, na presença de um cátion monovalente (Burge *et al.*, 2006; Gellert *et al.*, 1962). Os G-quadruplexes tem sido usados como alvos terapêuticos capazes de inibir a ação da telomerase, enzima responsável pelo alongamento do telômero e consequente proliferação ilimitada de células tumorais (Han *et al.*, 1999; Neidle *et al.*, 2006).

Devido a todas propriedades citadas anteriormente, utilizamos ensaios *in vitro* para analisar se existe interação dos extratos etanólicos de própolis vermelha (EPPV) e de geoprópolis (EEGP) na formação de G-quadruplexes de DNA.



## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Com o propósito de analisar suas interações com os G-quadruplexes, foram utilizados os seguintes tipos de própolis brasileira classificadas como:

- Própolis vermelha: As amostras de própolis vermelha foram coletadas das partes internas das caixas das colméias, nas frestas das colméias de abelhas *Apis mellifera* africanizada, que estão localizadas na região litorânea da cidade de Maceió, Estado de Alagoas.

- Geoprópolis: As amostras de geoprópolis foram coletadas das partes internas das caixas das colméias, no espaço compreendido entre a tampa e a melgueira e entre a melgueira e o ninho das abelhas *Melipona scutellaris*, que estão localizadas na região litorânea da cidade de Entre Rios, Estado da Bahia. As coletas ocorreram entre os meses de janeiro e fevereiro.

Para a obtenção do extrato etanólico de geoprópolis (EEGP), foi adicionado etanol absoluto à geoprópolis bruta macerada (coletada e limpa) na proporção de 1:3 (p/v). Esta mistura foi mantida em banho-maria a 70°C por 30 minutos, seguida de centrifugação e filtração. O sobrenadante resultante foi concentrado em concentrador rotacional a vácuo (Quimis) com o intuito de evaporar o etanol, resultando no EEGP (Da Cunha *et al.*, 2013).

Já o extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) foi obtido segundo descrito por Silva *et al.* (2008; 2013). À própolis bruta macerada (coletada e limpa) foi adicionado etanol 80% (v/v) na proporção de 2 g de própolis em 25 ml de etanol 80% (v/v). Esta mistura foi aquecida a 70°C por 45 minutos sob agitação, seguida de centrifugação e filtração. O sobrenadante resultante foi concentrado em concentrador rotacional a vácuo (Quimis) com o propósito de evaporar o etanol, resultando no EEPV.

Inicialmente, foram preparadas soluções-mãe a 20% (p/v) dos extratos etanólicos dos dois tipos de própolis em etanol (100% para geoprópolis e 80% para própolis vermelha) (Duarte *et al.*, 2003). Os EEGP e EEPV foram novamente diluídos a 1% em etanol, depois adicionados em diferentes concentrações (0 µg/µl como controle; 1 µg/µl; 5 µg/µl e 10 µg/µl) em reações contendo cacodilato de lítio

(tampão), oligonucleotídeo a 10 µM contendo sequência com potencial para formação de G-quadruplex (L3 - 5'GGGAGGGAGGGAGGGATAATAATGGG 3') e cloreto de potássio (KCl) com concentrações variando de 0 e 10 mM. A reação foi submetida à 95°C por 5 minutos e temperatura ambiente por 2 horas, depois congelada. No dia seguinte, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo KCl a 12,5 mM. O corante *SyBR Gold* (*Invitrogen*) foi utilizado para evidenciar as bandas no gel de poliacrilamida. A formação de G-quadruplex de DNA foi determinada pelo aparecimento de bandas de mobilidade alterada (Simonsson, 1998). Quando foi verificada a formação de G-quadruplex, os extratos etanólicos de própolis que apresentaram atividades foram fracionados por um gradiente de polaridade com solventes orgânicos e sub-fractionados com coluna LH20 Sephadex de forma bioguiada, até que se encontre a sub-fração ativa da própolis para a formação de quadruplex e posterior isolamento da substância natural em CLAE-Preparativa (cromatografia preparativa líquida de alta eficiência). Neste caso, entre os dois extratos testados, o único que apresentou alterações nos padrões do G-quadruplex foi EEGP. Por este motivo, foram realizados testes com o seu extrato aquoso e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, aquosa e hidro-etanólica. Para cada teste foram feitas triplicatas. A obtenção e a purificação desses compostos foram descritas por Franchin *et al.* (2012). Os extratos etanólicos de geoprópolis e própolis vermelha, assim como as frações de geoprópolis, foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen (Departamento de Farmacologia – FOP/UNICAMP).

Os géis de poliacrilamida a 12% após corados foram fotografados tendo suas imagens quantificadas pelo software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) versão 1.42q. Após obtenção dos resultados, estes foram submetidos à análise estatística pelo software Bioestat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/>) através do teste paramétrico “*Teste T de Student*” para amostras relacionadas, ao nível de significância de 5%.

### 2.3. RESULTADOS

O ensaio utilizando o gel de poliacrilamida 12% determinou se o extrato etanólico de própolis causava alteração na mobilidade das bandas, o que possivelmente indicaria a formação de G-quadruplexes. Para tal, foram feitas reações contendo diferentes quantidades de extrato etanólico de geoprópolis (EEGP) (0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) em diferentes concentrações de potássio (0 e 10 mM), como mostra a figura 14. Os resultados indicam que à medida que aumenta a quantidade de EEGP nas reações, há a redução da intensidade da banda de alto peso molecular (referente ao G-quadruplex), mostrando que o EEGP interfere na formação do G-quadruplex. A figura 14A mostra que há contaminação do EEGP (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) no controle negativo (sem DNA).

Já o ensaio envolvendo diferentes quantidades do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) (0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) com diferentes concentrações de potássio (0 e 10 mM de KCl) mostrou que houve a redução da intensidade da banda de alto peso molecular (referente à formação de G-quadruplex) somente nas amostras que não continham o cátion (figura 15A e 15D). Ou seja, a própolis vermelha pode interferir na formação de G-quadruplex na ausência do potássio.

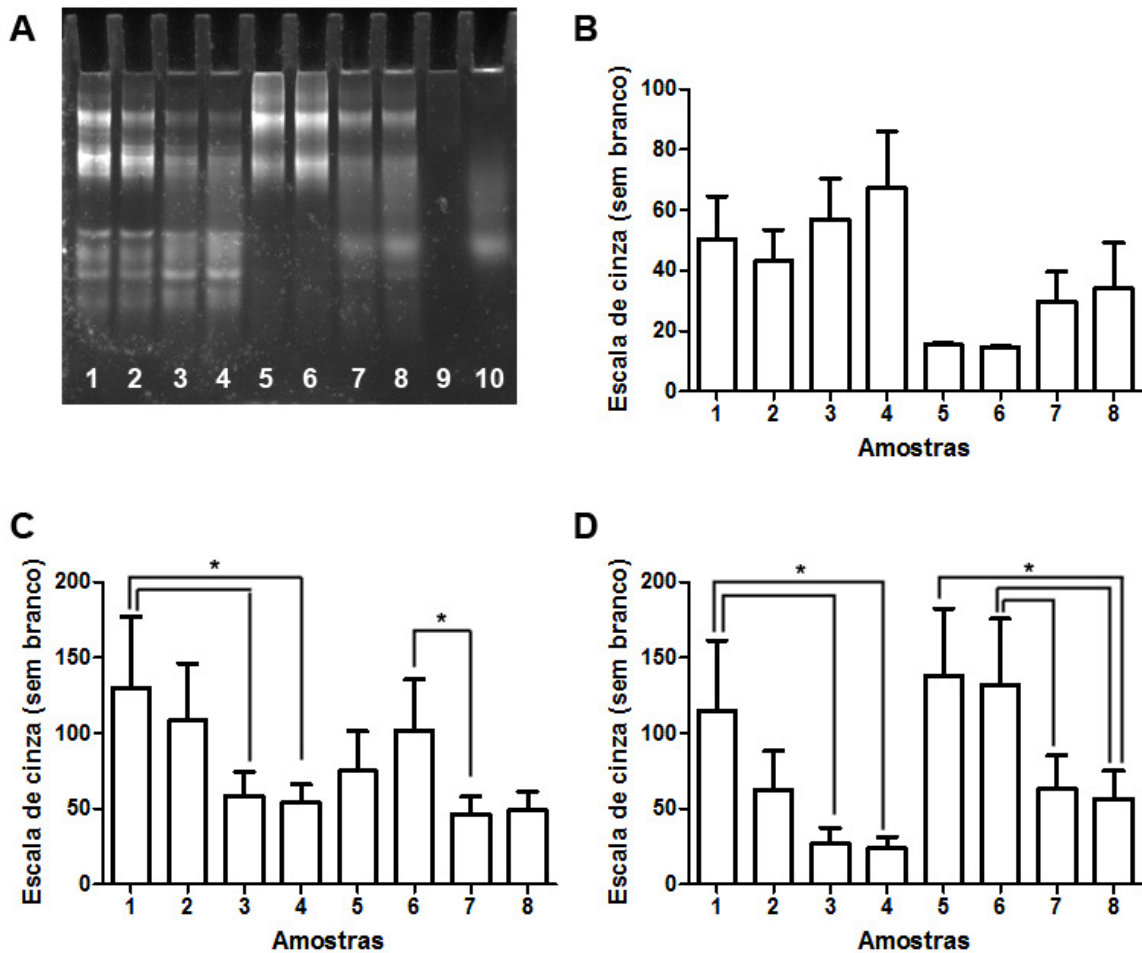


Figura 14 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente ao extrato etanólico de geoprópolis (EEGP). Amostras: (1) oligo L3 (26 bp) contendo etanol absoluto (controle), sem KCl; (2) oligo L3 contendo 1 µg/µl de EEGP, sem KCl; (3) oligo L3 contendo 5 µg/µl de EEGP, sem KCl; (4) oligo L3 contendo 10 µg/µl de EEGP, sem KCl; (5) oligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 10 mM; (6) oligo L3 contendo 1 µg/µl de EEGP, com KCl a 10 mM; (7) oligo L3 contendo 5 µg/µl de EEGP, com KCl a 10 mM; (8) oligo L3 contendo 10 µg/µl de EEGP, com KCl a 10 mM; (9) controle negativo (sem DNA) contendo etanol absoluto, com KCl a 10 mM; (10) controle negativo (sem DNA) contendo 10 µg/µl de EEGP, com KCl a 10 mM (mostrando uma possível contaminação da geoprópolis). (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\* p < 0,05)

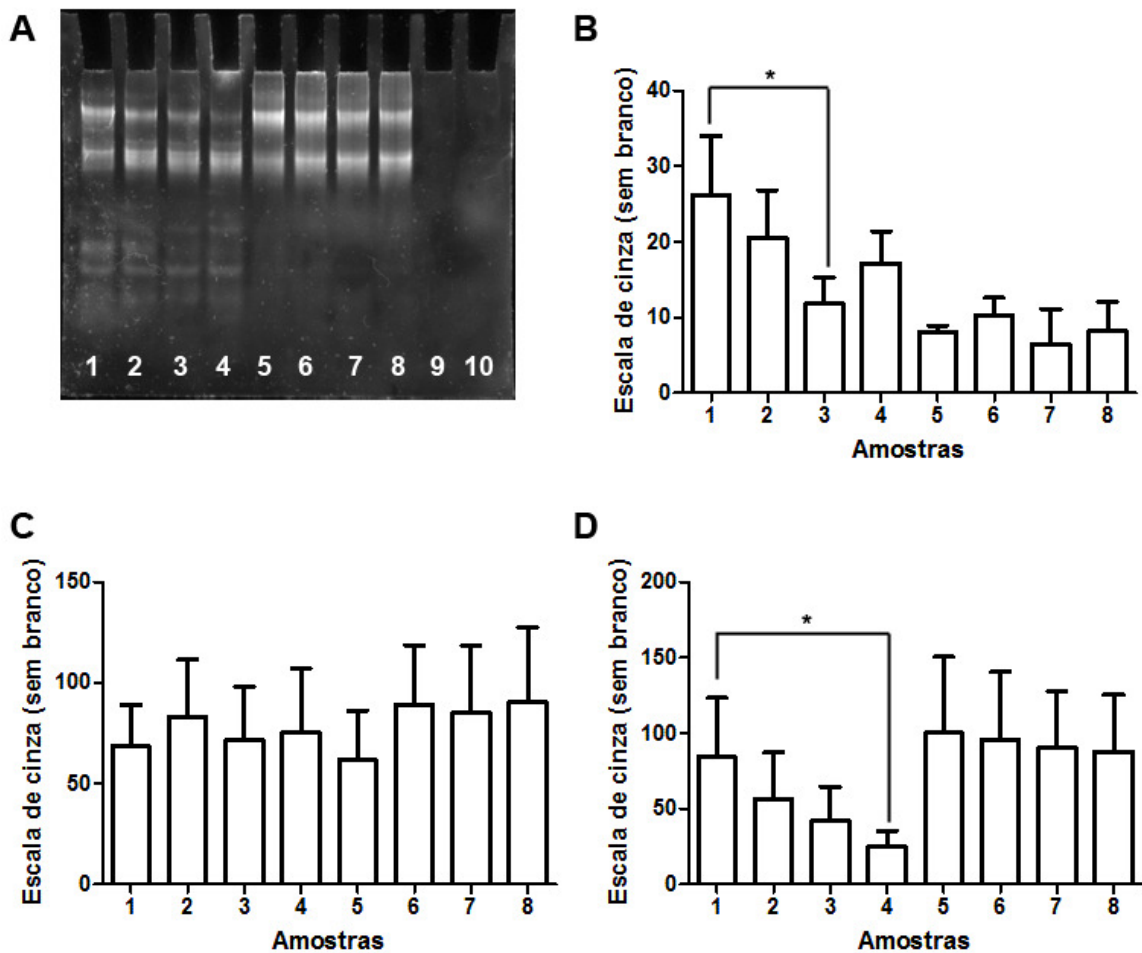


Figura 15 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente ao extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV). Amostras: (1) oligo L3 (26 bp) contendo etanol 80%(controle), sem KCl; (2) oligo L3 contendo 1 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, sem KCl; (3) oligo L3 contendo 5 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, sem KCl; (4) oligo L3 contendo 10 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, sem KCl; (5) oligo L3 contendo etanol 80%, com KCl a 10 mM; (6) oligo L3 contendo 1 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, com KCl a 10 mM; (7) oligo L3 contendo 5 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, com KCl a 10 mM; (8) oligo L3 contendo 10 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, com KCl a 10 mM; (9) controle negativo (sem DNA) contendo etanol 80%, com KCl a 10 mM; (10) controle negativo (sem DNA) contendo 10 µg/µl de extrato bruto de própolis vermelha, com KCl a 10 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\* p < 0,05)

Como foi mostrado anteriormente, o EEGP pode interferir na formação de G-quadruplex à medida que aumenta a quantidade do extrato na reação. Por este motivo, o mesmo ensaio foi realizado, incluindo a concentração de KCl de 100 mM. Foram utilizados o extrato aquoso (figura 16) e as frações da geoprópolis: acetato de etila (figura 17), aquosa (figura 18), clorofórmica (figura 19), hexânica (figura 20) e hidro-etanólica (figura 21). Esses ensaios foram executados com o intuito de saber quais frações podem estar relacionadas com o fenômeno encontrado no EEGP.

Foi observada uma diminuição da intensidade da banda de alto peso molecular (referente ao G-quadruplex) no extrato aquoso (figura 16) da geoprópolis e em suas frações acetato de etila (figura 17), aquosa (figura 18) e hidro-etanólica (figura 21). Assim, os resultados indicam que essas frações possivelmente contêm a(s) molécula(s) responsável(is) por interferir na formação do G-quadruplex. No entanto, mais estudos serão necessários para o reconhecimento desta molécula.

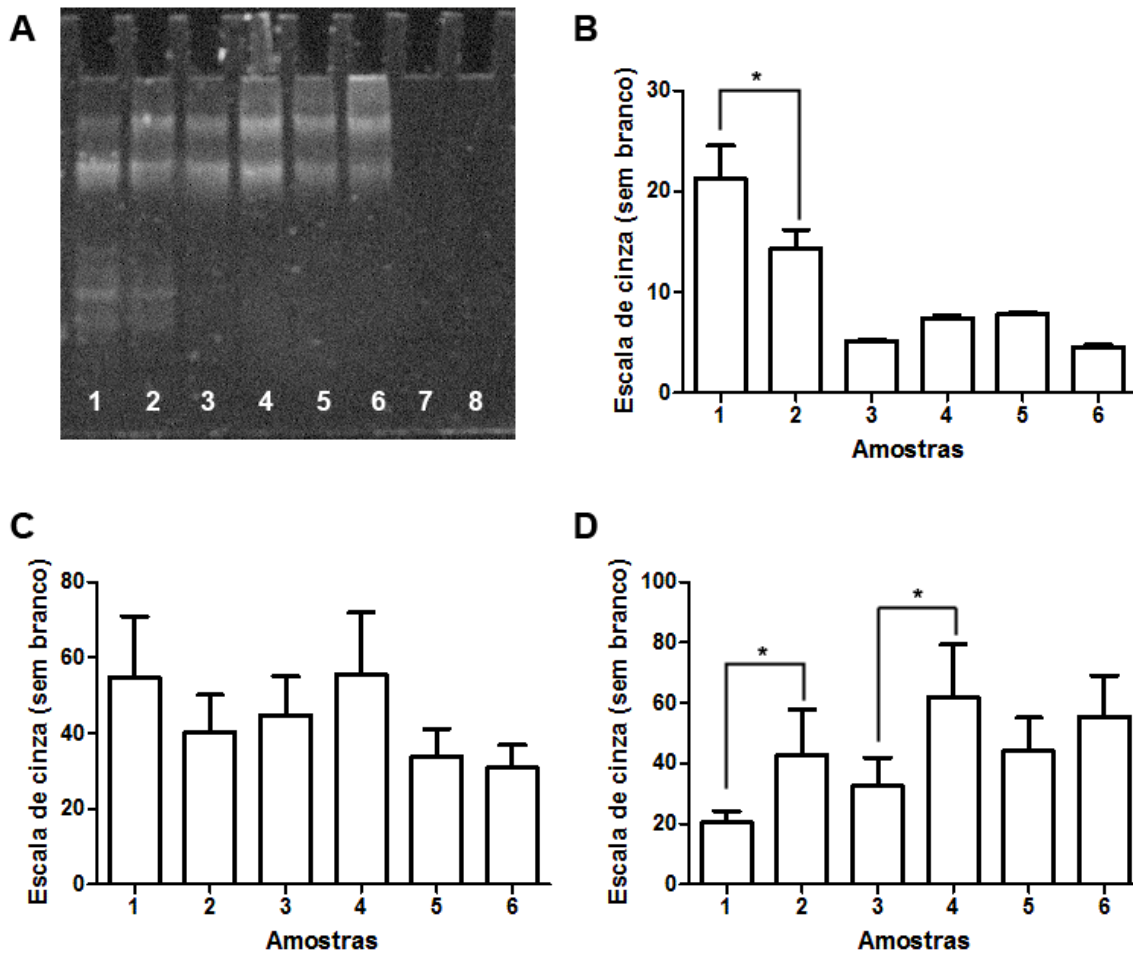


Figura 16 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente ao extrato aquoso da geoprópolis. Amostras: (1) oligo L3 (26 bp) contendo 1 µg/µl de extrato aquoso, sem KCl; (2) oligo L3 contendo água, sem KCl; (3) oligo L3 contendo 1 µg/µl de extrato aquoso, com KCl a 10 mM; (4) oligo L3 contendo água, com KCl a 10 mM; (5) oligo L3 contendo 1 µg/µl de extrato aquoso, com KCl a 100 mM; (6) oligo L3 contendo água, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1 µg/µl de extrato aquoso, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo água, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\* p < 0,05)

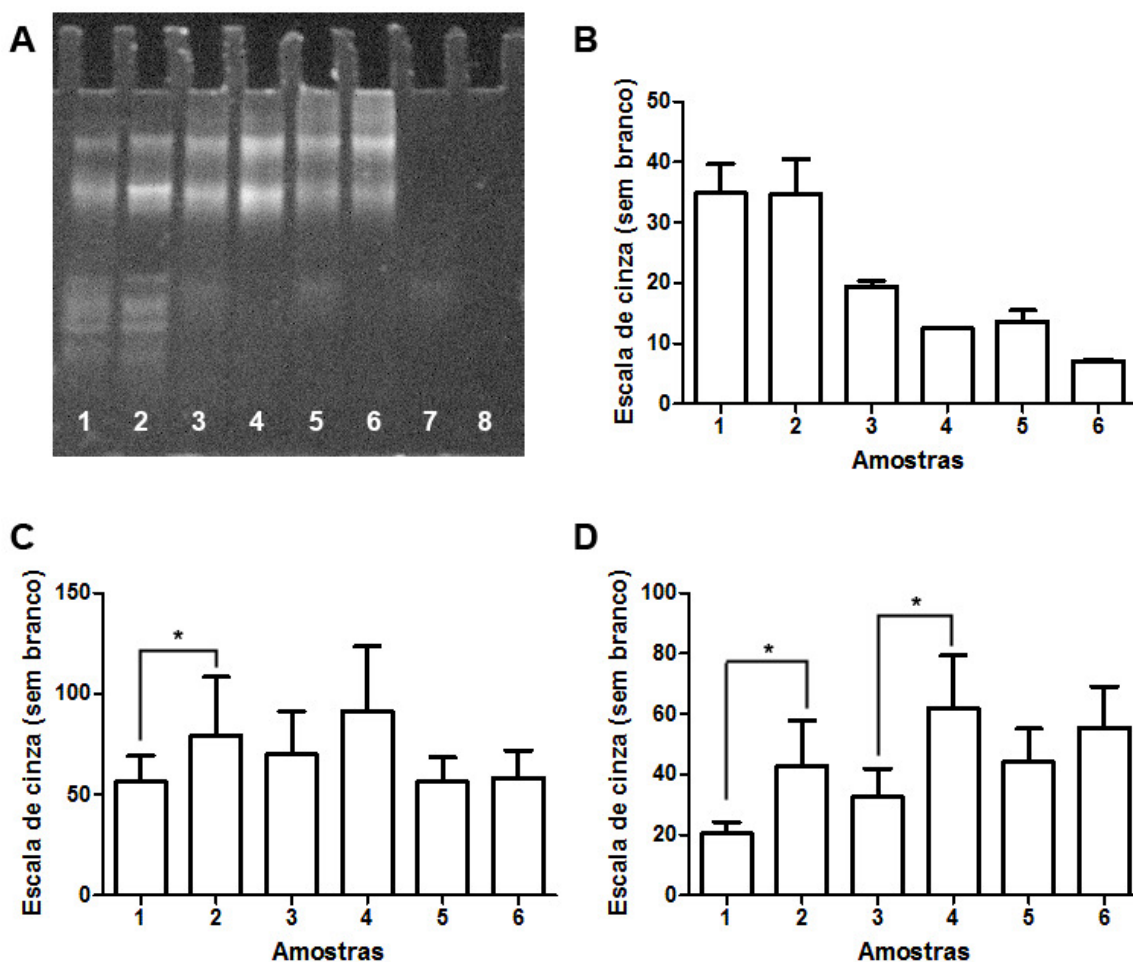


Figura 17 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente a fração acetato de etila da geoprópolis. Amostras: (1) óligo L3 (26 bp) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração acetato de etila, sem KCl; (2) óligo L3 contendo etanol absoluto, sem KCl; (3) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração acetato de etila, com KCl a 10 mM; (4) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 10 mM; (5) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração acetato de etila, com KCl a 100 mM; (6) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração acetato de etila, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\*  $p < 0,05$ )



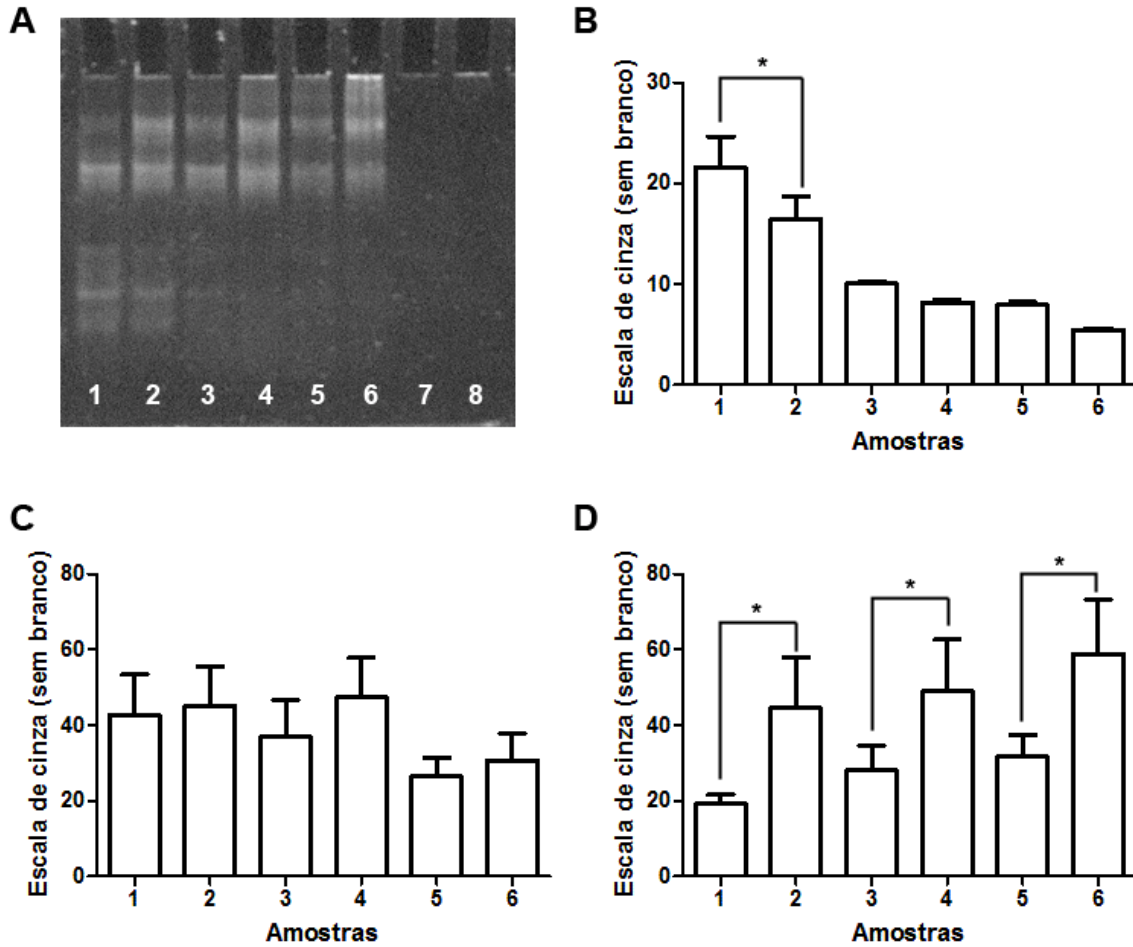


Figura 18 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente à fração aquosa da geoprópolis. Amostras: (1) oligo L3 (26 bp) contendo 1 µg/µl de fração aquosa, sem KCl; (2) oligo L3 contendo água, sem KCl; (3) oligo L3 contendo 1 µg/µl de fração aquosa, com KCl a 10 mM; (4) oligo L3 contendo água, com KCl a 10 mM; (5) oligo L3 contendo 1 µg/µl de fração aquosa, com KCl a 100 mM; (6) oligo L3 contendo água, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1 µg/µl de fração aquosa, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo água, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\* p < 0,05)

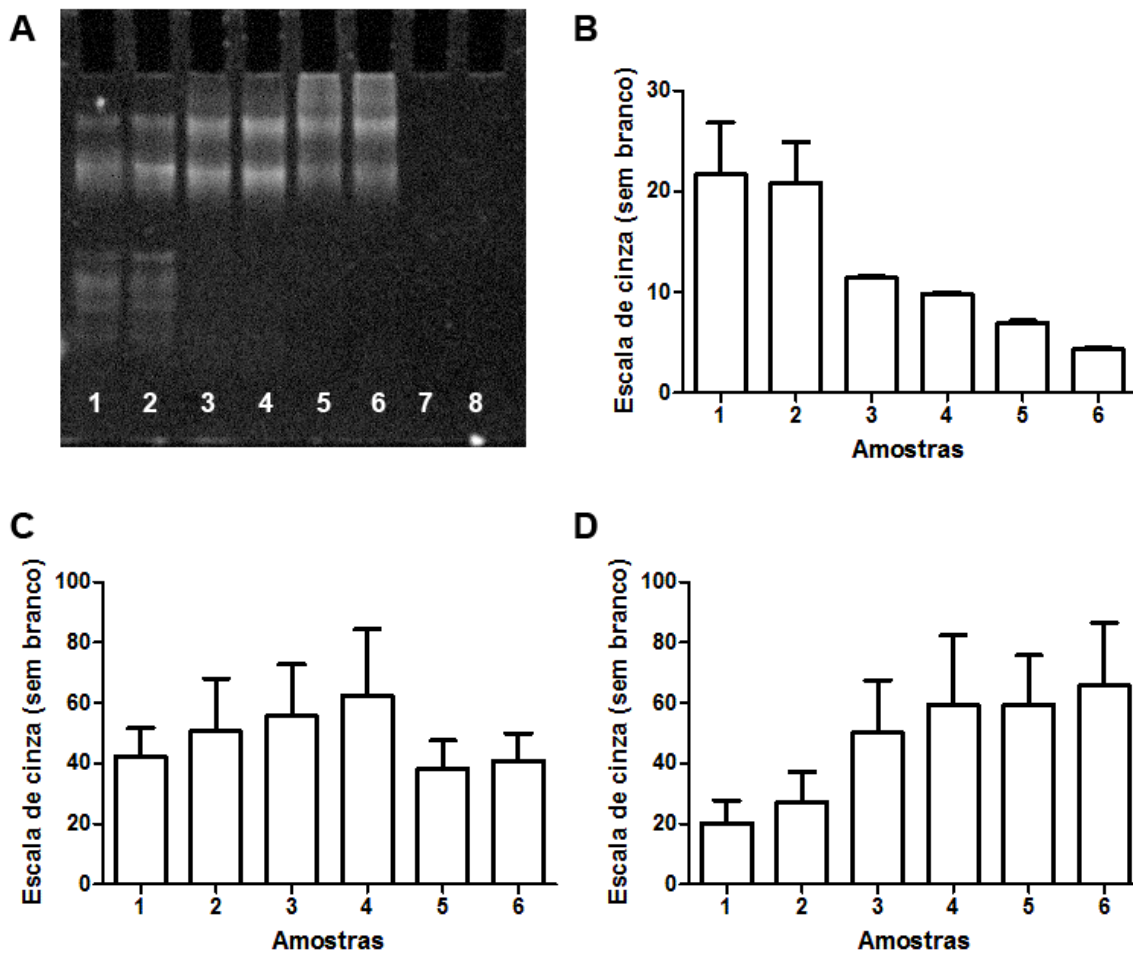


Figura 19 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente a fração clorofórmica da geoprópolis. Amostras: (1) óligo L3 (26 bp) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração clorofórmica, sem KCl; (2) óligo L3 contendo etanol absoluto, sem KCl; (3) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração clorofórmica, com KCl a 10 mM; (4) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 10 mM; (5) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração clorofórmica, com KCl a 100 mM; (6) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração clorofórmica, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4.

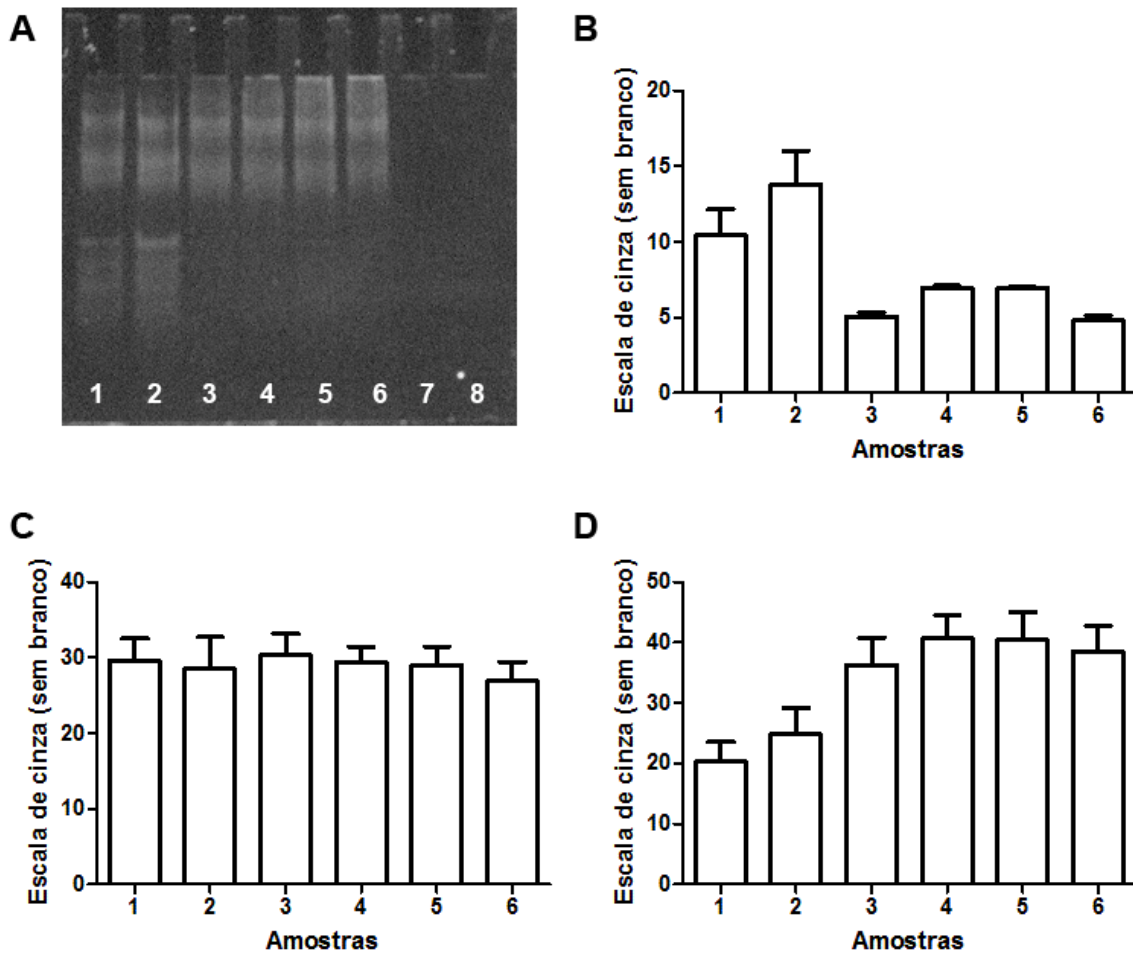


Figura 20 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente a fração hexânica da geoprópolis. Amostras: (1) óligo L3 (26 bp) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração hexânica, sem KCl; (2) óligo L3 contendo etanol absoluto, sem KCl; (3) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração hexânica, com KCl a 10 mM; (4) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 10 mM; (5) óligo L3 contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração hexânica, com KCl a 100 mM; (6) óligo L3 contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fração hexânica, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo etanol absoluto, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4.

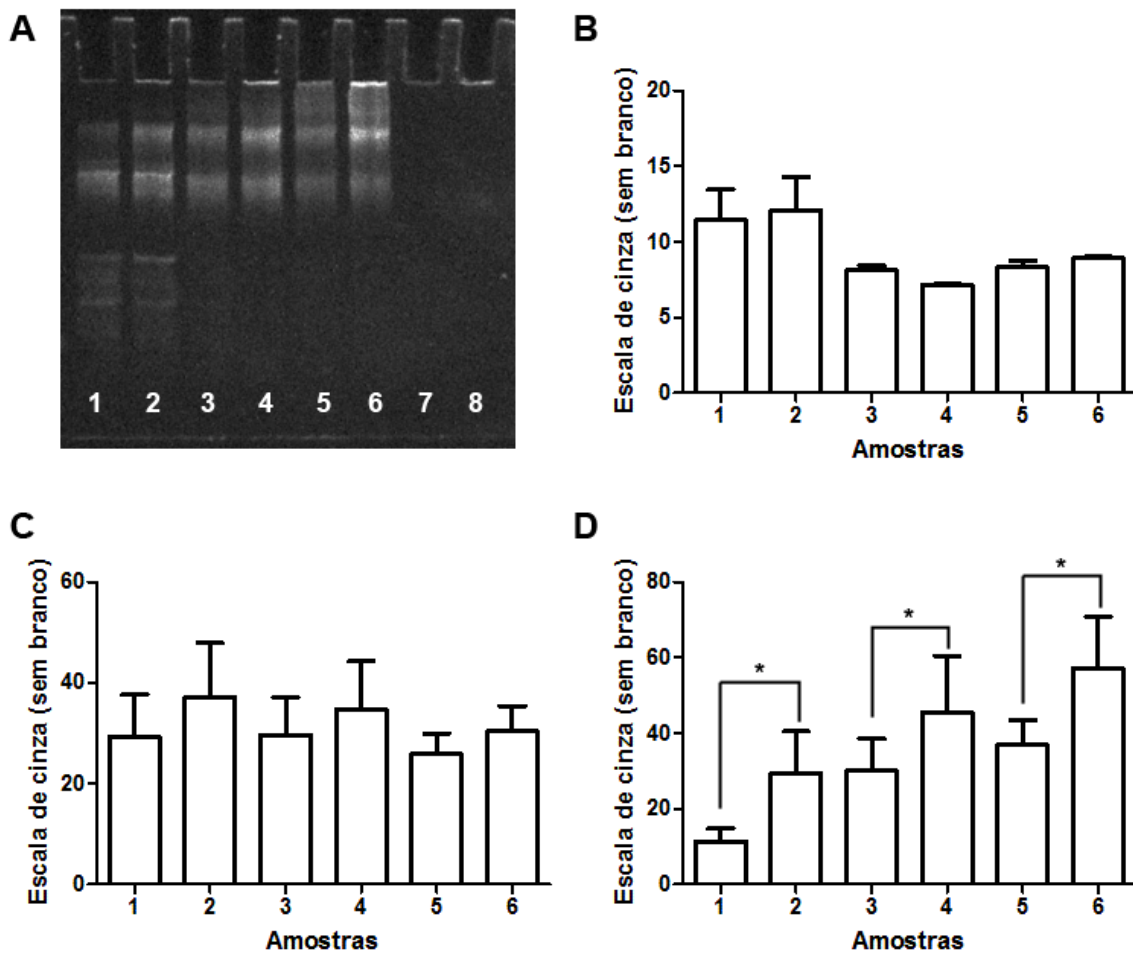


Figura 21 – (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo KCl a 12,5 mM referente a fração hidro-etanólica da geoprópolis. Amostras: (1) óligo L3 (26 bp) contendo 1 µg/µl de fração hidro-etanólica, sem KCl; (2) óligo L3 contendo etanol 70%, sem KCl; (3) óligo L3 contendo 1 µg/µl de fração hidro-etanólica, com KCl a 10 mM; (4) óligo L3 contendo etanol 70%, com KCl a 10 mM; (5) óligo L3 contendo 1 µg/µl de fração hidro-etanólica, com KCl a 100 mM; (6) óligo L3 contendo etanol 70%, com KCl a 100 mM; (7) controle negativo (sem DNA) contendo 1 µg/µl de fração hidro-etanólica, com KCl a 100 mM; (8) controle negativo (sem DNA) contendo etanol 70%, com KCl a 100 mM. (B) Quantificação do gel das bandas referentes à fita simples (com menor peso molecular). (C) Quantificação do gel de bandas (com peso molecular intermediário) referentes à formação de G-quadruplex (G4). (D) Quantificação do gel de bandas (com alto peso molecular) referentes à formação de G4. (\* p < 0,05)

## 2.4. DISCUSSÃO

Como já descrito na literatura, a própolis tem sido frequentemente usada pela medicina popular devido a suas propriedades terapêuticas (Silva *et al.*, 2008). A ideia de se estudar a interação da própolis com G-quadruplex, modulando sua formação, surgiu devido à busca de compostos naturais que atuem na inibição da telomerase, com isso, impedindo a proliferação de células tumorais no câncer (Ragazzon *et al.*, 2009). Neste trabalho foram executados ensaios *in vitro* para analisar essa interação, através de dois tipos distintos de própolis com diferentes origens e composições: a própolis vermelha e a geoprópolis.

No estudo do extrato etanólico de própolis vermelha houve uma diminuição na intensidade da banda de alto peso molecular, de maneira dose-dependente, na ausência do potássio (cátion estabilizador de G-quadruplex). Não houve diferença nas bandas quando o cátion estava presente. Podemos explicar esta possível interação com o G-quadruplex por causa de constituintes bioativos presentes na própolis vermelha como flavonóides, isoflavonas, pterocarpanos, chalconas, compostos fenólicos entre outros (Li *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008 e 2013; Alencar *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2009; Trusheva *et al.*, 2006). Entre as isoflavonas relatadas podemos destacar duas que são conhecidas por estabilizar a estrutura do G-quadruplex quando presentes: daidzeína (Zang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006) e quercetina (Sun *et al.*, 2006; Ragazzon *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012).

Os flavonóides, assim como isoflavonas, são considerados compostos importantes que atuam como antioxidantes no organismo humano. Frozza *et al.* (2012) mostraram que a própolis vermelha possui compostos que agem de modo semelhante às enzimas superóxido-dismutase e catalase. A enzima superóxido-dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio, enquanto a catalase converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio molecular. Baseado nisso, podemos pressupor que um dos efeitos da própolis vermelha se basearia na

redução do estresse oxidativo, com isso evitando degradação do DNA e formação de estruturas secundárias como o G-quadruplex.

Em relação aos ensaios que utilizaram os extratos etanólico e aquoso da geoprópolis e suas frações, pode-se observar que houve influência na formação de G-quadruplex somente nas presenças do EEGP, extrato aquoso, frações aquosa, acetato de etila e hidro-etanólica. Liberio *et al.* (2011) descobriram a presença de flavonóides na composição química da geoprópolis da *Melipona fasciculata* Smith. Por este motivo, justificaram que o EEGP e sua fração hidro-etanólica tinham ações antimicrobiana (contra *Streptococcus mutans*) e antifúngica (contra *Candida albicans*). Porém, Franchin *et al.* (2012; 2013) mostraram que há ausência de flavonóides e presença de compostos fenólicos na geoprópolis da *Melipona scutellaris*, sendo que a maior concentração destes compostos estão em sua fração aquosa. Nos mesmos trabalhos foram demonstrados que a EEGP e sua fração aquosa diminuíram a hipernocicepção mecânica pela inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , além de inibir a formação de prostaglandinas devido à redução da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e à diminuição da interação de leucócitos (rolamento e adesão) com células endoteliais de camundongos. Aliando-se a esses fatos, outro estudo (Guo *et al.*, 2011) mostrou que compostos fenólicos semelhantes quimicamente aos da geoprópolis e provenientes de líquen foram capazes de se ligar a estruturas G-quadruplex, causando sua estabilização. Desta maneira, estabilizadores de G-quadruplexes tem o potencial de interferir na replicação do telômero através do bloqueio da etapa de alongação feita pela telomerase, podendo então agir como agente anti-tumoral (Guo *et al.*, 2011). Da Cunha *et al.* (2013) observaram que o EEGP da *M. scutellaris* possui atividade anti-tumoral contra cultura de células humanas de melanoma (UACC-62), de câncer de ovário (OVCAR-03) e tumor de próstata (PC-3). Do mesmo modo, o extrato etanólico da geoprópolis de *M. fasciculata* Smith mostrou ser citotóxico contra células de osteosarcoma canino (Cinegaglia *et al.*, 2013). Assim, podemos

sugerir que a geoprópolis é uma possível candidata a compostos naturais que interferem na formação do G-quadruplex.

## **2.5. CONCLUSÃO**

Após analisar e discutir todos os resultados, podemos concluir que houve interação entre os extratos etanólicos de própolis e a formação de G-quadruplex. Foi observada interferência na mobilidade das bandas e na intensidade de brilho das bandas superiores (referente à formação de G-quadruplex) em géis de poliacrilamida, contendo reações compostas por oligonucleotídeo com potencial de formação de G-quadruplex e extratos etanólicos de própolis vermelha (sem potássio) e de geoprópolis. O mesmo comportamento foi visto com o extrato aquoso e as frações de acetato de etila, hidro-etanólica e aquosa da geoprópolis. Por estas razões, podemos sugerir que há necessidade de mais estudos para isolar moléculas de própolis capazes de realizar este tipo de interação. Também seria interessante realizar experimentos específicos para analisar a estabilidade de G-quadruplexes na presença dos extratos de própolis.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of ethnopharmacology*. 2007 Sep 5;113(2):278-83.

Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008 Jan 1;16(1):181-9.

Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007 May;102(2):215-20.

Bates P, Mergny JL, Yang D. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *EMBO Rep*. 2007 Nov;8(11):1003-10. Epub 2007 Sep 28.

Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(19):5402-15. Epub 2006 Sep 29.

Cinegaglia NC, Bersano PR, Araujo MJ, Bufalo MC, Sforcin JM. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:737386.

da Cunha MG, Franchin M, de Carvalho Galvao LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, *et al.* Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13:23.

Duailibe SA, Goncalves AG, Ahid FJ. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *J Appl Oral Sci*. 2007 Oct;15(5):420-3.

Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, *et al.* Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases



and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2003 Apr;26(4):527-31.

Franchi GC, Jr., Moraes CS, Toreti VC, Dausch A, Nowill AE, Park YK. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:918956.

Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Bueno-Silva B, *et al*. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:907041.

Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Koo H, *et al*. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1beta and TNF-alpha. *Journal of ethnopharmacology*. 2012 Sep 28;143(2):709-15.

Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, *et al*. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 2013 Feb;52:137-42.

Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Dec 15;48:2013-8.

Guo J, Li ZL, Wang AL, Liu XQ, Wang J, Guo X, *et al*. Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnolia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells. *Planta medica*. 2011 Dec;77(18):2042-6.

Han FX, Wheelhouse RT, Hurley LH. Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with Quadruplex DNA. Structural Basis for the Differential Effects on Telomerase Inhibition. *J Am Chem Soc*. 1999; 121(15): 3561-70.

Iio A, Ohguchi K, Inoue H, Maruyama H, Araki Y, Nozawa Y, *et al*. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPARgamma activation. *Phytomedicine*. 2010 Oct;17(12):974-9.

Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012 Nov 7;60(44):11065-70.

Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of oral biology*. 2000 Feb;45(2):141-8.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 May;46(5):1302-9.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries research*. 1999 Sep-Oct;33(5):393-400.

Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008 May 15;16(10):5434-40.

Li W, Zhang M, Zhang JL, Li HQ, Zhang XC, Sun Q, *et al.* Interactions of daidzin with intramolecular G-quadruplex. *FEBS letters*. 2006 Sep 4;580(20):4905-10.

Liberio SA, Pereira AL, Dutra RP, Reis AS, Araujo MJ, Mattar NS, *et al.* Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011;11:108.

Maizels N. Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1055-9.

Neidle S, Balasubramanian S. *Quadruplex Nucleic Acids*. Cambridge, UK: RSC Biomolecular Sciences. 2006.

Paviani LC, Dariva C, Marucci MC, Cabral FA. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis. *J Food Process Eng.* 2010 February 2010;33(1):15-27.

Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia.* 2002 Nov;73 Suppl 1:S7-20.

Ragazzon PA, Bradshaw T, Matthews C, Iley J, Missailidis S. The characterisation of flavone-DNA isoform interactions as a basis for anticancer drug development. *Anticancer research.* 2009 Jun;29(6):2273-83.

Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the science of food and agriculture.* 2011 Oct;91(13):2363-70.

Riou JF. G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004 Sep;4(5):439-43.

Silva BB, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimoga MH, *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2013 May 15;61(19):4546-50.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Sep;5(3):313-6.

Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic acids research.* 1998 Mar 1;26(5):1167-72.

Siqueira AB, Gomes BS, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM, *et al.* Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in applied microbiology.* 2009 Jan;48(1):90-6.

Sun H, Tang Y, Xiang J, Xu G, Zhang Y, Zhang H, *et al.* Spectroscopic studies of the interaction between quercetin and G-quadruplex DNA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2006 Jul 1;16(13):3586-9.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, *et al.* Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 Jun;3(2):249-54.

Velikova M, Bankova V, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujungiev A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 2000 Sep-Oct;55(9-10):785-9.

Wang H, Chen T, Wu S, Chu X, Yu R. A novel biosensing strategy for screening G-quadruplex ligands based on graphene oxide sheets. *Biosensors & bioelectronics.* 2012 Apr 15;34(1):88-93.

Zhang JL, Fu Y, Zheng L, Li W, Li H, Sun Q, *et al.* Natural isoflavones regulate the quadruplex-duplex competition in human telomeric DNA. *Nucleic acids research.* 2009 May;37(8):2471-82.

## **CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO EFEITO DA PORFIRINA TMPyP4 NO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO DE MURINO.**

### **3.1. INTRODUÇÃO**

Epigenética é o estudo das mudanças herdáveis da expressão gênica, sem que ocorram alterações na sequência do DNA (Yoo & Jones, 2006; Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011). As modificações de histonas e a metilação do DNA estão entre os mecanismos epigenéticos mais estudados. A metilação do DNA pode ser descrita como marca epigenética capaz de regular a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação celular em seres eucariontes (Jones *et al.*, 1999). Pode ser caracterizada como uma modificação bioquímica que frequentemente ocorre na posição C5 de citosinas presentes nas sequências que contém o dinucleotídeo CpG (citosinas seguidas de guaninas) em células eucariontes (Robertson & Jones, 2000; Jaenish *et al.*, 2003; Yoo & Jones, 2006). Os sítios de CpG estão concentrados ou em ilhas CpG ou em regiões contendo grandes sequências repetitivas, como centrômeros e elementos retrotransposons. Ilhas CpG são pequenas regiões de DNA ricas em citosinas seguidas de guaninas (CpG) presentes em aproximadamente 60% dos promotores de genes humanos (Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011).

As alterações no padrão de metilação do DNA são conhecidas por cooperarem com eventos genéticos e por estarem envolvidos no processo de carcinogênese em humanos (You & Jones, 2012). Como exemplo, a metilação da citosina em regiões promotoras de genes supressores de tumor pode levar ao silenciamento gênico, e até a mutações em células somáticas e germinativas, induzindo essas células ao câncer (Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011).

O melanoma é conhecido como um dos tumores mais agressivos e se desenvolve a partir da transformação maligna de melanócitos, que são células responsáveis pela síntese de melanina, um pigmento distribuído entre queratinócitos da epiderme para evitar lesões do DNA promovidas principalmente

por radiação ultravioleta (UV) (da Cruz & Jasiulionis, 2012). Bloqueios de ancoragem em ciclos sequenciais realizados em linhagem de células de melanócitos murinos (melan-a) causam alterações nos padrões de metilação de DNA modulados pelo estresse oxidativo, levando à transformação maligna desse tipo de células (Campos *et al.*, 2007; Molognoni *et al.*, 2011). A progressão do melanoma requer a desregulação da expressão gênica causada por mecanismos epigenéticos ainda desconhecidos (Molognoni *et al.*, 2011).

Como é considerado um dos tumores mais agressivos, o melanoma possui a capacidade de causar metástases letais à distância mesmo quando o volume do tumor primário é pequeno (com cerca de 1 mm<sup>3</sup>) (Lian *et al.*, 2012). Além disso, não há tratamentos eficazes para a doença. As vítimas de melanoma metastático possuem altas taxas de mortalidade, com sobrevida média em torno de 6 meses. Por isso, os tratamentos de melanoma são limitados somente à excisão cirúrgica quando diagnosticados precocemente (da Cruz & Jasiulionis, 2012).

Por estes motivos, a procura por novas drogas que atuem como alvos terapêuticos contra vários tipos de câncer têm aumentado nos últimos anos. Uma droga muito testada como alvo terapêutico na literatura é a porfirina catiônica *TMPyP4* (5,10,15,20-tetra(N-metil-4-piridil)porfirina). Este composto se tornou conhecido por ter alta afinidade por estruturas secundárias de DNA G-quadruplex presentes na região dos telômeros e, deste modo, são capazes de inibir eficazmente a telomerase (Izbicka *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 2000). Por sua vez, G-quadruplexes podem ser definidos como sequências de ácidos nucleicos (DNA) ricas em guanina, capazes de formar tétrades ligadas por pontes de hidrogênio do tipo Hoogsteen e fortemente estabilizadas na presença de um cátion monovalente (potássio, sódio ou lítio) (Burge *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a estabilização do G-quadruplex pela porfirina *TMPyP4* leva à repressão do oncogene *c-MYC*, tornando assim os G-quadruplexes potenciais alvos moleculares capazes de interferir seletivamente na expressão de oncogenes (Siddiqui-Jain *et al.*, 2002). Esta porfirina também apresentou atividade anti-tumoral contra linhagem de

células de leucemia (K562) (Mikami-Terao *et al.*, 2008) e mostrou ser citotóxica contra outros tipos celulares tumorais humanos, como de o carcinoma cervical (HeLa), o hepatocarcinoma (HepG2) e o glioma (U251) (Zhuang *et al.*, 2013).

Na literatura já foram descritos trabalhos associando G-quadruplexes com metilação de DNA. Hardin *et al.* (1993) mostraram que a metilação de citosinas na base vizinha ao GGG estabiliza o complexo G-quadruplex, por meio de oligonucleotídeos contendo sequências ricas em guanina e CpG. Em 2002, Majewski *et al.* co-localizaram regiões ricas em repetições de GGG e CpG no genoma humano e verificaram que estas regiões se concentravam no primeiro éxon, início do primeiro íntron e no promotor dos genes. Halder *et al.* (2010) demonstrou por análises de bioinformática que sequências do genoma humano contendo G-quadruplex e CpG são hipometiladas quando comparadas a outras regiões.

O presente estudo tem como objetivo analisar o padrão de metilação da linhagem de células de melanoma metastático (4C11+) após tratamento com *TMPyP4*.

### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### *Reagentes e anticorpos*

O meio de cultura RPMI, o soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina (*Gibco*) foram obtidos na *Cultilab (Campinas, SP, BR)*. 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (PMA), a porfirina *TMPyP4*, Tween, proteinase K, dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), albumina de soro bovino (BSA), paraformaldeído, borato de sódio, ácido clorídrico (HCl), metanol e brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) foram adquiridos da *Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)*. Foram também utilizados o anticorpo contra *anti-5-MeC (anti-5-metil-citosina)* e o anticorpo secundário de cabra anti-IgG do camundongo conjugada com fluoresceína (*Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.*

(KPL), Gaithersburg, MD). As enzimas endonucleases *MspI* e *HpaII* foram obtidas da Fermentas (St. Leon-Rot, Germany).

#### Linhagens de células e cultura

Para a realização do ensaio foram utilizadas linhagens de melanócitos não-tumorigênicos murinos (melan-a) (Bennett *et al.*, 1987) e de células de melanoma metastático 4C11+ (Campos *et al.*, 2007), gentilmente fornecidas pela prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miriam Jasiulionis (Departamento de Farmacologia, UNIFESP). Os melanócitos cresceram no meio de cultura RPMI (pH 6.9, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 5% (Gibco BRL, Grand Island, NY), antibióticos penicilina e estreptomicina (Gibco), e 200 nM de acetato miristato forbol (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), e foram incubados em temperatura de 37°C na presença de 5% CO<sub>2</sub>. A linhagem de células de melanoma metastático 4C11+ foi estabelecida após submeter a cultura de células melan-a a ciclos sequenciais de bloqueio de ancoragem (Campos *et al.*, 2007). O meio de cultura das células 4C11+ é o mesmo da melan-a, mas com ausência de PMA. A viabilidade e a densidade celular foram determinadas pelo teste de exclusão com corante azul de tripan, sendo as células repicadas a cada 3 dias.

#### Ensaio com a porfirina TMPyP4

O ensaio com a porfirina *TMPyP4* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) foi realizado com a mínima exposição de luz, por se tratar de uma droga fotossensível. As células da linhagem 4C11+ foram classificadas em dois grupos conforme o tratamento para os ensaios de citometria de fluxo e de metilação global com endonucleases *MspI* e *HpaII*:

- (1) *Controle*: contendo células sem tratamento mantidas em cultura por 48 horas;
- (2) *Tratado*: composto por células tratadas com *TMPyP4* a 100 µM por 48 horas.



### Ensaio de Citotoxicidade da TMPyP4

A citotoxicidade da droga *TMPyP4* foi induzida nas células de melanoma metastático de murino 4C11+ ( $3,5 \times 10^4$ /mL) cultivadas em sextuplicatas (6 amostras de cada grupo) em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com FBS 5%. Depois de 24 horas de incubação a 37°C em um atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram tratadas com diferentes concentrações de *TMPyP4* (0, 50, 100 e 200 µM) em meio RPMI 1640 suplementado com FBS 5%, enquanto as amostras controle foram tratadas com o volume correspondente de meio de cultura sem a droga. Todas as amostras foram incubadas por 24 e 48 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Os efeitos da *TMPyP4* sobre a viabilidade celular foram avaliados pelo ensaio de redução do MTT (MTT) a formazan pela atividade de desidrogenases mitocondriais. Os resultados foram expressos como a percentagem da viabilidade das células controle não tratadas (100%).

### Ensaio de penetração da TMPyP4 nas células

As células de melanoma metastático 4C11+ foram plaqueadas em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços. Depois de 48 horas de tratamento com *TMPyP4* a 100 µM, as células foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas em paraformaldeído 2% por 1 hora e lavadas novamente com PBS. Depois, as membranas das células foram marcadas com 10 µg/ml de *WGA conjugado com Alexa Fluor 594 (WGA594)* por 30 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro para microscopia usando meio de montagem *Fluoromount-G (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)* e então analisadas por um microscópio confocal de varredura a laser invertido (*Leica TCS SP5 AOBS Confocal Microscope, Wetzlar, Germany*). O *WGA594* foi excitado por um laser *HeNe* a 546 nm e sua emissão de luz foi detectada entre 560 a 610 nm. Já a droga *TMPyP4* teve o comprimento de onda de excitação de 633 nm e de

emissão de luz estava entre 700 a 800 nm. As imagens foram montadas através do software *Adobe Photoshop® 9.2* (*Adobe Systems Software Ireland Ltd.*).

#### Análise de metilação global do DNA genômico usando enzimas de restrição nas células tratadas e não tratadas com TMPyP4

O DNA genômico das células melan-a (sem tratamento) e 4C11+ (controle e tratada) foi coletado após as 48 horas do tratamento, sendo depois submetido à digestão com *SDS/proteinase K* em tampão *TE* (Tris-EDTA), seguido pela extração padrão por fenol/clorofórmio (Sambrook & Russel, 2006). A metilação global foi determinada através digestão do DNA genômico pelas endonucleases *HpaII* (catálogo #FD0514) e *MspI* (#FD0544), as quais possuem o mesmo sítio de restrição (CCGG). Entretanto, apenas a enzima *HpaII* é sensível à metilação do DNA. Foram digeridos ou não, 2 µg de DNA genômico com 2 µl de cada enzima (*Fast Digest, Fermentas, Glen Burnie, MD USA*) em reações separadas. O DNA foi digerido a 37°C por 16 horas e, depois deste período, 1 µl de cada enzima foi adicionado e os tubos foram mantidos a 37°C por mais uma hora. As amostras foram reveladas em gel de agarose a 0.8% contendo brometo de etídio. Cada ensaio foi realizado em duplicatas. A intensidade da banda correspondente ao DNA genômico intacto em diferentes amostras foi determinado usando o software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) versão 1.42q. A porcentagem de metilação foi calculada usando a fórmula de Molognoni *et al.* (2011):

$$\text{Conteúdo de metilação global relativa do DNA} = \frac{([\text{HpaII}] - [\text{MspI}] \times 100)}{\text{DNA genômico}}$$

#### Análise de conteúdo global de 5-metilcitosina usando citometria de fluxo em células tratadas e não tratadas com TMPyP4

A metilação global do DNA foi analisada pela coloração das células utilizando um anticorpo monoclonal específico contra a 5-metilcitosina (*5-MeC*; *Oncogene, La Jolla, CA, catálogo #NA81*), descrito por Milutinovic *et al.* (2003). As

células foram lavadas em PBS complementado com 0.1% de Tween 20 e 1% de albumina de soro bovino (PBS-TB), fixadas com 0.25% de paraformaldeído a 37°C por 10 minutos, seguido por 88% de metanol a -20°C por no mínimo 30 minutos. Após a lavagem, as células foram tratadas com HCl 2 N a 37°C por 30 minutos, neutralizadas com borato de sódio 0.1 M (pH 9.0), e bloqueadas com 10% de soro de camundongo por 20 minutos a 37°C. Então, as células foram incubadas com o anticorpo anti-5-MeC em uma concentração final de 1 mg/mL por 45 minutos a 37°C, seguida pela incubação com o anticorpo de cabra anti IgG do camundongo conjugada com fluoresceína (*Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. - KPL, Gaithersburg, MD*) por 30 minutos por 37°C. Finalmente, o conteúdo de metilcitosina nas células 4C11+ tratadas e não tratadas com *TMPyP4* foi analisado por citometria de fluxo (Campos *et al.*, 2007). O mesmo ensaio foi realizado nas células melan-a sem tratamento e mantidas em cultura por 48 horas.

#### *Imunodeteccção de 5-Mec na linhagem de células 4C11+*

Para a análise de microscopia de imunofluorescência, as células de melanoma metastático 4C11+ foram cultivadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Depois do tratamento com *TMPyP4* a 100 µM, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2% em PBS por 1 hora e permeabilizadas por 30 minutos em PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e 1% de BSA. Após várias lavagens com PBS, as células foram incubadas com um anticorpo monoclonal de camundongo contra 5-metil-citosina (5-MeC) (*Calbiochem (EMD Millipore), Billerica, MA, USA*). Essa incubação foi executada a 37°C por 1 hora (diluição de 1:500 em PBS-BSA 2%), seguida por 3 lavagens com PBS com intervalos de 30 minutos, e incubação com anticorpo secundário anti-camundongo marcado com Alexa Fluor 594 (*Invitrogen/Molecular Probes, USA*) por 1 hora em temperatura ambiente no escuro. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro para microscopia usando o meio de montagem Fluoromount-G (*Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA*) e então analisadas por um microscópio confocal de varredura a laser invertido (*Leica TCS SP5 AOBS Confocal Microscope, Wetzlar, Germany*). A

droga *TMPyP4* teve comprimento de onda de excitação com laser *HeNe* de 633 nm e de emissão de luz entre 700 a 800 nm. Já a marcação com 5-MeC foi excitada com laser *HeNe* a 546 nm e sua emissão foi capturada entre 560 a 590 nm. As imagens foram montadas através do software *Adobe Photoshop® 9.2* (*Adobe Systems Software Ireland Ltd.*).

### Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística pelo software Bioestat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/>) através do teste paramétrico “Teste T de Student” para amostras relacionadas (para as células 4C11+ submetidas ao tratamento) e para amostras independentes (quando comparou os resultados das células 4C11+ com dados dos melanócitos normais), ao nível de significância de 5%.

## **3.3. RESULTADOS**

### Redução da viabilidade celular induzida pela *TMPyP4* na linhagem de células de melanoma metastático de murino (4C11+)

Vários estudos relataram que efeitos pró-apoptóticos da *TMPyP4* em diferentes culturas de células (Zhuang *et al.*, 2013; Izbicka *et al.*, 1999; Mikami-Terao *et al.*, 2008). Para determinar os efeitos da *TMPyP4* na linhagem de células de melanoma metastático murino 4C11+, as células foram expostas a diferentes concentrações da porfirina *TMPyP4* por 24 e 48 horas, e depois foi realizada a análise de viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT (Izbicka *et al.*, 1999). Houve a redução da viabilidade das células 4C11+ após de 24 horas de tratamento de modo dose-dependente em resposta ao aumento das concentrações da droga (0 a 200  $\mu\text{M}$ ), porém não foi possível determinar o valor de  $\text{IC}_{50}$  no momento dessa exposição (Figura 22A). Já após 48 horas de tratamento com *TMPyP4*, a viabilidade de 50% (valor do  $\text{IC}_{50}$ ) foi obtida com a concentração por volta de 100  $\mu\text{M}$  da droga (Figura 22B).

Alguns trabalhos da literatura indicaram que as porfirinas se localizam preferencialmente em tecido tumoral, embora sua localização intracelular possa variar de acordo com a estrutura e a carga líquida da porfirina. Georgiou *et al.* (1994) mostraram que a porfirina *TMPyP4* se acumula rapidamente no núcleo de fibroblastos dérmicos humanos. O mesmo comportamento foi observado em fibroblastos murinos (Cogoi & Xodo, 2010). Com o intuito de conhecer a distribuição intracelular de *TMPyP4*, tratamos as células 4C11+ com *TMPyP4* a 100  $\mu$ M por 48 horas e depois analisamos a localização intracelular da droga por microscopia confocal de fluorescência. A figura 22C demonstra que a *TMPyP4* possui afinidade com o DNA, indicando que as porfirinas podem se acumular no núcleo de células tumorais intactas.

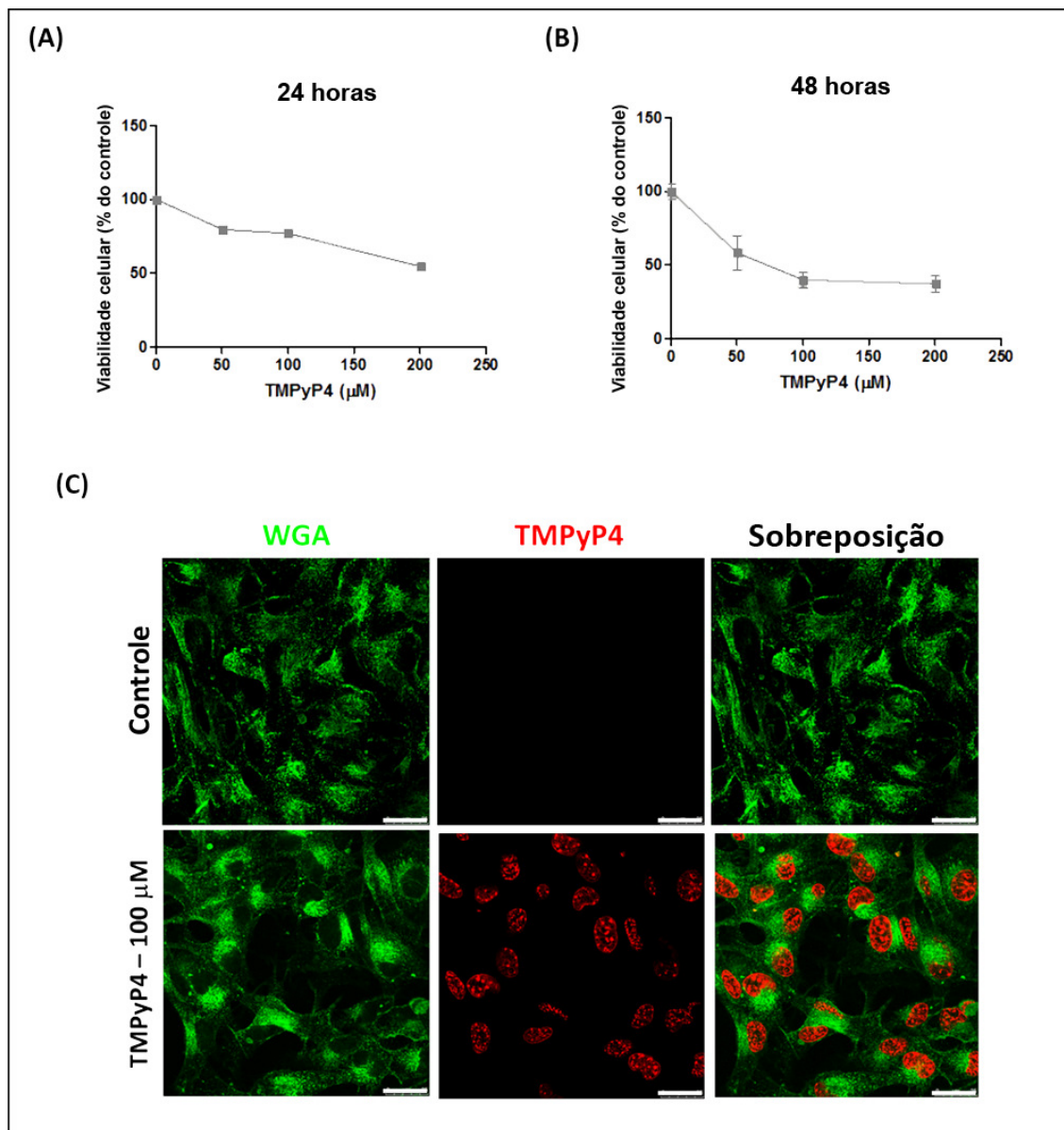


Figura 22 - Citotoxicidade e localização nuclear da porfirina *TMPyP4* após tratamento em células da linhagem 4C11+. Camadas semi-confluentes de células 4C11+ foram tratadas com diferentes concentrações de *TMPyP4* (0 a 200  $\mu\text{M}$  em meio de cultura RPMI) por 24 h (A) e 48 h (B). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular do controle (100%) e nos gráficos (A) e (B) estão representadas a média  $\pm$  o desvio padrão dos experimentos independentes, que foram executados em sextuplicatas. (C) Para determinar a localização da *TMPyP4*, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro e tratadas por 48 h com *TMPyP4* a 100  $\mu\text{M}$ . As imagens contendo a localização intracelular da *TMPyP4* nas células 4C11+ foram adquiridas por microscopia confocal de fluorescência. O comprimento de onda de excitação da *TMPyP4* pelo laser HeNe foi 633 nm e de emissão de luz foi detectado entre 700 a 800 nm. As membranas foram coradas com WGA-594. As imagens representam três experimentos independentes. (Barras = 25  $\mu\text{M}$ ).

### Hipometilação global do genoma na linhagem de células de melanoma metastático

Embora a hipometilação do DNA tenha sido encontrada em vários tumores humanos e possa afetar muitas regiões genômicas, seu papel na biologia dos tumores ainda permanece elusivo (De Smet & Lorient, 2013). Além disso, foi observado que durante o processo de transformação maligna da linhagem de células 4C11+ existe uma hipometilação global dessas células quando comparadas com a melan-a, linhagem de células não-tumorigênicas (Campos *et al.*, 2007; Molognoni *et al.*, 2011). Nesse contexto, utilizamos dois métodos distintos para validar o perfil hipometilado das células 4C11+. Um deles fez uso das enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*, que reconhecem e digerem o mesmo sítio (CCGG), mas possuem sensibilidade diferencial à metilação do DNA. Como resultado (Figuras 23A e B), houve hipometilação significativa ( $p < 0,001$ ) das células tumorais 4C11+ em comparação às células melan-a (linhagem não-tumorigênica). Já o segundo método, o ensaio de citometria de fluxo, determinou o conteúdo de metilação global através de anticorpos específicos que emitem fluorescência (Figura 23C). Ambos os ensaios demonstraram que houve hipometilação do DNA na linhagem de células tumorais em relação à linhagem de melanócitos não tumorais, corroborando com os resultados apresentados por Campos *et al.* (2007) e Molognoni *et al.* (2011).

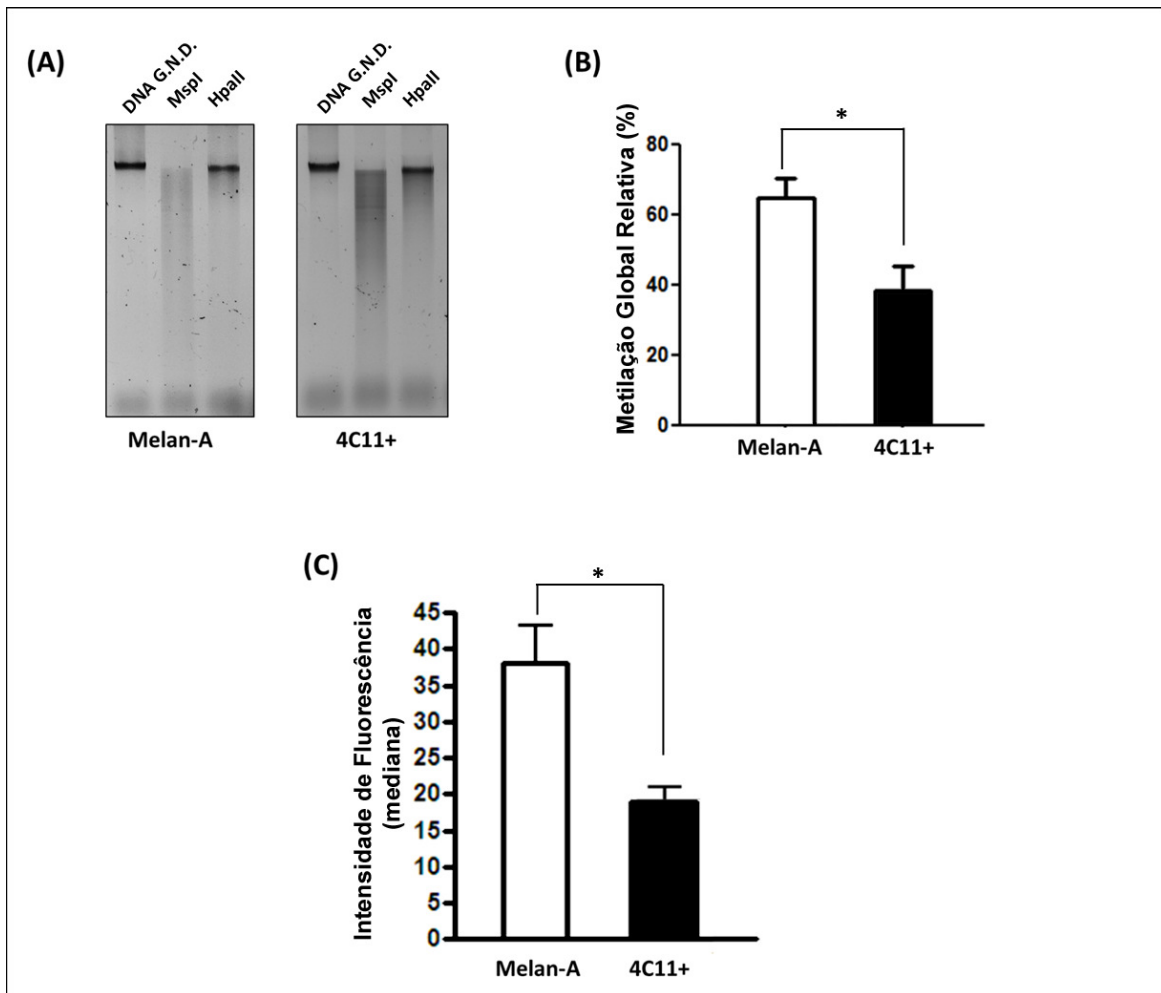


Figura 23 – Comparação entre os perfis de metilação global do DNA em linhagens de células não-tumorigênicas e tumorigênicas. (A) A porcentagem de metilação global relativa foi analisada pela relação entre o DNA genômico digerido pelas enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. O DNA genômico não digerido foi usado como modelo de controle positivo. (B) Representação gráfica da análise de densitometria das bandas. As colunas representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dois experimentos independentes, feitos em duplicata. (C) O conteúdo de metilação global do DNA foi determinado por citometria de fluxo através de anticorpo específico contra 5-metilcitosina (5-MeC). Os resultados foram expressos em mediana e representado como média  $\pm$  desvio padrão dos experimentos em duplicata. (DNA G.N.D. = DNA genômico não digerido; *MspI* = endonuclease com sítio de restrição (CCGG); *HpaII* = endonuclease com sítio de restrição (CCGG), sensível à metilação do DNA; \* =  $p < 0,001$ ).



### Hipermetilação induzida pela porfirina TMPyP4 em células de melanoma metastático

Estudos relatam a existência de uma relação entre estruturas secundárias de DNA e a metilação em todo o genoma, porém este mecanismo é pouco entendido (Hardin *et al.*, 1993; Halder *et al.*, 2010; De & Michor, 2011). É evidente que formas alternativas de DNA são funcionalmente relevantes nos processos de replicação, recombinação e transcrição. Neste trabalho, estamos analisando o papel de estruturas alternativas de DNA na metilação de citosinas através de ligantes de G-quadruplex como modelo experimental. Para provar este tipo de relação utilizamos a droga *TMPyP4*, que é uma porfirina capaz de se ligar à estrutura G-quadruplex no DNA (Izbicka *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 2000). Para isso, tratamos as células 4C11+ com *TMPyP4* a 100 µM por 48 horas e, após ao tratamento, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal específico contra 5-metil-citosina (5-MeC). A figura 24A mostra a co-localização da *TMPyP4* com a marcação do anticorpo específico contra 5-MeC visualizada por microscopia confocal de fluorescência. Em seguida, utilizamos duas metodologias distintas para avaliar os perfis de metilação global do DNA após o tratamento com *TMPyP4*: citometria de fluxo e digestão do DNA genômico com endonucleases *HpaII* e *MspI*. O resultado apresentado na figura 24C mostrou que o tratamento com *TMPyP4* promove eventos de hipermetilação em linhagem de células de melanoma metastático.

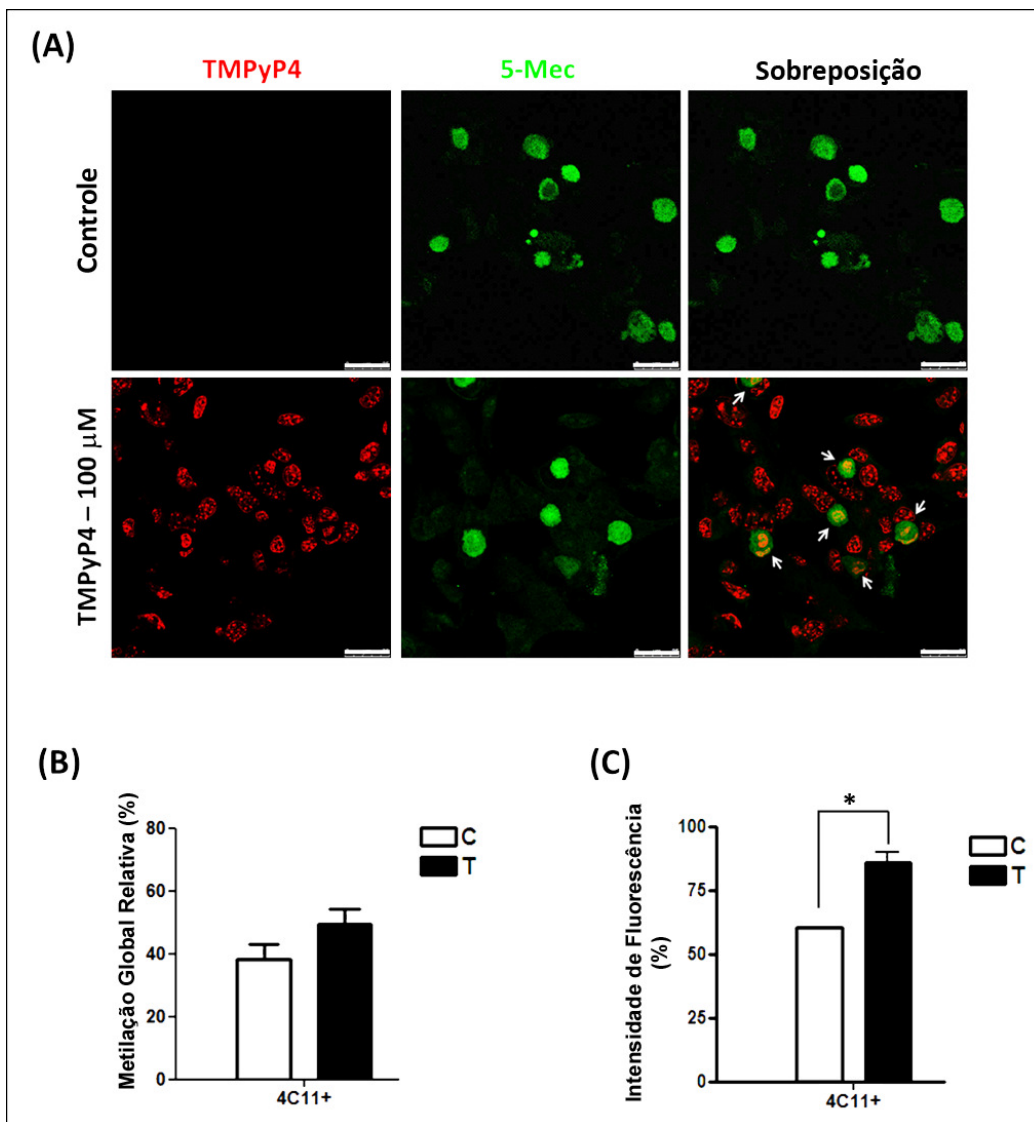


Figura 24 – Tratamento com *TMPyP4* promove hipermetilação do DNA de células da linhagem de melanoma metastático de murino (4C11+). (A) Células 4C11+ confluentes foram tratadas com *TMPyP4* a 100  $\mu$ M por 48 horas. Após o tratamento, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal específico contra 5-metil-citosina (5-MeC) e analisadas por microscopia confocal de fluorescência. (B) Depois do tratamento e da extração de DNA, a porcentagem de metilação global relativa foi obtida pela relação entre o DNA genômico digerido pelas enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. O DNA genômico não digerido foi usado como modelo de controle positivo. (C) O conteúdo de metilação global do DNA foi determinado por citometria de fluxo através de anticorpo específico contra 5-metilcitosina (5-MeC). Os resultados foram expressos em porcentagem e representado como média  $\pm$  desvio padrão dos experimentos em duplicata (C = Células controle; T = Células tratadas com *TMPyP4*). O comprimento de onda de excitação da *TMPyP4* pelo laser HeNe foi 633 nm e de emissão de luz foi detectado entre 700 a 800 nm. 5-MeC foi excitada com laser HeNe a 546 nm e sua emissão de luz foi capturada entre 560 a 590 nm. As imagens representam três experimentos independentes. (Barras = 25  $\mu$ m; \* =  $p < 0,001$ ).

Tratamento com TMPyP4 reverte a hipometilação do DNA em linhagem de células de melanoma metastático

Em termos de metilação de CpG no DNA, as células tumorais se encontram hipometiladas em todo o genoma e hipermetiladas em regiões promotoras contendo ilhas CpG (You & Jones, 2012). Esses processos coexistem em neoplasias humanas: a hipermetilação específica de ilhas CpG pode estar localizadas em promotores ou em margens (*shores*) de genes críticos e a hipometilação global de sequências repetitivas podem resultar em instabilidade genômica (Bird *et al.*, 2002). Como o tratamento com TMPyP4 nas células 4C11+ resultou em hipermetilação global, comparamos este resultado com o perfil de metilação global da linhagem de melanócitos não-tumorais (melan-a). A figura 25C mostra que o tratamento com *TMPyP4* pode ser capaz de reverter a hipometilação do DNA da linhagem de células tumorais 4C11+.

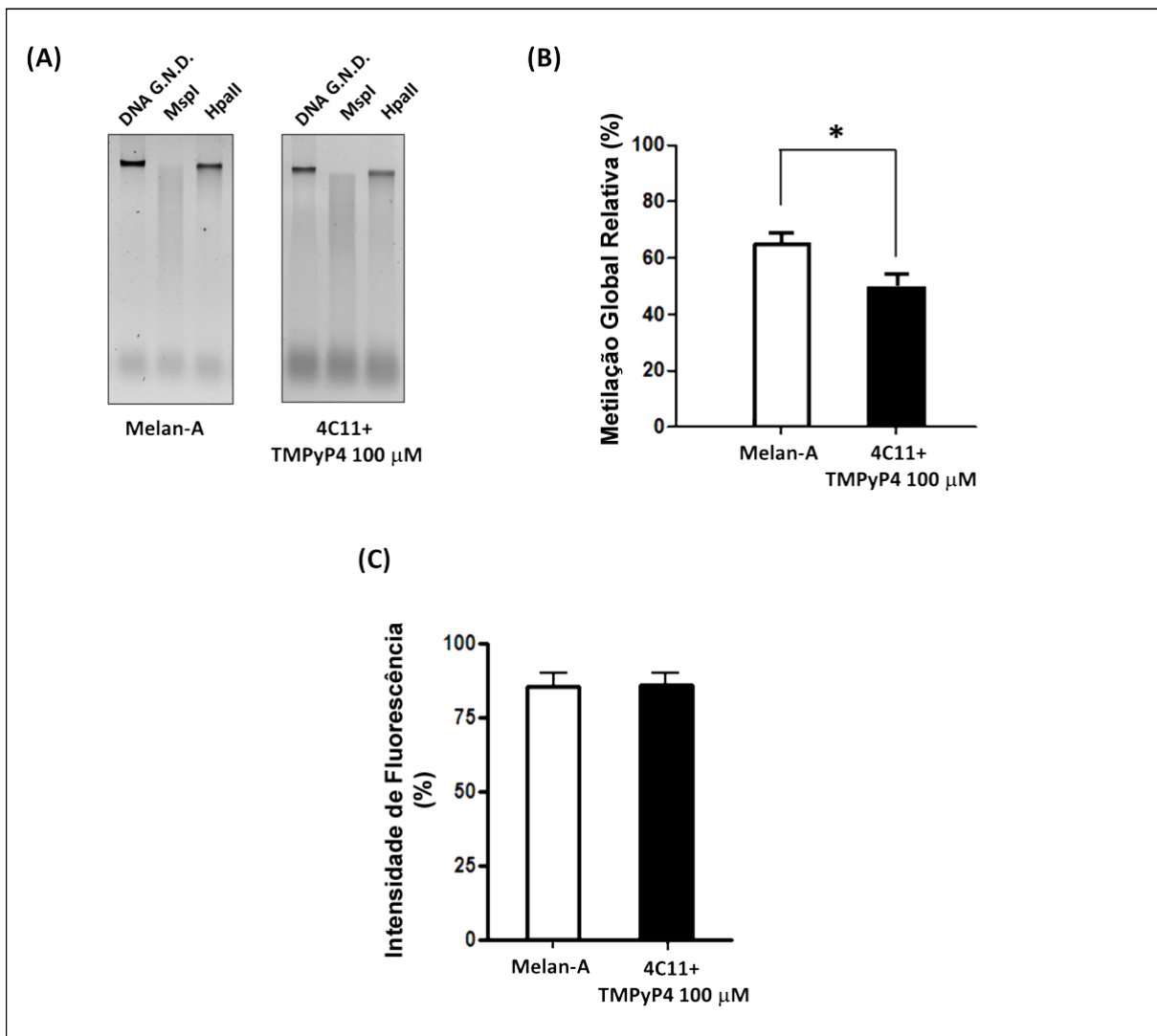


Figura 25 – O tratamento com *TMPyP4* reverte a hipometilação do DNA da linhagem de células de melanoma metastático (4C11+). (A) A porcentagem de metilação global relativa foi analisada pela relação entre o DNA genômico digerido pelas enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. O DNA genômico não digerido foi usado como modelo de controle positivo. (B) Representação gráfica da análise de densitometria das bandas. (C) O conteúdo de metilação global do DNA foi determinado por citometria de fluxo através de anticorpo específico contra 5-metilcitosina (5-MeC). Os resultados foram expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  desvio padrão dos experimentos em duplicata. (DNA G.N.D. = DNA genômico não digerido; *MspI* = endonuclease com sítio de restrição (CCGG); *HpaII* = endonuclease com sítio de restrição (CCGG), sensível à metilação do DNA; \* =  $p < 0,05$ ).

### 3.4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve buscas por alvos terapêuticos contra várias doenças, incluindo o câncer. Um desses possíveis alvos está associado a estudos envolvendo o telômero (região presente nas extremidades dos cromossomos) e a enzima telomerase, que é responsável pela manutenção do telômero (Blackburn, 1991). O estudo da porfirina catiônica *TMPyP4* surgiu com o intuito desse composto atuar como alvo para intervenção terapêutica através da estabilização de regiões de DNA telomérico que continham G-quadruplex e, assim, inibir a atividade da telomerase (Izbicka *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 2000; Mikami-Terao *et al.*, 2008). Desta maneira, pequenas moléculas que estabilizam a conformação do G-quadruplex podem interferir com a manutenção do telômero, levando ao encurtamento do mesmo, senescência e apoptose de células tumorais (Zhuang *et al.*, 2013). O tratamento após 48 horas com *TMPyP4* em células de melanoma metastático (4C11+) levou à citotoxicidade em doses acima de 100  $\mu$ M desse composto, com uma viabilidade menor de 50% dessas células.

Já a relação entre G-quadruplex e padrão de metilação do DNA, trabalhos na literatura mostraram que sequências de DNA genômico com potencial para formar G-quadruplex estavam hipometiladas quando comparadas a outras regiões do genoma (Halder *et al.*, 2010; De & Michor, 2011; Tsumagari *et al.*, 2008; Baral *et al.*, 2013). Sabendo que hipometilação e instabilidade genômica são marcas de muitos cânceres (Baral *et al.*, 2013), um estudo correlacionando tecidos de câncer, padrão de metilação de DNA e G-quadruplex (De & Michor, 2011) apontou que a hipometilação anormal em regiões enriquecidas por G-quadruplex poderia estar associada a alterações no número de cópias de células somáticas e, ao mesmo tempo, poderia atuar como um fator mutagênico devido a quebras no DNA durante a sua replicação, causadas pelo G-quadruplex.

Entretanto, aqui neste trabalho observamos que as células 4C11+ tratadas com a porfirina *TMPyP4* apresentavam hipermetilação global em relação ao perfil de metilação das mesmas células controle (sem tratamento). Isto pode ser justificado pelo fato que a porfirina catiônica *TMPyP4* é um composto capaz

de, ao mesmo tempo, desestabilizar estruturas de G-quadruplex que contém a sequência d(CGG)<sub>n</sub> e estabilizar quadruplexes presentes em regiões teloméricas (Weisman-Shomer *et al.*, 2003). Uma possível explicação dessa hipermetilação das células tumorais pode ser que quando o G-quadruplex está desestabilizado, as enzimas *DNA-metiltransferases* (DNMTs) conseguem se ligar a essas sequências, permitindo a metilação dessas células. As DNMTs são responsáveis por catalisar a adição do grupo metil em dinucleotídeos CpG e, por isso, estão no comando de padrão de metilação do DNA (da Cruz & Jasiulionis, 2012). Possivelmente, as enzimas *DNMT3a* e *DNMT3b* podem estar relacionadas a esse novo processo de hipermetilação das células 4C11+, já que elas são consideradas “*de novo*” metilases, isto é, permitem estabelecer novos perfis de metilação no DNA (da Cruz & Jasiulionis, 2012; Jones, 2012).

Yoo & Jones (2006) descreveram que a reversibilidade potencial de padrões de metilação de DNA como tratamento do câncer é viável, sendo o objetivo específico da terapia epigenética restaurar os padrões de metilação para os perfis normais. Por estes motivos, com o resultados obtidos neste estudo podemos inferir que o tratamento das células de melanoma metastático com *TMPyP4* pode reverter a hipometilação do DNA global, tornando o padrão de metilação pós-tratamento próximo ao de uma célula não-tumoral (melanócitos melan-a).

Em relação a metodologias utilizadas para quantificar o perfil de metilação do DNA das células, a citometria de fluxo é considerada uma das técnicas mais confiáveis para este intuito quando comparada com a digestão de DNA genômico por nucleases sensíveis à metilação. A citometria de fluxo faz uso de corantes fluorescentes que se ligam diretamente ao DNA (Alberts *et al.*, 2002), sendo que neste estudo foi utilizado anticorpo monoclonal contra 5-metilcitosina (5-MeC) capaz de marcar regiões específicas com CpG metilados. Já um dos pontos negativo sobre o uso de nucleases sensíveis à metilação, é que essas enzimas possuem sítios de restrição específicos para clivagem, como a *HpaII* que contém a sequência palindrômica “CCGG”. Para tornar a utilização de nucleases

como método específico para metilação seria necessário fazer uso de outras enzimas também sensíveis à metilação. Além disso, esta técnica é muito sensível à quantidade de DNA, temperatura e pH, fatores que facilmente podem influenciar o experimento.

### **3.5. CONCLUSÃO**

Levando em consideração todas as análises e discussões dos resultados, podemos concluir que:

- O tratamento com *TMPyP4* pode ser citotóxico à linhagem de células de melanoma metastático (4C11+) em concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$ .

- A porfirina catiônica *TMPyP4* modificou o padrão de metilação do DNA das células 4C11+, tornando-as hipermetiladas quando comparadas às células sem tratamento. Dessa maneira, esse composto foi capaz de modular o padrão de metilação das células tumorais de modo que se assemelhassem ao das células não tumorais (melan-a).

Apesar dos resultados obtidos, ainda há a necessidade de mais estudos envolvendo ensaios genes-específicos para metilação do DNA e a análise de G-quadruplex das células tumorais após o tratamento com *TMPyP4*, determinando se esta porfirina pode ser considerada uma candidata potencial para a terapia epigenética.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed: New York: Garland Science. 2002.

Baral A, Kumar P, Pathak R, Chowdhury S. Emerging trends in G-quadruplex biology - role in epigenetic and evolutionary events. *Molecular bioSystems*. 2013 Jul 4;9(7):1568-75.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *International journal of cancer*. 1987 Mar 15;39(3):414-8.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002 Jan 1;16(1):6-21.

Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991 Apr 18;350(6319):569-73.

Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research*. 2006;34(19):5402-15.

Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, *et al*. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia (New York, NY)*. 2007 Dec;9(12):1111-21.

da Cruz AT, Jasiulionis MG. miRNAs and Melanoma: How Are They Connected? *Dermatology research and practice*. 2012;2012:528345.

De S, Michor F. DNA secondary structures and epigenetic determinants of cancer genome evolution. *Nature structural & molecular biology*. 2011 Aug;18(8):950-5.

De Smet C, Lorient A. DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;754:149-66.

Georgiou GN, Ahmet MT, Houlton A, Silver J, Cherry RJ. Measurement of the rate of uptake and subcellular localization of porphyrins in cells using



fluorescence digital imaging microscopy. *Photochemistry and photobiology*. 1994 Apr;59(4):419-22.

Halder R, Halder K, Sharma P, Garg G, Sengupta S, Chowdhury S. Guanine quadruplex DNA structure restricts methylation of CpG dinucleotides genome-wide. *Molecular bioSystems*. 2010 Dec;6(12):2439-47.

Han FX, Wheelhouse RT, Hurley LH. Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with Quadruplex DNA. Structural Basis for the Differential Effects on Telomerase Inhibition. *Journal of the American Chemical Society*. 1999 2013/07/16;121(15):3561-70.

Hardin CC, Corregan M, Brown BA, 2nd, Frederick LN. Cytosine-cytosine+ base pairing stabilizes DNA quadruplexes and cytosine methylation greatly enhances the effect. *Biochemistry*. 1993 Jun 8;32(22):5870-80.

Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, *et al*. Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer research*. 1999 Feb 1;59(3):639-44.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics*. 1999 Feb;21(2):163-7.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 Jul;13(7):484-92.

Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH. The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer research*. 2003 Jun 15;63(12):3247-56.

Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, *et al*. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1135-46.

Majewski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Research*. 2002 Dec;12(12):1827-36.

Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yuza Y, Yanagisawa T, Yamada O, Yamada H. Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 in K562 leukemic cells. *Cancer letters*. 2008 Mar 18;261(2):226-34.

Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Apr 25;278(17):14985-95.

Molognoni F, Cruz AT, Meliso FM, Morais AS, Souza CF, Xander P, *et al*. Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. *Epigenetics*. 2011 Apr;6(4):450-64.

Neidle S, Balasubramanian S. *Quadruplex Nucleic Acids*: Cambridge, UK: RSC Biomolecular Sciences 2006.

Rha SY, Izbicka E, Lawrence R, Davidson K, Sun D, Moyer MP, *et al*. Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar;6(3):987-93.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):461-7.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*. 2011 Mar;17(3):330-9.

Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH protocols*. 2006;2006(1).

Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Sep 3;99(18):11593-8.

Tsumagari K, Qi L, Jackson K, Shao C, Lacey M, Sowden J, *et al*. Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers. *Nucleic acids research*. 2008 Apr;36(7):2196-207.

Weisman-Shomer P, Cohen E, Hershco I, Khateb S, Wolfowitz-Barchad O, Hurley LH, *et al.* The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)<sub>n</sub>. *Nucleic acids research*. 2003 Jul 15;31(14):3963-70.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews*. 2006 Jan;5(1):37-50.

You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*. 2012 Jul 10;22(1):9-20.

Zhuang XY, Yao YG. Mitochondrial dysfunction and nuclear-mitochondrial shuttling of TERT are involved in cell proliferation arrest induced by G-quadruplex ligands. *FEBS letters*. 2013 Jun 5;587(11):1656-62.

## CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DO EFEITO DO ESTABILIZADOR DE G-QUADRUPLEX 360A NO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA.

### 4.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve o aumento da busca por novos alvos terapêuticos de novas drogas contra vários tipos de doenças, incluindo o câncer. Um desses possíveis alvos pode estar associado à formação de estruturas secundárias de DNA denominadas G-quadruplex. Os G-quadruplexes podem ser definidos como sequências de ácidos nucleicos (DNA) ricas em guanina, capazes de formar tétrades ligadas por pontes de hidrogênio do tipo Hoogsteen e fortemente estabilizadas na presença de um cátion monovalente (potássio, sódio ou lítio) (Burge *et al.*, 2006). Um composto bastante testado na literatura como alvo terapêutico é a piridina 360A. As drogas derivadas de piridina são conhecidas por ter alta afinidade por estruturas secundárias de DNA G-quadruplex presentes na região dos telômeros e, deste modo, são capazes de inibir eficazmente a telomerase, causando apoptose em células tumorais (Pennarum *et al.*, 2005 e 2008). Além disso, foi demonstrado que a estabilização do G-quadruplex pela piridina 360A no íntron do gene TP53 leva ao *splicing* alternativo e produção de diferentes isoformas de RNA mensageiro da p53, proteína supressora de tumor que controla a resposta anti-proliferativa a vários tipos de estresse dentro de uma célula (Marcel *et al.*, 2011). Assim, os G-quadruplexes podem ser considerados potenciais alvos moleculares capazes de interferir seletivamente na expressão/inibição de oncogenes. A piridina 360A é um ligante de G-quadruplex que age além da inibição da telomerase. Estudo mostrou que este composto é capaz de bloquear a proliferação celular e induzir a apoptose de células tumorais com ALT-positivo (alongamento alternativo do telômero) (Pennarum *et al.*, 2005).

Existem evidências correlacionando sequências com potencial para formar de G-quadruplex e o padrão de metilação do DNA em todo o genoma. Como definição, a metilação do DNA é uma mudança epigenética capaz de regular a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e

diferenciação celular em seres eucariontes (Jones *et al.*, 1999), podendo ser caracterizada como uma modificação bioquímica que frequentemente ocorre na posição 5' (C5) de citosinas presentes nos dinucleotídeos CpG em células (Robertson & Jones, 2000; Jaenish *et al.*, 2003; Yoo & Jones, 2006). Por sua vez, epigenética é o estudo de mudanças herdáveis na expressão dos genes, pelos processos de mitose e meiose, sem que ocorra alteração na sequência de DNA (Yoo & Jones, 2006; Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011).

Em relação aos trabalhos relacionando G-quadruplex com metilação de DNA, um dos estudos demonstrou a co-localização de regiões ricas em repetições de GGG e CpG no genoma humano (Majewski *et al.*, 2002). Em outro trabalho foi mostrado que a metilação de citosinas na base vizinha ao GGG estabiliza o complexo G-quadruplex (Hardin *et al.*, 1993). Halder *et al.* (2010) apresentaram através de análises de bioinformática que CpGs presentes em sequências de DNA com potencial para formação de G-quadruplex possuem baixo padrão de metilação, enquanto CpGs fora dessas regiões estão relativamente hipermetilados. A maioria dos trabalhos sugeriu que a formação de G-quadruplex pode interferir na metilação do DNA.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo verificar se a estabilização de G-quadruplex pela droga 360A pode influenciar o padrão de metilação. Para este intuito foi realizado um ensaio "*in vitro*" simulando metilação em G-quadruplexes estabilizados com a droga 360A. Além disso, outro experimento analisou o perfil de metilação global do DNA de linhagens de células de queratinócitos normais (HaCaT) e tumorais (KB) após o tratamento com a droga 360A.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Análise da Influência dos G-quadruplex no padrão de metilação in vitro.***

Esta análise teve como objetivo verificar se a formação de G-quadruplex no DNA dupla fita poderia influenciar no padrão de metilação de citosinas através do uso de oligonucleotídeos anelados.

Os oligonucleotídeos escolhidos foram:

<b>Controle para G-quadruplex (sem repetição de Gs) – Mut_G4:</b>	
Forward (Mut_G4_For)	5' – ACGCTGTCAGAGCCGCAGCGAGCGG –3'
Reverse (Mut_G4_Rev)	5' – CCGCTCGCTGCGGCTCTGACAGCGT –3'
<b>Sequência contendo G-quadruplex e sítio para metilação – G4_CpG:</b>	
Forward (G4_CpG_For)	5' – CGGGCGGGCGGGCGGGCGGG –3'
Reverse (G4_CpG_Rev)	5' – CCCGCCCGCCCGCCCGCCCG –3'

Os oligonucleotídeos foram anelados seguindo o protocolo para anelamento da Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/annealing-oligos.html>). Brevemente, os óligos foram ressuspensos em um tampão de anelamento (10 mM Tris, pH 7.5–8.0, 50 mM LiCl, 1 mM EDTA) e misturados em um tubo na mesma concentração. Em seguida, foram aquecidos a 95°C por 2 minutos e resfriados a 25°C por 45 minutos. As amostras foram armazenadas a 4°C.

Para cada oligonucleotídeo anelado foram realizadas três reações em triplicata: (1) Controle sem a droga 360A, sem DMSO (veículo da droga) e sem cloreto de potássio (KCl); (2) Controle sem a droga 360A, com DMSO e com KCl; (3) Tratada com a droga 360A e com KCl. Todas as reações tinham volume final de 35 µL, contendo 5 µL de DNA anelado (equivalente a 3 µg/µL) e água qsp. A solução de cloreto de potássio (KCl) a 10 mM foi adicionada às reações (2) e (3). Na amostra tratada (3) usou estabilizador de G-quadruplex 360A com concentração de 43 µM. Já nas amostras controle, em (1) incluiu água no volume da droga e em (2) foi utilizado DMSO no mesmo volume da droga. As amostras foram desnaturadas por aquecimento a 95°C por 5 minutos, em seguida por 60°C (Mut\_G4) / 65°C (G4\_CpG) por 2 horas e renaturadas a 37°C por mais 2 horas.

Este passo foi feito com o intuito de mimetizar a formação transitória do G-quadruplex durante a replicação do DNA.

Os produtos da desnaturação/renaturação do DNA (controles e tratado) foram metilados pela enzima *CpG metiltransferase (M.SssI)* (*New England BioLabs*) por 16 horas a 37°C e, em seguida, submetidas à digestão pela enzima *Acil* por 4 h a 37°C. A *Acil* é uma nuclease sensível à metilação capaz de clivar a base C quando esta não estiver metilada na sequência palindrômica “GCGG”. Em todas as reações foram feitas amostras controle sem as enzimas.

Os produtos da digestão pela enzima *Acil* foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 20%. As bandas foram evidenciadas por corante específico para fita dupla de DNA, *SYbr Green (Invitrogen)*, sob luz ultravioleta. A eficiência da metilação foi calculada pela proporção entre bandas não digeridas (metiladas) e bandas digeridas (não metiladas) medida pelo software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) versão 1.42q.

A droga estabilizadora de G-quadruplex 360A foi doada pelo grupo de pesquisadores Dra. Marie-Paule Teulade-Fichou, Dra. Corinne Guetta e Dr. Florian Hamon do Chemistry Laboratory UMR 176, Institut Curie, França (<http://umr176.curie.fr/MPTF>).

### ***Estudo do padrão de metilação global do DNA após tratamento com droga estabilizadora de G-quadruplex em cultura de células de queratinócitos normais e tumorais.***

Para este intuito, utilizamos linhagens de células de queratinócitos humanos normais (HaCaT) e tumorais (KB – queratinócito de carcinoma oral) tratadas com a droga 360A, composto estabilizador específico para G-quadruplex.

As linhagens de células HaCaT e KB cresceram em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (*Gibco BRL, Grand Island, NY*) e 1% de solução antibiótica (*Anti/Anti – Invitrogen*). As células foram incubadas em temperatura de 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram executados em triplicatas.

As linhagens de células HaCaT e KB foram gentilmente cedidas pela profª Drª Carmen Veríssima Ferreira (Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal, Instituto de Biologia, UNICAMP).

#### Ensaio de viabilidade celular.

As células HaCaT e KB, com passagens 4 e 5 respectivamente, foram tratadas por 24, 48, 72 e 96 horas com as concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$  de 360A. Como controle foram utilizadas as mesmas doses com 0,1% de DMSO.

A quantidade de células viáveis foi realizada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) a formazan pela atividade de desidrogenases mitocondriais. Assim, a redução do MTT a formazan foi diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços; 5 poços foram utilizados por tratamento. Após o tempo do tratamento, 100  $\mu\text{l}$  de MTT foram adicionados em cada poço. Depois de 2 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto em cada poço. Os poços foram lidos por um leitor de ELISA com absorvância de 570 nm.

#### Ensaio com estabilizador de G-quadruplex.

As células cultivadas HaCaT e KB, com passagens 7 e 8 respectivamente, foram classificadas em dois grupos conforme o tratamento:

(1) *Controle*: as células sem tratamento foram mantidas em cultura por 48 e 72 horas;

(2) *Tratado*: por 48 e 72 horas, as células foram tratadas com 360A a 10  $\mu\text{M}$ . O ensaio foi realizado com exposição mínima de luz, por se tratar de uma droga fotossensível.



Análise de conteúdo global de 5-metilcitosina usando citometria de fluxo nas células tratadas e não tratadas com estabilizadores de G-quadruplex.

A metilação global do DNA foi analisada pela coloração das células utilizando um anticorpo monoclonal específico contra a 5-metilcitosina (5-MeC; *Oncogene, La Jolla, CA, catálogo #NA81*), descrito por Milutinovic *et al.* (2003). As células HaCaT e KB foram lavadas em PBS complementado com 0.1% de Tween 20 e 1% de albumina de soro bovino (PBS-TB), fixadas com 0.25% de paraformaldeído a 37°C por 10 minutos, seguido por 88% de metanol a -20°C por no mínimo 30 minutos. Após a lavagem, as células foram tratadas com HCl 2 N a 37°C por 30 minutos, neutralizadas com borato de sódio 0.1 M (pH 9.0), e bloqueadas com 10% de soro de camundongo por 20 minutos a 37°C. Então, as células foram incubadas com o anticorpo anti-5-MeC em uma concentração final de 1 mg/mL por 45 minutos a 37°C, seguida pela incubação com o anticorpo de cabra anti IgG do camundongo conjugada com fluoresceína (*Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. - KPL, Gaithersburg, MD*) por 30 minutos por 37°C. Finalmente, o conteúdo de metilcitosina nas células tratadas e não tratadas com estabilizadores de G-quadruplex foi analisado por citometria de fluxo (Campos *et al.*, 2007).

**Análise Estatística**

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística pelo software Bioestat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/>) através do teste paramétrico “Teste T de Student” para amostras relacionadas, ao nível de significância de 5%.

**4.3. RESULTADOS**

Estabilização de G-quadruplexes pela 360A pode inibir a metilação de oligonucleotídeos in vitro.

Como já demonstrado em trabalhos na literatura, regiões de todo o genoma humano contendo sequências com potencial para formar G-quadruplex aparecem hipometiladas quando comparadas com o restante (De & Michor, 2011;

Halder *et al.*, 2010; Baral *et al.*, 2013). Um resultado semelhante foi observado no nosso ensaio de metilação *in vitro* de oligonucleotídeos que continham sequências possíveis de formar G-quadruplex e CpG, tratados com a droga estabilizadora 360A. Mesmo depois de serem metiladas pela metiltransferase *M.SssI*, as amostras tratadas com 360A foram quase totalmente clivadas pela enzima de restrição *Acil*, que corta a sequência “GCGG” quando a citosina não está metilada. Desta maneira, houve uma possível estabilização de G-quadruplex na presença da droga 360A capaz de impedir, em partes, a metilação desse DNA fita dupla (Figura 27B e 72D). Já as amostras contendo G-quadruplex com CpG sem tratamento com a droga (Figuras 27A e 27C) mostraram um comportamento diferente, semelhante ao das amostras controle sem G-quadruplex (Figura 26), em que a enzima *Acil* não digeriu o DNA metilado.

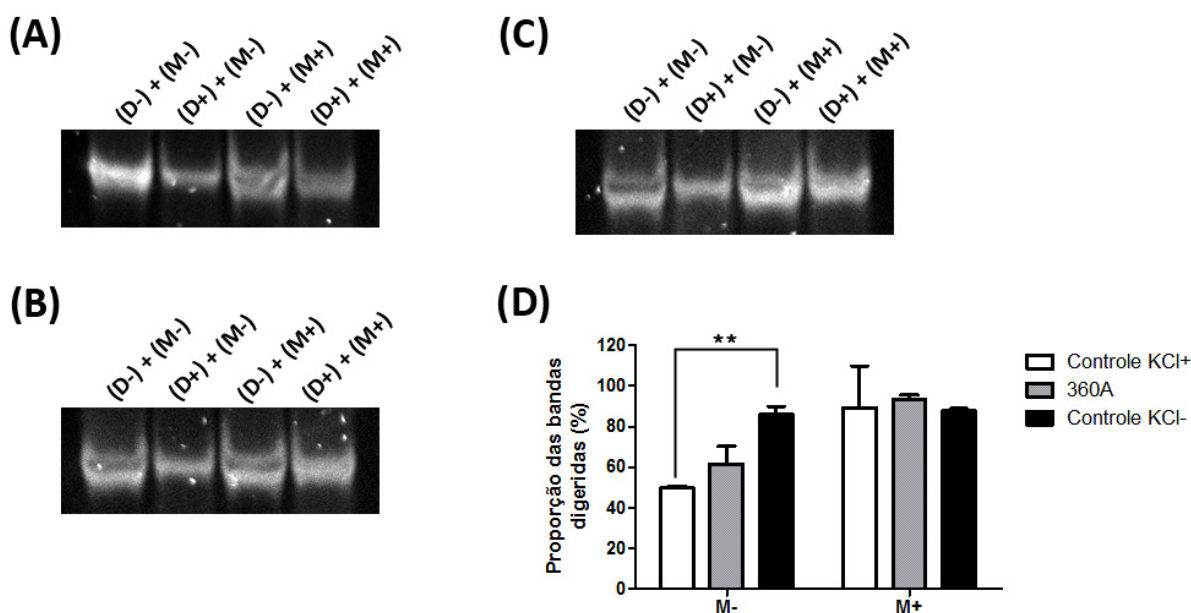


Figura 26 – Ensaio de metilação *in vitro* com oligonucleotídeos sem G-quadruplex (Mut\_G4). Imagens de géis de eletroforese contendo: (A) Amostras Controle contendo KCl a 10 mM e sem 360A; (B) Amostras contendo 360A; (C) Amostras Controle sem KCl e 360A. (D) Gráfico contendo médias  $\pm$  desvio padrão das proporções das bandas digeridas quantificadas dos géis de eletroforese pelo software *ImageJ*. **Legenda:** (D-) = Amostra não digerida pela enzima *Acil*; (M-) = Amostra não metilada pela enzima *M.SssI*; (D+) = Amostra digerida pela enzima *Acil*; (M+) = Amostra metilada pela enzima *M.SssI*; (\*\*)  $p < 0,01$ .

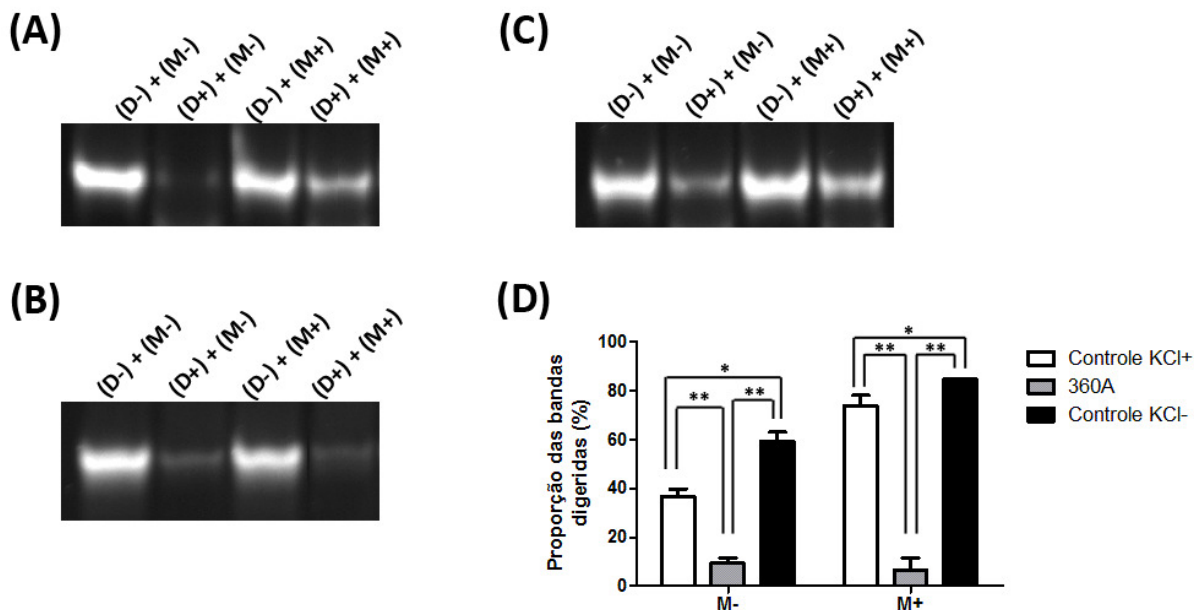


Figura 27 – Ensaio de metilação *in vitro* com oligonucleotídeos contendo G-quadruplex e CpG (G4\_CpG). Imagens de géis de eletroforese contendo: (A) Amostras Controle contendo KCl a 10 mM e sem 360A; (B) Amostras contendo 360A; (C) Amostras Controle sem KCl e 360A. (D) Gráfico contendo médias  $\pm$  desvio padrão das proporções das bandas digeridas quantificadas dos géis de eletroforese pelo software *ImageJ*. **Legenda:** (D-) = Amostra não digerida pela enzima *AciI*; (M-) = Amostra não metilada pela enzima *M.SssI*; (D+) = Amostra digerida pela enzima *AciI*; (M+) = Amostra metilada pela enzima *M.SssI*; (\*) =  $p < 0,05$ ; (\*\*) =  $p < 0,01$ .

### Redução da viabilidade celular induzida pela droga 360A na linhagem de células de queratinócitos tumorais.

Houve relatos na literatura sobre os efeitos pró-apoptóticos de estabilizadores de G-quadruplex em diferentes culturas de células (Pennarun *et al.*, 2005). Para avaliar a viabilidade das células após tratamento com droga estabilizadora de G-quadruplex em queratinócitos normais humanos (HaCaT) e em queratinócitos de carcinoma oral (KB) foi utilizado o método de redução do MTT. As células foram submetidas ao tratamento com 360A em diferentes concentrações (0, 5, 10, 15 e 20  $\mu$ M) em tempos diferentes (24, 48, 72 e 96 horas). Foi observado que a droga pareceu não afetar as células normais (figura 28), porém reduziu a viabilidade nas células tumorais (KB) em 72 e 96 horas, de

maneira dose-dependente em resposta ao aumento das concentrações da droga (figuras 28C e 28D). Além disso, a viabilidade de 50% (valor do IC<sub>50</sub>) foi obtida com as concentrações da droga a 20 µM (72 h) e 5 µM (96 h) (figuras 28C e 28D).

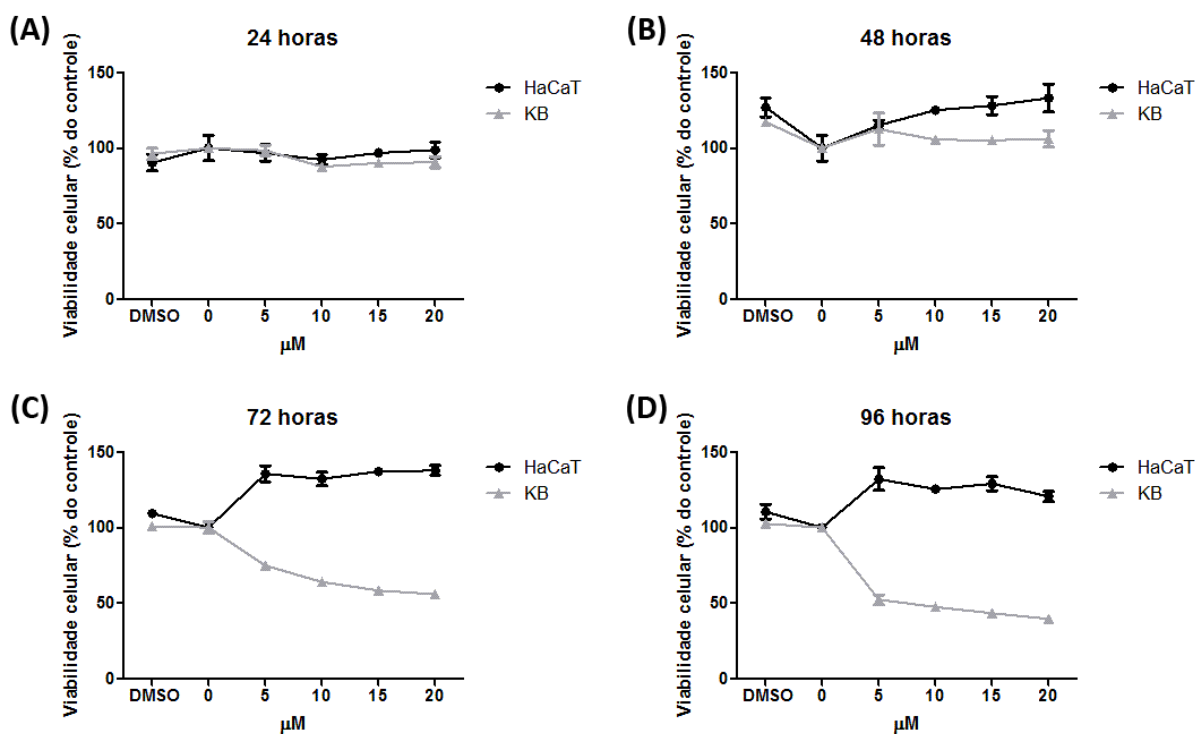


Figura 28 – Gráficos referentes ao ensaio de viabilidade celular usando a técnica de redução do MTT. O ensaio foi realizado em células HaCaT (queratinócitos normais) e KB (queratinócitos tumorais) tratadas com diferentes concentrações do estabilizador de quadruplex 360A (0, 5, 10, 15 e 20 µM) e 0,1% de DMSO por 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 horas (D).

### Hipermetilação global dos queratinócitos tumorais após tratamento com 360A por 48 horas.

Para quantificar o conteúdo de metilação global em células HaCaT e KB tratadas com 360A a 10 µM por 48 e 72 horas, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com as células marcadas com anticorpo monoclonal específico contra a 5-metilcitosina.

A ação da droga estabilizadora de G-quadruplex (360A) foi avaliada pela medida de intensidade de fluorescência inferida pela quantidade de células

com citosina metilada. Os dados obtidos da citometria de fluxo (figura 29) mostraram que não houve efeito da 360A sobre os queratinócitos normais (HaCaT) após 48 horas de tratamento (figura 29A), mas apresentou hipermetilação significativa ( $p < 0,05$ ) destas células em 72 horas (figura 29B). Já na linhagem de queratinócitos tumorais (KB) foi observado um efeito contrário: uma tendência significativa ( $p < 0,05$ ) de apresentar maior quantidade de células metiladas após o tratamento por 48 horas (figura 29A) e pareceu não afetar estas células depois de 72 horas (figura 29B).

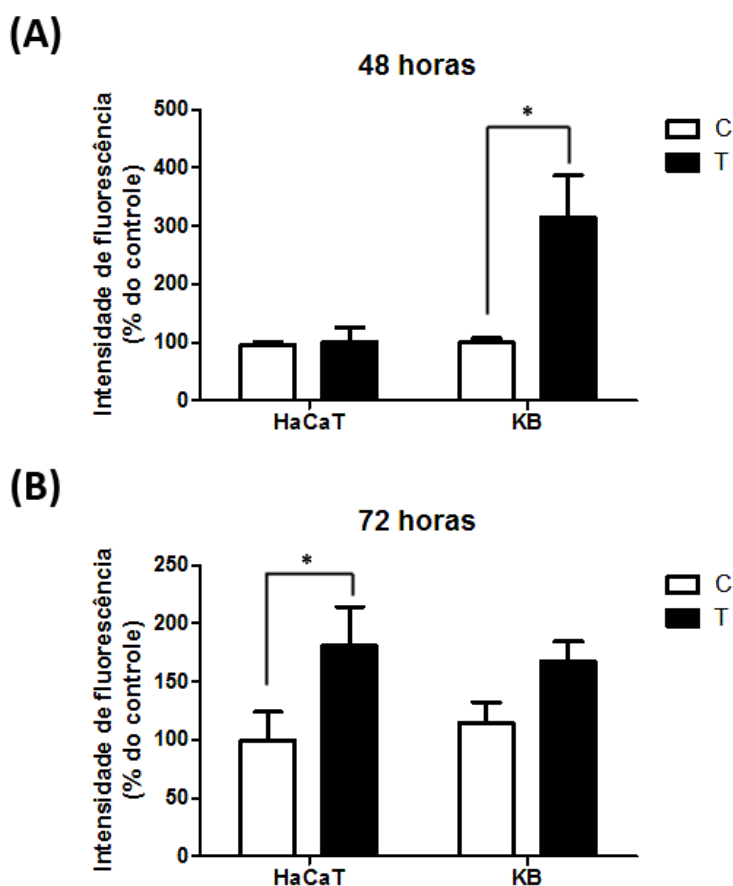


Figura 29 – Perfil de metilação global após tratamento com 360A a 10  $\mu$ M por 48 (A) e 72 horas (B) em queratinócitos normais (HaCaT) e tumorais (KB) . Gráficos contêm médias  $\pm$  desvio padrão dos resultados analisados por citometria de fluxo.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Uma das abordagens atuais para tratamento de câncer enfoca em diferentes aspectos epigenéticos, tendo como objetivo encontrar alvos terapêuticos contra células tumorais sem afetar células saudáveis. Neste contexto, a estabilização de G-quadruplex pode ser considerada como candidata a ser um desses alvos. Vários compostos foram estudados na literatura com esse enfoque. Ligantes de G-quadruplex podem ser moléculas de diversas classes como as porfirinas (*TMPyP4*), perilenos (*PIPER*), antraquinonas (1,4-bis-piperidino amido anthraquinone), carbocianinas (*DODC*, *BRACO19*), telomestatinas e piridodicarboxiamidas (PDC 360A e 307A), sendo que todos são capazes de interagir e estabilizar estruturas de G-quadruplex (Rangan *et al.*, 2001; Monchaud & Teulade-Fichou, 2008). Dentre esses ligantes, a PDC 360A foi considerada uma droga altamente seletiva para G-quadruplex, pois é capaz de induzir uma inibição eficiente da telomerase (Monchaud & Teulade-Fichou, 2008). Ao mesmo tempo, a 360A também atua contra o mecanismo de alongamento alternativo dos telômeros (ALT), podendo inibir a proliferação celular e levar à apoptose de células tumorais positivas para telomerase e positivas para ALT (Pennarun *et al.*, 2005 e 2008).

Sabendo da alta especificidade da 360A sobre G-quadruplex, testamos esta droga em oligonucleotídeos contendo sequência com CpG e G-quadruplex “*in vitro*”. O intuito deste ensaio foi verificar se é possível metilar uma estrutura de G-quadruplex já estabilizada. Foi notado que a estabilização das estruturas G-quadruplex pela 360A pode inibir parcialmente a metilação do CpG. Este resultado corrobora com outros estudos que relataram a existência de hipometilação de regiões contendo G-quadruplex presentes no genoma humano (Halder *et al.*, 2010; De & Michor, 2011; Baral *et al.*, 2013).

Depois da obtenção do resultado do ensaio “*in vitro*”, foram realizados os tratamentos das linhagens de queratinócitos normais (HaCaT) e tumorais (KB, carcinoma oral humano) com 360A e foi determinado o padrão de metilação após o tratamento.

Primeiramente foi analisado se o composto causaria citotoxicidade nas células normais e tumorais. Como resultado, foi verificado que a 360A foi citotóxica somente para células KB de maneira tempo-dose-dependente, isto é, deixando progressivamente menos células viáveis após 72 e 96 horas do tratamento. As células HaCaT não foram afetadas neste contexto.

No que diz respeito ao ensaio de metilação e tratamento com 360A, foi observada uma hipermetilação das células KB tratadas quando comparadas com células sem tratamento, após 48 horas. No entanto, em 72 horas, não foi notada alteração no padrão de metilação entre as células KB controle e tratadas. Já nas células HaCaT, houve aumento no grau de metilação das células tratadas somente após 72 horas do tratamento.

A redução da viabilidade das células tumorais e a hipermetilação global do DNA após 48 horas de tratamento podem ser explicadas pelo fato da droga 360A atuar inibindo o mecanismo de alongamento alternativo do telômero (*ALT*), que pode bloquear a proliferação dessas células, levando-as a apoptose (Pennarun *et al.*, 2005 e 2008). Além disso, outro estudo relatou que a hipometilação do genoma é mais prevalente em tumores associados com a manutenção de *ALT* do que pela ativação da telomerase, dois mecanismos diferentes em que células de câncer adquirem imortalidade pela estabilização do telômero (De Smet & Loriot, 2013). Outra possível explicação pode estar associada ao fato da droga 360A inibir a ação da telomerase. A célula tumoral, quando submetida a hipermetilação global do DNA e hipometilação de regiões de G-quadruplex (presentes no telômero), está suscetível a modificações estruturais cromossômicas como cruzamento de forquilha de replicação, deleções no DNA causadas pela estabilização do G-quadruplex e redução da atividade da enzima telomerase (De & Michor, 2011). Pennarun *et al.* (2008) comprovaram através do método de hibridização "*in situ*" a presença de aberrações no telômero induzidas pelo ligante de G-quadruplex (como fusões das cromátides-irmãs e possível deleção do telômero), indicando que a 360A induz instabilidade telomérica capaz de causar morte celular massiva de linhagens de células tumorais imortalizadas.

Em relação aos resultados obtidos com o uso de células não-tumorais, houve hipermetilação global do DNA após 72 horas do tratamento com 360A e a droga não causou citotoxicidade nas células, mesmo após 96 horas de tratamento. Pennarun *et al.* (2005) observaram que não houve efeito da droga após sete dias de tratamento em cultura primária de astrócitos, sugerindo que existe um efeito diferencial em células normais quando comparada com as tumorais. Em células normais, a manutenção do telômero pela atividade da telomerase impede a senescência replicativa, sendo que atividade da telomerase nessas células reduz com o envelhecimento, levando ao encurtamento do telômero (Granotier & Boussin, 2011). Uma possível hipótese é que a célula normal, ainda que submetida à hipermetilação global, possui áreas de “hotspot” teloméricos protegidas da ação da 360A devido a mecanismos de proteção telomérica como looping, capa, entre outros (De & Michor, 2011), ainda que já tenha sido comprovado a ação da 360A nas extremidades dos telômeros por Granotier *et al.* (2005). Além disso, o genoma de células normais são hipermetilados devido à cromatina estar fechada, sendo um estado geralmente desfavorável à formação de G-quadruplex (De & Michor, 2011). Portanto, a 360A como estabilizador específico para G-quadruplexes é capaz de modular o perfil de metilação de células tumorais após seu tratamento.

#### **4.5. CONCLUSÃO**

Após análise dos resultados e discussão dos mesmos, podemos sugerir que a 360A, por estabilizar G-quadruplexes, é capaz de influenciar o padrão de metilação, tanto “*in vitro*” como em tratamento de linhagens de células normais e tumorais. Entretanto, há necessidade de estudos específicos de metilação relacionados às estruturas de G-quadruplex, como a expressão das enzimas *DNA metiltransferases DNMT1, DNMT3A e DNMT3B* de células normais e tumorais após tratamento com 360A, ou a análise de genes específicos como *K-ras* (que contém sítios de metilação e G-quadruplex na sua sequência), além de outros ensaios.



#### 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baral A, Kumar P, Pathak R, Chowdhury S. Emerging trends in G-quadruplex biology - role in epigenetic and evolutionary events. *Mol Biosyst.* 2013 Jul 4;9(7):1568-75.

Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research.* 2006;34(19):5402-15.

Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, *et al.* Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia (New York, NY).* 2007 Dec;9(12):1111-21.

De S, Michor F. DNA secondary structures and epigenetic determinants of cancer genome evolution. *Nature structural & molecular biology.* 2011 Aug;18(8):950-5.

De Smet C, Lorient A. DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer. *Advances in experimental medicine and biology.* 2013;754:149-66.

Granotier C, Boussin FD. Differential Effects of the G-Quadruplex Ligand 360A in Human Normal and Cancer Cells. In: Vengrova DS, ed. *DNA Repair and Human Health: InTech* 2011:559-96.

Granotier C, Pennarun G, Riou L, Hoffschir F, Gauthier LR, De Cian A, *et al.* Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic acids research.* 2005;33(13):4182-90.

Halder R, Halder K, Sharma P, Garg G, Sengupta S, Chowdhury S. Guanine quadruplex DNA structure restricts methylation of CpG dinucleotides genome-wide. *Mol Biosyst.* 2010 Dec;6(12):2439-47.

Hardin CC, Corregan M, Brown BA, 2nd, Frederick LN. Cytosine-cytosine+ base pairing stabilizes DNA quadruplexes and cytosine methylation greatly enhances the effect. *Biochemistry.* 1993 Jun 8;32(22):5870-80.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics*. 1999 Feb;21(2):163-7.

Majewski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Research*. 2002 Dec;12(12):1827-36.

Marcel V, Tran PLT, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L, Teulade-Fichou MP, *et al*. G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):271-8.

Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Apr 25;278(17):14985-95.

Monchaud D, Teulade-Fichou MP. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem*. 2008 Feb 21;6(4):627-36.

Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, *et al*. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene*. 2005 Apr 21;24(18):2917-28.

Pennarun G, Granotier C, Hoffschir F, Mandine E, Biard D, Gauthier LR, *et al*. Role of ATM in the telomere response to the G-quadruplex ligand 360A. *Nucleic acids research*. 2008 Mar;36(5):1741-54.

Rangan A, Fedoroff OY, L.H. H. Induction of duplex to G-quadruplex transition in the c-myc promoter region by a small molecule. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Feb 16;276(7):4640-6.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):461-7.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*. 2011 Mar;17(3):330-9.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews*. 2006 Jan;5(1):37-50.

## **CONCLUSÃO**

Baseando nos resultados mostrados nos capítulos anteriores, sugere-se que regiões contendo G-quadruplex podem interferir nos perfis de metilação do DNA genômico. Foi demonstrado que o G-quadruplex estabilizado por drogas como *TMPyP4* e *360A* pode também influenciar nos padrões de metilação global de linhagem de células normais e tumorais, podendo ser essa uma possível resposta à inibição da ação da telomerase.

Finalmente, o estudo de compostos naturais, como os extratos de própolis estudados nesta tese, merece mais atenção e ensaios, visto que podem interferir na estabilização dos G-quadruplexes.

## REFERÊNCIAS\*

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Dec 15;90(24):11995-9.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Feb;59(2):241-57.

Bates P, Mergny JL, Yang D. Quartets in G-major. *The First International Meeting on Quadruplex DNA*. *EMBO reports*. 2007 Nov;8(11):1003-10.

Bejugam M, Sewitz S, Shirude PS, Rodriguez R, Shahid R, Balasubramanian S. Trisubstituted isoalloxazines as a new class of G-quadruplex binding ligands: small molecule regulation of c-kit oncogene expression. *Journal of the American Chemical Society*. 2007 Oct 31;129(43):12926-7.

Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991 Apr 18;350(6319):569-73.

Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research*. 2006;34(19):5402-15.

Cogoi S, Quadrioglio F, Xodo LE. G-rich oligonucleotide inhibits the binding of a nuclear protein to the Ki-ras promoter and strongly reduces cell growth in human carcinoma pancreatic cells. *Biochemistry*. 2004 Mar 9;43(9):2512-23.

De Carvalho DD, Sharma S, You JS, Su SF, Taberlay PC, Kelly TK, *et al*. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer cell*. 2012 May 15;21(5):655-67.

Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic acids research*. 2006;34(14):3887-96.

Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH. NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry*. 1998 Sep 8;37(36):12367-74.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1962 Dec 15;48:2013-8.

Guedin A, Gros J, Alberti P, Mergny JL. How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. Nucleic acids research. 2010 Nov;38(21):7858-68.

Halder R, Halder K, Sharma P, Garg G, Sengupta S, Chowdhury S. Guanine quadruplex DNA structure restricts methylation of CpG dinucleotides genome-wide. Molecular bioSystems. 2010 Dec;6(12):2439-47.

Han FX, Wheelhouse RT, Hurley LH. Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with Quadruplex DNA. Structural Basis for the Differential Effects on Telomerase Inhibition. Journal of the American Chemical Society. 1999;121(15):3561-70.

Hardin CC, Corregan M, Brown BA, 2nd, Frederick LN. Cytosine-cytosine+ base pairing stabilizes DNA quadruplexes and cytosine methylation greatly enhances the effect. Biochemistry. 1993 Jun 8;32(22):5870-80.

Hazel P, Huppert J, Balasubramanian S, Neidle S. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. Journal of the American Chemical Society. 2004 Dec 22;126(50):16405-15.

Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. Nucleic acids research. 2005;33(9):2908-16.

Huppert JL, Bugaut A, Kumari S, Balasubramanian S. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. Nucleic acids research. 2008 Nov;36(19):6260-8.

Hurley LH, Wheelhouse RT, Sun D, Kerwin SM, Salazar M, Fedoroff OY, *et al.* G-quadruplexes as targets for drug design. Pharmacology & therapeutics. 2000 Mar;85(3):141-58.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature genetics. 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer research*. 1996 Jun 1;56(11):2463-7.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics*. 1999 Feb;21(2):163-7.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 Jul;13(7):484-92.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):253-66.

Maizels N. Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nature structural & molecular biology*. 2006 Dec;13(12):1055-9.

Majewski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome research*. 2002 Dec;12(12):1827-36.

Mergny JL, Helene C. G-quadruplex DNA: a target for drug design. *Nature medicine*. 1998 Dec;4(12):1366-7.

Monchaud D, Teulade-Fichou MP. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Organic & biomolecular chemistry*. 2008 Feb 21;6(4):627-36.

Neidle S, Balasubramanian S. *Quadruplex Nucleic Acids*: Cambridge, UK: RSC Biomolecular Sciences 2006.

Parkinson GN. Fundamentals of Quadruplex Structures. In: Neidle S, Balasubramanian S, eds. *Quadruplex Nucleic Acids*: RSC Biomolecular Sciences 2006:1-27.

Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, *et al*. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene*. 2005 Apr 21;24(18):2917-28.

Rachwal PA, Findlow IS, Werner JM, Brown T, Fox KR. Intramolecular DNA quadruplexes with different arrangements of short and long loops. *Nucleic acids research*. 2007;35(12):4214-22.

Rangan A, Fedoroff OY, Hurley LH. Induction of duplex to G-quadruplex transition in the c-myc promoter region by a small molecule. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Feb 16;276(7):4640-6.

Riou JF. G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2004 Sep;4(5):439-43.

Risitano A, Fox KR. The stability of intramolecular DNA quadruplexes with extended loops forming inter- and intra-loop duplexes. *Organic & biomolecular chemistry*. 2003 Jun 7;1(11):1852-5.

Risitano A, Fox KR. Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic acids research*. 2004;32(8):2598-606.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):461-7.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*. 2011 Mar;17(3):330-9.

Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Sep 3;99(18):11593-8.

Smirnov I, Shafer RH. Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability. *Biochemistry*. 2000 Feb 15;39(6):1462-8.

Sun D, Hurley LH. Biochemical techniques for the characterization of G-quadruplex structures: EMSA, DMS footprinting, and DNA polymerase stop assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ. 2010;608:65-79.

Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, *et al*. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *Journal of medicinal chemistry*. 1997 Jul 4;40(14):2113-6.

Tsumagari K, Qi L, Jackson K, Shao C, Lacey M, Sowden J, *et al*. Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers. *Nucleic acids research*. 2008 Apr;36(7):2196-207.



Wheelhouse RT, Sun D, Han H, Han FX, Hurley LH. Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120(13):3261-2.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews*. 2006 Jan;5(1):37-50.

## ANEXO

14/08/13

Gmail - Submission Confirmation



Luciana Souto Mofatto <luciana.mofatto@gmail.com>

---

### Submission Confirmation

1 mensagem

Toxicology in Vitro <tiv@elsevier.com>

14 de agosto de 2013 13:34

Para: luciana.mofatto@yahoo.com.br, luciana.mofatto@gmail.com

Toxicology in Vitro

Title: Porphyrin TMPyP4 treatment improves differential changes in global DNA methylation levels between normal and tumor murine melanocytes cell line

Authors: Luciana Souto Mofatto, M.D.; Miriam G Jasiulionis, Ph.D.; Daniela F Ierardi, Ph.D.; Rodrigo A Silva, Ph.D.; Danielle Portinho, M.D.; Ana Paula de Souza, Ph.D.; Sergio Roberto P Line, Ph.D.

Article Type: Research Paper

Dear Luciana,

Your submission entitled "Porphyrin TMPyP4 treatment improves differential changes in global DNA methylation levels between normal and tumor murine melanocytes cell line" has been received by Toxicology in Vitro.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tiv/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Toxicology in Vitro

\*\*\*\*\*  
For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)