



Universidade de Aveiro
2015

Departamento de Ciências Médicas

**Lurdes Sofia
Oliveira
Fernandes**

**Modulação da sensibilidade a drogas quimioterapêuticas
através de mecanismos epigenéticos**

**Modulation of the sensitivity to chemotherapeutic drugs
through epigenetic mechanisms**



**Lurdes Sofia
Oliveira
Fernandes**

**Modulação da sensibilidade a drogas quimioterapêuticas
através de mecanismos epigenéticos**

**Modulation of the sensitivity to chemotherapeutic drugs
through epigenetic mechanisms**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Pereira-Wilson, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho e sob a co-orientação da Professora Doutora Ana Gabriela Henriques, Professora Auxiliar Convidado, do Departamento de Ciências Médicas, da Universidade de Aveiro

Este trabalho contou com o apoio do
Departamento de Biologia, Escola de
Ciências da Universidade do Minho

"To accomplish great things, we must not only act, but also dream; not only plan, but also believe."

-- Anatole France

O júri

Presidente

Professora Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva

Prof. Auxiliar com Agregação, do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Alice Fernanda de Abreu Ramos

Bolseira de Pós-Doutoramento do CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Professora Doutora Cristina Pereira-Wilson

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho

Agradecimentos

Um obrigado especial, a todos aqueles que fizeram parte e contribuíram para a concretização desta grande etapa da minha vida. A todos eles o meu sincero e sentido agradecimento.

À Professora Cristina Pereira-Wilson, minha orientadora, a quem dirijo uma palavra de apreço e agradecimento pelo apoio e motivação.

À Carla, pela paciência, dedicação, ajuda e mão amiga em alturas de crise que se mostraram essenciais na concretização deste trabalho.

A todos as pessoas do LBA/LCCA pela forma como me acolheram, em especial à Rita, Catarina e Cátia, pela alegria, bom ambiente, partilha e amizade. A todos vocês um muito obrigada.

À Raquel e à Rita, por terem sido o meu grande apoio ao longo de todo este percurso.

Aos meus pais, o meu porto seguro, pelo apoio incondicional.

À restante família, pela constante motivação.

Palavras - Chaves - Cancro coloretal, epigenética, MLH1, 5-Aza, EGCG, SO, 5-FU, MMR, BER

Resumo O cancro colo-rectal (CRC) é um problema de saúde na sociedade Ocidental, sendo o terceiro tipo de cancro mais comum. O estudo de padrões genéticos não é o suficiente para definir a suscetibilidade humana para uma patologia em particular. O CRC pode resultar da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas. A epigenética é definida como um estudo de mudanças hereditárias na expressão dos genes, sem alterações na sequência de nucleótidos, sendo que o mecanismo epigenético mais explorado é a metilação de ADN em regiões promotoras. O fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP) caracteriza o CRC e, neste caso, ocorre o silenciamento de genes supressores tumorais por hipermetilação. A metilação anormal do promotor de *MLH1* ocorre em aproximadamente 80% dos casos de CRC esporádico. Ao contrário das mutações genéticas, o silenciamento epigenético pode ser reativado por moléculas que atuam como modificadores epigenéticos (por exemplo, 5-azacitidina - 5-Aza) através da inibição de ADN metiltransferase.

Neste estudo explorou-se uma nova aplicação do ensaio cometa - o CoMeth (desenvolvido pelo nosso grupo) - com o objetivo de avaliar os efeitos epigenéticos na expressão de *MLH1*. Para isso, foi utilizada uma linha celular com deficiências no sistema MMR, cujo *MLH1* está epigeneticamente silenciado pela hipermetilação do promotor e por conseguinte, não apresentará cometas em resposta ao MNU devido à falta de MMR funcional. Inicialmente confirmou-se que 5-Aza potencial efeitos citotóxicos induzidos pelo agente alquilante, MNU, visto apresentar um aumento percentual de ADN na cauda dos cometas, em células tratadas com 5-Aza + BG + MNU comparativamente ao tratamento com BG + MNU. Isto demonstrou que o composto 5-AZA foi capaz de reverter a hipermetilação de *hMLH1*, tornando o sistema MMR funcional, aumentando os níveis de lesões O⁶MeG convertidas em SBs, detetadas pelo ensaio CoMeth. Foi demonstrado também que o 5-Aza inibe a expressão do gene *DNMT1* levando ao restabelecimento de *hMLH1*, como verificado por qRT-PCR. Além disso, usando o ensaio CoMeth, foi possível observar que o tratamento com 5-Fluorouacil (5-FU) + 5-Aza, em termos clínicos poderá constituir uma nova estratégia terapêutica para reduzir a resistência tumoral ao agente quimioterapêutico 5-FU, visto que a reativação de *hMLH1* faz com que as células cancerígenas fiquem mais sensíveis a este fármaco quimioterapêutico.

Neste ensaio também foram testados alguns compostos naturais, verificando-se que (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) e *Salvia officianalis* (SO) induziram danos similares aos níveis do 5-Aza, sugerindo que esses compostos apresentam efeitos epigenéticos potenciais. Finalmente, verificou-se que o 5-Aza e SO não apresentam efeitos moduladores no sistema BER, dado que quando as células foram incubadas com 5-Aza/SO + BG + Mx + MNU, não se observou um aumento de danos no ADN.

Como conclusão, no presente trabalho foi descrita uma nova aplicação do CoMeth, nomeadamente como ensaio que pode ser utilizado para testar potenciais compostos epigenéticos, sintéticos ou naturais, que revertam a hipermetilação de genes de reparação de ADN e consequentemente, contribuir para a melhoria da eficácia de fármacos quimioterapêuticos.

Keywords Colorectal cancer, epigenetics, MLH1, 5-Aza, EGCG, SO, 5-FU, MMR, BER

Abstract

Colorectal cancer (CCR) is a health problem in Western society where it is the third most common cancer type. The study of the genetic patterns is not enough to define the human susceptibility to particular condition. CRC can arise from an accumulation of genetic and epigenetic alterations. Epigenetic is defined as the study of heritable changes in gene expression, without nucleotide sequence alterations and the epigenetic mechanism most explored is ADN methylation in promoter regions. The CpG island methylator phenotype (CIMP) characterized present in some case of CRC is by silencing of tumor suppressor genes. The aberrant promoter methylation of *MLH1* happen in approximately 80% of sporadic CRC. Contrarily to gene mutations, epigenetic silencing can be reactivated by molecules that act as epigenetic modifiers (for instance, 5-azacytidine - 5-Aza) through the inhibition ADN methyltransferase (DNMT) enzymes.

In this study, we explored a new application of the CoMeth assay, developed by our group, with the aim to assess epigenetic effects on MLH1 expression. For that, a MMR-deficient cell line (RKO) was using, which *hMLH1* is epigenetically silenced by promoter hypermethylation and consequently, will not present comets in response to MNU due to the lack of functional mismatch repair. Firstly, we confirmed that the 5-Aza potentiates the cytotoxic effects induced by the alkylating agent, MNU, since we found an increase of % ADN in tail in cells treated with 5-Aza + BG + MNU comparatively to BG + MNU treatment. This demonstrated that 5-Aza was able to revert the *hMLH1* hypermethylation leading to a functional MMR system increasing the levels of O⁶MeG lesions converted into SBs, detectable by CoMeth assay. We further showed that 5-Aza inhibits *DNMT1* gene expression leading to the re-expression of *hMLH1*, as verified by qRT-PCR. Also, through the CoMeth, we observed that the 5-Fluorouracil (5-FU) + 5-Aza treatment, in clinical terms, may be a new therapeutic strategy to reduce the tumor resistance to 5-FU chemotherapeutic drug since the *hMLH1* reactivation became the cancer cells more sensitive.

We also tested some natural compounds using this assay and found that (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and *Salvia officinalis* (SO) induced similar levels of ADN damage to 5-Aza, suggesting that these compounds could have potential epigenetics effects.

Finally, in preliminar experiments, we found that the 5-Aza and SO may not have modulating effects on the BER system because when cells were incubated with 5-Aza/SO + BG + Mx + MNU we did not observe an increase of ADN damage.

Altogether, our data describes a new application of the CoMeth which can be used to investigate the potential of synthetic or natural epigenetic modulators that reverse the hypermethylated status of ADN repair genes and consequently improve the efficacy of clinical chemotherapeutic drugs.

Índice

Lista de abreviações	III
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	VII
1. Introdução.....	1
1.1. Cancro.....	1
1.2. Cancro colo-rectal	2
1.2.1 Instabilidade genómica	4
1.3. Epigenética	6
1.3.1. Metilação do ADN	7
1.3.2. Epigenética e o cancro	7
1.3.3. Inibidores da metilação do ADN.....	9
1.4. Agentes quimioterapêuticos	12
1.4.1. Agentes alquilantes.....	12
1.4.2 5-Fluorouracil (5-FU).....	15
1.5. Mecanismos de reparação de ADN	17
1.5.1. Reversão direta dos danos de ADN pela enzima MGMT	18
1.5.2. Sistema de reparação de mismatch (MMR)	19
1.5.3. Sistema de Reparação por excisão de bases (BER)	22
1.5.4. Sistema de Reparação por excisão de um nucleótido (NER).....	24
1.5.5. Sistema Reparação das quebras duplas no ADN.....	26
1.6. O ensaio cometa no estudo de lesões no ADN e a capacidade de reparação do ADN. 28	
1.6.1 O ensaio cometa padrão	28
1.6.2 Variantes do ensaio Cometa	31
1.6.3 CoMeth assay	32
1.6.4 Quantificação dos Cometas.....	33
1.6.5 Vantagens do ensaio cometa	34
1.6.6 Limitações do ensaio cometa	35
1.6.7 Utilização do ensaio cometa na otimização da quimioterapia	35
2. Objetivos.....	37
3. Materiais e Métodos	41

3.1.	Reagentes e material vegetal.....	43
3.2.	Linhas celulares e condições de cultura.....	44
3.3	Avaliação da viabilidade / proliferação celular pelo ensaio de redução do MTT	45
3.4	Ensaio CoMeth	45
3.5.	Quantitativo em tempo real – reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR)	46
3.6.	Condensação nuclear	48
3.7.	Análise estatística.....	49
4.	Resultados.....	51
4.1.	Aplicação do ensaio CoMeth para avaliar efeitos epigenéticos e para determinar a eficácia do agente quimioterapêutico 5-FU.....	53
4.2.	O ensaio CoMeth para o “screening” epigenético.....	59
4.3.	Os efeitos do 5-Aza e do SO no sistema de reparação BER	60
5.	Discussão e Conclusão.....	65
6.	Perspetivas Futuras	77
7.	Referências.....	81
8.	Anexos	89
8.1.	Anexo 1.....	91
8.2.	Anexo 2.....	91
8.3.	Anexo 3	92

Lista de abreviações

5-Aza	5-azacitidina; Azacitidina; Vidaza™
5-F-CdR	5-fluoro-2'-deoxycytidine
5-FU	5-Fluorouracil
8-OxoG	8-oxo-7,8- dihydroguanine
AA	Ácido ascórbico
AML	leucemia mielogénica aguda
AP	apurínico / apirimidínico
APC	adenomatous <i>polposa cóli</i>
APE1	Endonuclease apurínico / apirimidínico 1
BCNU	Carmustine
BER	base excision repair system
BG	O ⁶ benzylG
CDKN2B	ciclina dependente de inibidor de cinase 2B
CH₃	Grupo metil
CIMP	Fenótipo metilados das ilhas CpG
CIN	Instabilidade cromossómica
CCR	Cancro colorectal
CSB	síndrome Cockayne grupo B
DAC	Decitabina
DDB	Proteína de ligação de ADN danificado
DHA	ácido dehidroascórbico
dHJ	double Holliday junction
D-loop	laço de deslocação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	ADN metiltransferases
dRP	5'-fosfato de desoxirribose
DSBs	Reparação de quebras duplas
dUMP	monofosfato de desoxiuridina

dUTP	trifosfato de desoxiuridina
EC	(-)-epicatequina
ECG	(-)-epicatequina -3-gallato
EGC	(-)-epigallocatequina
EGCG	(-)-epigallocatequina-3-galato
EndoII	Endonuclease III
ExoI	exonuclease I
FAP	Polipose adenomatosa familiar
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
FdUrd	5-fluoro-2'-desoxiuridina
FdUTP	fluorodeoxyuridine triphosphate
FPG	glicosilase formamidopirimidina ADN
FUDP	trifosfato fluorodine
GGR	reparação do genoma global
H2O2	Peróxido de hidrogénio
HAT	Histona acetilase
HDAC	Histona desacetilase
HNPCC	cancro colo-retal hereditário sem polipose
HR	Recombinação homóloga
H-ras	Harvey Ras sarcoma viral oncogene homolog
ICL	interstrand cross-link
JNK	cinase c-Jun N-terminal
KU	Ku70/80 heterodimero
LMP	low melting point
LOH	perda de heterozigidade
MAPK	ativada por mitogénio proteína quinase
MBDs	domínio de ligação de metil
MDS	síndrome de mielodisplasia

MGMT	O ⁶ -metilguanina-ADN metiltransferase
MLH1	MutL homólogo 1
MMR	mismatch repair
MMS	metanossulfonato de metilo
MNNG	N-metil-N ¹ -nitro-N-nitrosoguanidina
MNU	N-metil-N-nitrosourea
MPG	N-metilpurina-ADN-glicosilase
MSI	Instabilidade de microsatélite
MSI-H	instabilidade de microsatélite de alto nível
MSI-L	instabilidade de microsatélite de baixo nível
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Mx	Metoxiamina
MYH	mutY homólogo
N	Azoto
N¹-O⁶-ethanoG	N ¹ -O ⁶ -etanoguanina
NER	Reparação por excisão de nucleotídeo
NHEJ	non-homologous end-joining
NMP	normal melting point
O	Oxigénio
O6-ClethG	O ⁶ -cloroetilguanina
O6MeG	O ⁶ -metilguanina
OGG1	8-oxoG-ADNglicosilase
PARP	Poli-(ADP-ribose) polimerase
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PFA	Paraformaldeído
Pol	ADN polimerase
qRT-PCR	Quantificação em tempo real – reação em cadeia da polimerase
RFC	Fator de replicação C
RNAPII	ARN polimerase II

ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPA	Proteína de replicação A
SAM	S-adenosilmetionina
SCGE	Eletroforese em gel de célula única
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
SO	Salvia officinalis
SB	Quebra simples no ADN
ssADN	Cadeia simples do ADN
TCR	Reparação ligada pela transcrição
TMZ	Temozolomida
TS	timidilato sintase
UDG	uracilo-ADN-glicosilase
UV	ultravioleta
WiDr	linha celular de adenocarcinoma colo-rectal humano

Lista de tabelas

Tabela 1 – Sequencia dos primeres usados no qRT-PCR.....	48
--	----

Lista de figuras

Figura 1- Os “hallmarks” do cancro.....	2
Figura 2- Eventos moleculares que caracterizam a transição de epitélio de colón saudável para adenocarcinoma.....	4
Figura 3 – Metilação do ADN (A) Metilação da base citosina. (B) Diagrama ilustrativo dos efeitos da metilação no promotor das ilhas CpG e regiões promotoras de genes.....	8
Figura 4 - Estruturas de compostos com capacidade para inibir as ADN metiltransferases (DNMTs). (A) análogos nucleosídeos. (B) não análogos nucleosídeos..	10
Figura 5 – Modelador epigenético aprovado pela FDA. Mecanismo de ação 5-Azacitadina..	11
Figura 6 – Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil.....	16
Figura 7 – Passos gerais do ensaio cometa padrão.....	30
Figura 8 – Detecção de danos O ⁶ MeG induzidos no ADN detetados pelo ensaio CoMeth.....	33
Figura 9 – Efeitos do composto desmetilante, 5-Aza, avaliados em células RKO pelo ensaio CoMeth nos danos no ADN induzidos por MNU.....	54
Figura 10 - Efeitos do composto desmetilante, 5-Aza na apoptose induzida pelo MNU em células RKO.....	55
Figura 11 - Danos no ADN, medidos pelo ensaio CoMeth, com o tratamento com 5-FU e 5-Aza + 5-FU na linha celular RKO. .	56
Figura 12 -Morte celular induzida por apoptose, medida pelo ensaio de condensação nuclear, após tratamento com 5-FU e com a combinação 5-Aza + 5-FU.....	57
Figura 13 – Efeitos do 5-Aza ou SO na expressão do gene <i>DNMT1</i> determinados por qRT-PCR na linha celular cancerígena, RKO.....	58
Figura 14 – Efeitos do composto 5-Aza na expressão do <i>hMLH1</i> usando qRT-PCR após 72h.....	58
Figura 15 – “Screening” de compostos com possíveis efeitos desmetilantes usando o ensaio CoMeth.....	60
Figura 16 – Efeitos do 5-Aza no sistema BER monitorizados pelo ensaio CoMeth, na linha celular RKO.....	61
Figura 17 - Efeitos do SO no sistema de reparação BER monitorizados pelo ensaio CoMeth, na linha celular RKO..	62

Figura 18 - Avaliar os efeitos do 5-Aza no sistema BER através do ensaio CoMeth em células RKO 91

Figura 19 - Avaliar os efeitos do SO no sistema BER através do ensaio CoMeth em células RKO... 91

Figura 20 – Avaliar o efeito do MMR no sistema BER através do ensaio CoMeth nas células RKO. 92

1. Introdução

1.1. Cancro

A etiologia do cancro tem sido associada a determinados estilos de vida. Na sociedade ocidental, os principais fatores de desenvolvimento de cancro, nomeadamente do cancro colo-retal, relacionam-se com um alto índice de massa corporal, devido à predominância de uma dieta hipercalórica com elevado consumo de carnes vermelhas e processadas, baixa ingestão de frutas, legumes e cereais integrais, estilo de vida sedentário, consumo de álcool e de tabaco¹.

De acordo com a Organização Mundial De Saúde, o cancro é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, tendo sido registados cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em 2012. É expectável que o número de novos casos diagnosticados aumente para 70% no decorrer das próximas duas décadas. Em 2012, os cinco cancros mais frequentes no sexo masculino foram, o cancro do pulmão, próstata, colo-retal, estômago e do fígado. Enquanto que no sexo feminino foram, o cancro da mama, colo-retal, cérvix e do estômago (World Cancer Report 2014).

O cancro caracteriza-se pela divisão e crescimento descontrolado de células. As células cancerígenas apresentam uma taxa de proliferação mais alta do que as células normais e, muitas vezes, adquirem capacidade de resistir à morte celular programada (apoptose)². Além disso, estas células podem ajudar a adquirir a capacidade de separar-se do seu tecido original e desenvolver metástases em outras regiões do corpo. Estas características celulares anormais adquiridas durante o desenvolvimento do tumor são conhecidas como os “hallmarks” do cancro³. Existem dez “hallmarks” do cancro entre as quais se incluem a resistência à morte celular, instabilidade do genoma e mutações (

Figura 1).



Figura 1- Os "hallmarks" do cancro. Adaptados de³

O cancro desenvolve-se devido à acumulação de alterações genéticas e epigenéticas no ADN. Alguns eventos que podem contribuir para a origem do cancro são as mutações pontuais, deleções, duplicações, inserções, translocações, infeções virais e inativações epigenéticas. Estas alterações podem resultar na inativação de genes supressores tumorais e/ou na ativação de oncogenes². Atualmente, o cancro não é reconhecido como uma patologia de carácter exclusivamente genético, implicando também a ocorrência de alterações epigenéticas. De facto, tem sido evidente que as perturbações epigenéticas mediadas pelo microambiente tumoral desempenham um papel importante no desenvolvimento de neoplasias⁴.

1.2 Cancro colo-rectal

O cancro colo-retal (CCR) é um importante problema de saúde pública nos países ocidentais, onde é classificado como o terceiro tipo de cancro mais comum e o quarto com maior taxa de mortalidade. O CCR representa 12,9% de todos os cancros recentemente diagnosticados e é responsável por 12,2% de todas as mortes por cancro na Europa⁵. Em Portugal, a incidência de CCR tem aumentado nas últimas décadas, contudo o número de casos varia consoante a região geográfica. A mortalidade por CCR aumentou 3% por ano entre 2000 e 2005 e as taxas de sobrevivência total no 1º, 3º e 5º ano prevêm-se que tenham sido de 73%, 55% e 46%, respetivamente⁶. Em ambos os géneros (homens e mulheres), nos países da Europa do Leste como a República Checa e a Eslováquia, assim como na América do Norte, no Japão, na Nova

Zelândia, na Austrália e na Alemanha a incidência de CRC é elevada ao passo que em alguns países de África, da América Central e do Sul e da Ásia Central e do Sul a incidência é mais baixa⁷. Aproximadamente cerca de 55% dos casos de CCR ocorrem em regiões desenvolvidas⁵, no entanto nestas regiões a mortalidade é mais baixa (8.5%). Por outro lado, nos países menos desenvolvidos esta taxa de mortalidade é maior (52%), refletindo assim uma baixa sobrevivência nestas áreas. A Espanha e vários países da Europa Oriental e da Ásia do Leste, anteriormente considerados países de baixo risco, apresentam atualmente um risco elevado que poderá ser atribuído a alterações associadas aos hábitos individuais e sociais que fazem parte do estilo de vida ocidental⁸. Contudo, nos Estados Unidos da América (EUA) e noutros países altamente desenvolvidos, a incidência estabilizou ou começou a diminuir, provavelmente devido a melhores abordagens terapêuticas e de diagnóstico precoce como o aumento do uso da sigmoidostomia e colonoscopia com polipectomia⁹.

Em geral, o diagnóstico deste tipo de cancro é tardio, devido ao facto das alterações iniciais serem assintomáticas. Como consequência, a doença progride rapidamente levando à formação de metástases causadas pela alta taxa de transferência de células transformadas conduzidas pela circulação sanguínea até outros órgãos, como por ex. o fígado, o que causa falência geral dos órgãos conduzindo à morte¹⁰.

Féron e Vogelstein em 1990 propuseram um modelo de progressão do carcinoma, descrevendo os passos implicados na carcinogénese do CCR¹¹. O CCR pode dividir-se em três tipos que se diferenciam com base no perfil genético e no grau de suscetibilidade hereditária: a) forma esporádica, representando a maioria dos CCR (entre 60% a 80%)¹², é associada a indivíduos que não herdaram nenhuma mutação que aumente a sua suscetibilidade para desenvolver este tipo de cancro e onde os principais fatores de risco incluem o estilo de vida (por exemplo obesidade, falta de atividade física e a alimentação), fatores ambientais e a idade; b) o tipo familiar, constitui apenas 20-40% dos casos de CCR. Os fatores ambientais determinam quais os indivíduos que visão geneticamente a desenvolver este tipo do cancro. Existe uma maior probabilidade de desenvolver este tipo de cancro quando os membros da família de consanguinidade primária sofreram de um CRC esporádico; c) e o tipo hereditário de CCR, está associado a duas variantes que podem diferenciar-se pela presença ou ausência de pólipos adenomatosos. Neste caso podem ser distinguidos: 1) Polipose adenomatosa familiar (FAP), um exemplo de cancro colo-retal hereditário, causada por mutações na linha germinativa no gene supressor tumoral *APC*; 2) e o cancro colo-retal hereditário sem polipose (HNPCC). A síndrome de Lync é uma variante de HNPCC causada por mutações na linha germinativa nos genes do sistema reparação de mismatch

(MMR)¹⁰. A carcinogénese do CCR implica diferentes vias que transformam um precursor benigno (um pólip) num adenocarcinoma (Figura 2).

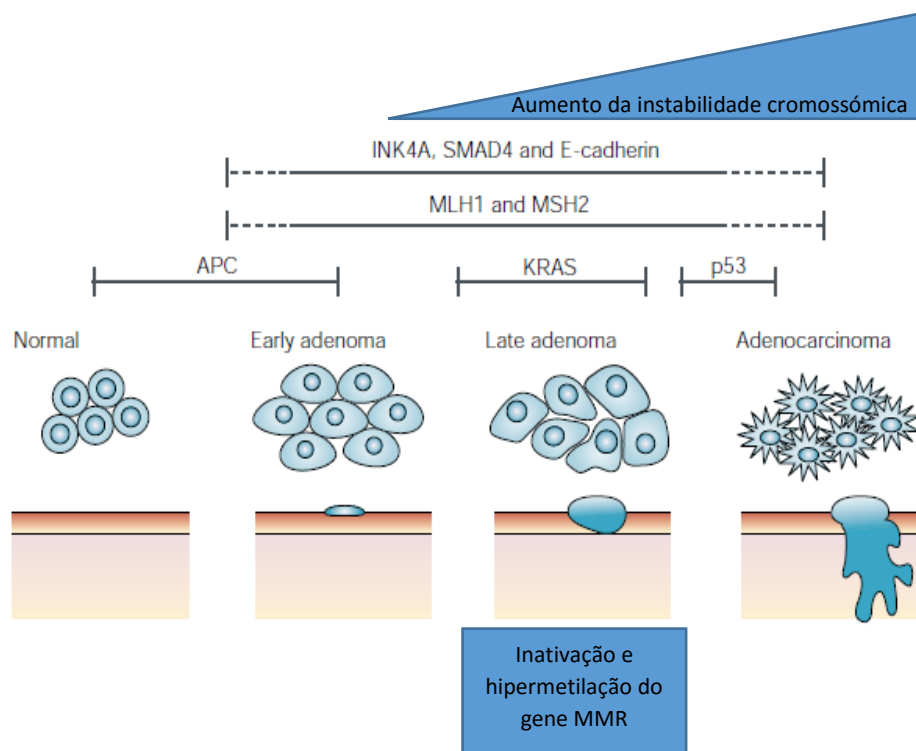


Figura 2- Eventos moleculares que caracterizam a transição de epitélio de colón saudável para adenocarcinoma. Adaptado de¹³

1.2.1 Instabilidade genómica

A instabilidade genómica é um processo crucial na aquisição de mutações que levam ao desenvolvimento de CCR, contribuindo para a ocorrência de múltiplas modificações genéticas nas células normais que assim adquirem um fenótipo maligno. A instabilidade genómica pode dividir-se em duas categorias: instabilidade cromossómica (CIN) e a instabilidade de microssatélites (MSI). A CIN é a acumulação de alterações cromossómicas estruturais e numéricas, tais como translocações cromossómicas e amplificações. A MSI ocorre quando há falhas no reconhecimento e na reparação de bases do ADN danificadas durante a replicação¹⁴.

A maioria dos CCR esporádicos (85%) surge devido a CIN, que se traduz no aumento da taxa de perda de algumas partes de cromossomas, ou mesmo da sua perda total, durante a divisão celular. A CIN pode contribuir para o aumento da taxa de perda de heterozigidade (LOH), que é considerada um mecanismo importante na inativação de genes supressores tumorais. Esta via também está associada a uma sequência de mutações em certos genes como no gene supressor tumoral *APC* (que ocorre na fase inicial do desenvolvimento CCR), no oncogene

“*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*” (*K-ras*) ou no gene supressor tumoral *p53* (que ocorre durante a última fase do desenvolvimento CCR)¹⁵.

Por outro lado, a MSI é também um processo que contribui para o desenvolvimento do CCR. Os microssatélites consistem em repetições de sequências de nucleótidos frequentemente encontradas na sequência do ADN. A MSI caracteriza-se por alterações na sequência de bases de microssatélites e ocorre devido a mutações ou silenciamento epigenético de genes no MMR (mismatch repair) que conduzem à perda da função deste sistema de reparação de ADN. A MSI é detetada em aproximadamente 15% de todos os CCR; dos quais 3% estão associados com o síndrome de Lynch e os outros 12% com o CCR esporádico, adquirindo hipermetilação do gene *MLH1*, que é um gene fulcral no sistema MMR¹⁶.

As proteínas hMLH1 e hPMS2 são os componentes essenciais do sistema de reparação de MMR formando cinco heterodímeros funcionais: hMSH2-hMSH3, hMSH2-hMSH6, hMLH1-hPMS1, hMLH1-hPMS2 e hMLH1-hMLH3. Em HNPCC, a instabilidade de microssatélites é frequentemente causada por mutações ou inativação epigenética de alguns genes do MMR tais como, hMSH2, hMLH1 e hMSH⁶. A MSI no CCR pode subdividir-se em dois fenótipos: instabilidade de microssatélite de alto nível (MSI-H) e instabilidade de microssatélite de baixo nível (MSI-L). O MSI-H ocorre quando há, pelo menos, duas modificações das cinco proteínas acima referidas. Em MSI-L, só uma das cinco proteínas está alterada. Os cancros associados ao HNPCC exibem muitas vezes sinais de várias deficiências genéticas no sistema de reparação MMR e são conseqüentemente do tipo MSI-H. No síndrome de Lynch os genes que estão mais frequentemente alterados são o *hMLH1* e o *hMSH2*, enquanto que no CCR esporádico, onde ocorre o MSI do tipo MSI-L, é a proteína *hMLH1* que se encontra mais vezes alterada¹⁷.

O fenótipo de metilação das ilhas CpG (CIMP) é uma importante via epigenética que também pode estar envolvida na carcinogénese do CCR. Geralmente no CCR ocorre hipometilação do genoma total e hipermetilação do promotor de determinados genes que leva ao silenciamento da sua expressão. Sabe-se que a metilação anormal de genes envolvidos na reparação de ADN como o *MGMT* ou *MLH1* (que são genes envolvidos na reparação de dano) pode levar à iniciação e progressão do cancro¹⁸. A metilação anormal do promotor de *MLH1* ocorre em aproximadamente 15% da MSI do CCR esporádico. Foi demonstrado em linhas celulares de CCR que a reparação da expressão e função do gene *MLH1* pode ocorrer por desmetilação do promotor *MLH1* na MSI, sugerindo que a metilação poderá ser uma das causas da carcinogénese no CCR. A metilação dos genes também poderá ser um marcador molecular de prognóstico ou de valor preditivo útil no cancro esporádico. De facto, existem alguns genes supressores tumorais

que estão silenciados através da metilação no CCR, incluindo os genes *CDKN2A/p16*, *MGMT*, *THBS1*, *TIMP3*, *CDKN2A (p14ARF)* e *MLH1*¹⁹.

1.3. Epigenética

O termo epigenética refere-se à mudança da expressão genética sem que haja alterações na sequência de ADN²⁰.

As modificações epigenéticas nos genes são geralmente reversíveis mas podem transmitir-se às células-filha afetando a conformação do ADN e a sua atividade transcricional. De facto, a transposição do código do ADN para o fenótipo é dependente de várias características, tais como, o padrão de metilação do ADN, modificações das histonas, RNAs não-codificantes e outros mecanismos de remodelação da cromatina que, em conjunto, controlam a forma como o ADN está empacotado na cromatina, tornando-o ou não acessível à transcrição²⁰.

Os mecanismos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento e diferenciação celular²¹. As perturbações nestes padrões de expressão epigenética contribuem para neoplasias específicas e diversos fenótipos²². A desregulação dos mecanismos epigenéticos tem sido associada a várias doenças tais como o cancro, sendo a metilação do ADN e a acetilação das histonas as modificações epigenéticas mais estudadas.

As modificações pós-translacionais alteram a afinidade entre as histonas e o ADN, afetando o nível de compactação da cromatina, e consequentemente a expressão genética. Estes processos são reversíveis e responsáveis pela ativação ou silenciamento da transcrição²⁰. As modificações das histonas incluem acetilação, metilação, sumoilação, ubiquitinação e fosforilação. A acetilação das histonas é atualmente a modificação melhor compreendida e controlada pelas histonas acetilases (HATs) e pelas histonas desacetilases (HDACs) que geralmente atuam como co-ativadores e co-repressores transcricionais, respetivamente²³. A acetilação pode ocorrer depois da produção das histonas, no citoplasma ou no núcleo para permitir a transcrição. As HATs catalisam a transferência de um grupo acetil e usam como dador o acetil do acetil-CoA. Deste modo, a cromatina adota uma forma mais relaxada (eucromatina) e por isso reduz o empacotamento do ADN permitindo o recrutamento dos fatores de transcrição para que a transcrição ocorra. Contrariamente, as HDACs invertem a acetilação dos resíduos lisina e a cromatina fica condensada (heterocromatina) impedindo a transcrição genética²³. A acetilação de histonas também pode permitir a transcrição fornecendo locais de ligação a proteínas que estão envolvida na ativação genética. Contudo, os baixos níveis de acetilação das histonas podem

induzir outra modificação epigenética como a metilação do ADN, levando ao silenciamento de genes. Para além disso, tem sido descrito que a desregulação da acetilação/desacetilação das histonas contribui para alguns tipos de cancro²⁰.

1.3.1. Metilação do ADN

A metilação do ADN ocorre pela ligação covalente de um grupo metilo (CH₃) a um carbono na posição 5 das citosinas que precedem uma guanina gerando assim 5-metilcitosinas que, em conjunto com a guanina, são designados dinucleotídeos CpG. As áreas do genoma com maior presença de CpGs designam-se ilhas CpGs e normalmente localizam-se na região do promotor de um gene. Aproximadamente 50% dos genes têm ilhas CpG no promotor. A metilação do ADN é catalisada pelas ADN metiltransferases (DNMTs) que usam o S-adenosilmetionina (SAM) como grupo dador de metilo²⁴.

Existem cinco DNMTs: DNMT1, 2, 3a, 3b e 3L. Todas estas DNMTs têm atividade enzimática exceto DNMT2 e DNMT3L, que não têm o domínio regulador amino-terminal e o domínio catalítico, respetivamente. A DNMT1 é responsável pela manutenção dos padrões de metilação existentes durante o processo da replicação do ADN e atua preferencialmente na semi-metilação dos dinucleótidos CpG (metilação do CpG apenas numa das cadeias de ADN) ao passo que as DNMT3a e 3b são responsáveis por catalisar a metilação *de novo*, atuando tanto em locais CpG semi-metilados como nos não-metilados²⁰.

A metilação do promotor, especialmente próxima da região de transcrição, induz o silenciamento do gene. Este processo é mediado pelo recrutamento de repressores de transcrição que levam à interrupção da transcrição e consequente expressão genética. Estes repressores incluem as proteínas com domínio de ligação de metil (MBDs), que fazem parte de um enorme complexo que inclui histonas deacetilases (HDACs). Por outro lado, a metilação do ADN também pode inibir a transcrição diretamente, bloqueando a ação dos fatores transcripcionais. Quando o promotor do gene não está metilado, os fatores de transcrição têm o acesso livre aos seus locais de ligação no ADN e por isso possibilitam a transcrição genética²².

1.3.2. Epigenética e o cancro

Durante a última década, a importância dos eventos epigenéticos tem surgido em todos os aspetos da biologia do cancro. Um dos fenómenos epigenéticos mais estudados é a metilação do

ADN. No cancro, alterações epigenéticas podem ocorrer devido à hipermetilação do promotor de genes supressores tumorais o que inibe a transcrição genética, ou através da hipometilação global do ADN o que leva à transcrição de oncogenes silenciados, podendo resultar na instabilidade cromossómica (CIN).

A hipermetilação do ADN é uma expressão que se refere ao aumento da metilação num local que originalmente não estava metilado, e normalmente está relacionada com o silenciamento de genes, isto é, genes com uma expressão reduzida. Por outro lado, a hipometilação do ADN representa a perda da metilação do ADN, que pode induzir instabilidade cromossómica com a ativação de genes normalmente suprimidos (Figura 3) ^{4;25}.

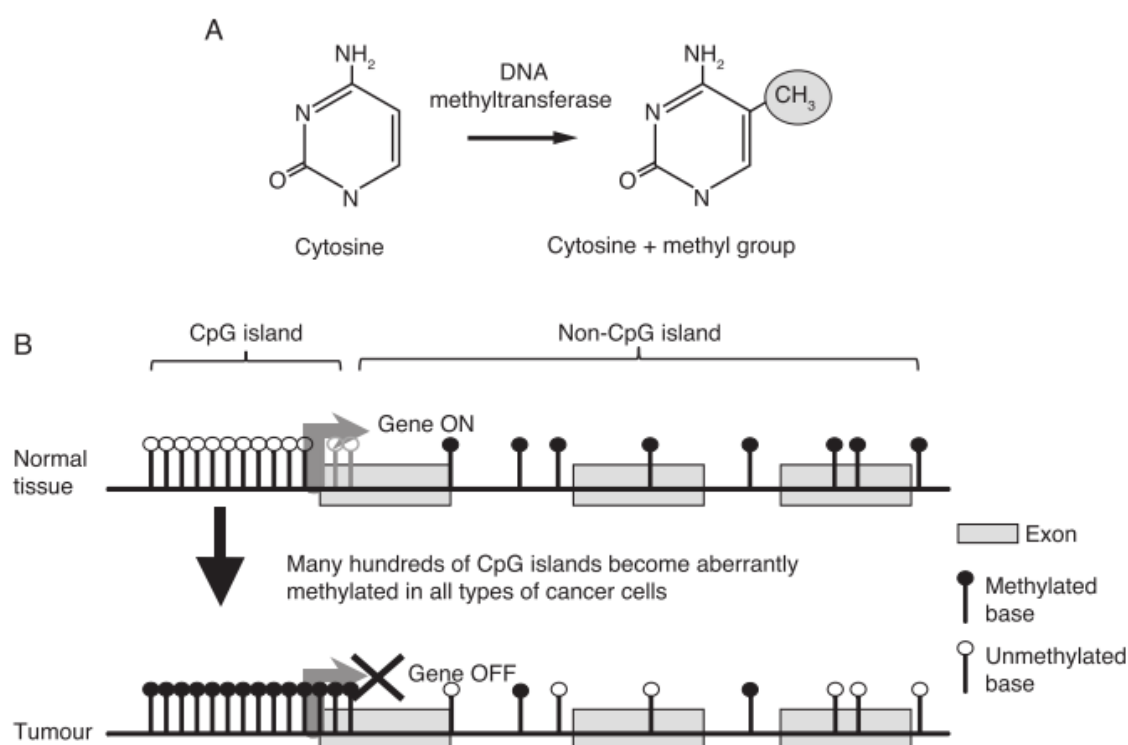


Figura 3 – Metilação do ADN (A) Metilação da base citosina. (B) Diagrama ilustrativo dos efeitos da metilação no promotor das ilhas CpG e regiões promotoras de genes²⁶.

Como referido anteriormente existe um conjunto de genes supressores tumorais que estão silenciados pela hipermetilação do promotor em determinados cancros. Estes genes são fundamentais no processo de tumorigénese e entre eles incluem-se o O⁶-metilguanina-ADN metiltransferase (*MGMT*), que codifica um gene de reparação de ADN; o cyclin-dependent kinase inibitor 2B (*CDKN2B*), que codifica *p15*, um regulador de ciclo celular; e *RASSF1A* que codifica uma proteína que se liga ao oncogene *RAS*²⁷.

Entre os genes supressores tumorais que são afetados pela metilação anormal das ilhas de CpG no cancro, existe o gene *hMLH1*, do MMR, que causa a MSI. Alguns grupos de investigação mostraram que a hipermetilação do promotor ocorre em tumores humanos primários²⁸.

Inicialmente foi descoberta a hipometilação global do ADN que é normalmente considerada um “hallmark” do cancro⁴. Estudos mostram que os níveis de 5-metilcitosina estão mais baixos no ADN das células tumorais comparativamente com as células normais, evidenciando uma ligação entre a metilação e o cancro. Também foi demonstrado que a perda global de metilação é um dos primeiros eventos na tumorigénese. A desmetilação das ilhas CpG pode levar à ativação de oncogenes como “*Harvey Ras sarcoma viral oncogene homolog*” (*H-ras*), no entanto não existe evidência da sobreexpressão deste gene no cancro²⁹.

A potencial reversibilidade dos padrões de metilação do ADN sugere que este mecanismo pode ser um possível alvo no tratamento do cancro. Uma meta específica da terapia epigenética é restaurar o padrão normal de metilação do ADN e impedir que as células de adquirir a metilação, que possa levar ao silenciamento de genes supressores tumorais cruciais para o funcionamento normal da célula²².

1.3.3. Inibidores da metilação do ADN

Os avanços recentes foram fundamentais para a compreensão e reconhecimento da importância da contribuição de fatores epigenéticos para o fenótipo maligno. Muitos genes que controlam a homeostasia celular normal, podem silenciar-se indevidamente como resultado de modificações estruturais da cromatina que implicam a metilação do ADN. Deste modo, a procura de agentes que possam inverter estas modificações e, por isso, restaurar as vias celulares tem sido alvo de estudo²⁷.

Existem duas classes de inibidores da metilação do ADN: análogos nucleósidos e não análogos nucleósidos (Figura 4).

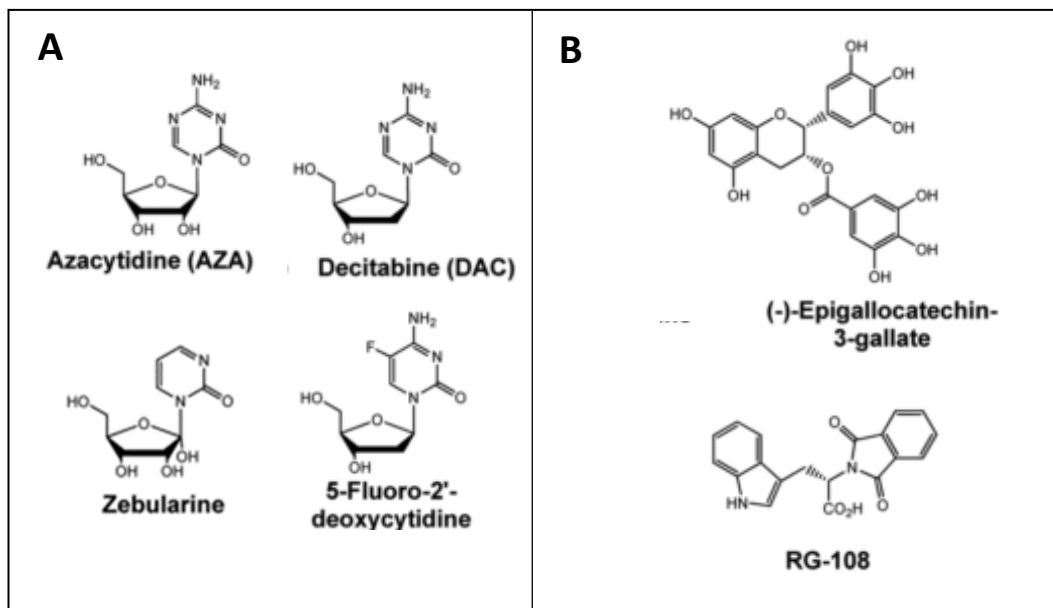


Figura 4 - Estruturas de compostos com capacidade para inibir as ADN metiltransferases (DNMTs). (A) análogos nucleosídicos. (B) não análogos nucleosídicos. Adaptado de³².

Os análogos nucleosídicos têm um anel de citosina modificado que se liga a uma ribose ou a uma desoxirribose. Estes são metabolizados por cinases que convertem os nucleosídicos em nucleótidos para a incorporação no ADN e/ou no ARN. Pensa-se que a metilação do ADN é inibida quando os compostos se incorporam no ADN. Exemplos de análogos ribonucleosídicos são o 5-azacitidina (5-Aza) e a zebularine, enquanto que de análogos desoxirribonucleosídicos são a decitabine (DAC) e o 5-fluoro-2'-deoxycytidine (5-F-CdR)²².

Os agentes desmetilantes 5-Aza e DAC foram inicialmente sintetizados na Checoslováquia como potenciais agentes quimioterapêuticos para o tratamento do cancro³⁰. Estes agentes são inibidores potentes da metilação do ADN, que se incorporam nos ácidos nucleicos das células em divisão, atuando como inibidores das ADN metiltransferases (DNMTs) (Figura 5). Estes agentes são extremamente eficazes na inibição da metilação de ADN em concentrações muito baixas, contudo o tempo de semi-vida é baixo em solução aquosa o que pode limitar o seu efeito²².

O 5-Aza obteve aprovação pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de mielodisplasia em 2004 e o DAC está atualmente na terceira fase dos ensaios clínicos. Investigações clínicas recentes confirmaram que a exposição a baixas dosagens deste agente origina respostas potentes associadas a uma baixa toxicidade. As pesquisas clínicas contínuas exploram também o uso de doses baixas de inibidores DNMTs no tratamento de tumores sólidos tais como o de melanoma, mama, renal, colon e bexiga^{31,32}.

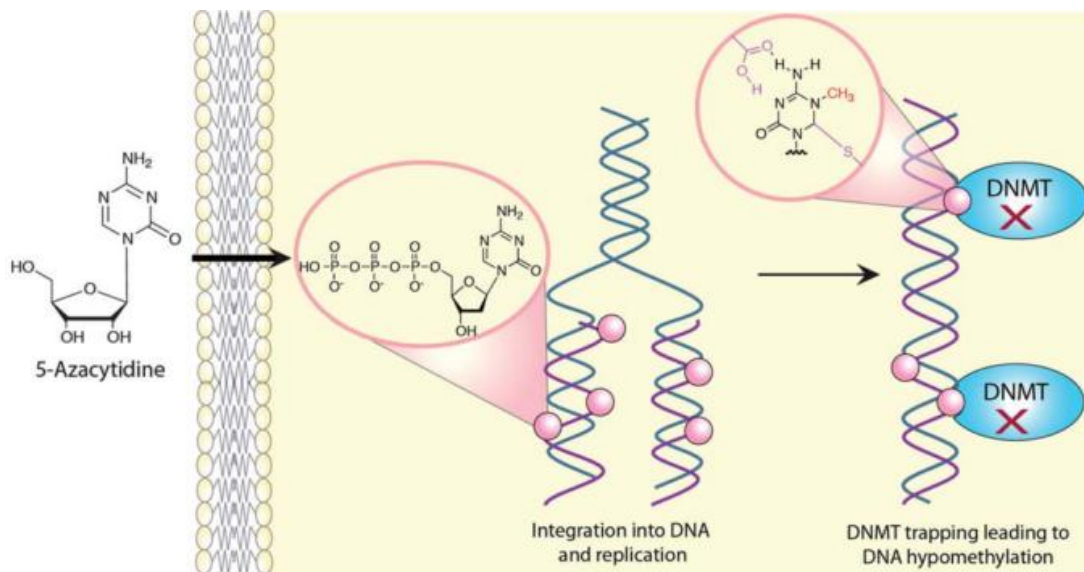


Figura 5 – Modelador epigenético aprovado pela FDA. Mecanismo de ação 5-Azacitadina. Adaptado do³³.

Em relação não análogos nucleósidos já existem bastantes compostos que pertencem a esta classe, no entanto apenas alguns entraram em ensaios clínicos, mas o contínuo investimento nesta área conduzirá à introdução de mais compostos. Os inibidores “small molecule inhibitors” poderiam ser mais úteis na clínica do que os análogos nucleósidos porque inibem a metilação do ADN atuando diretamente na região catalítica da enzima, sem incorporação no ADN. Por exemplo, RG108 é uma molécula inibidora pequena desenvolvida especificamente para atuar no centro catalítico da DNMT1, tornando a enzima inativa³¹.

Os outros inibidores da metilação do ADN, os não análogos nucleósidos incluem a hidralazina, a procainamida e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). Estas drogas não são tão robustas como os análogos nucleósidos³².

A reativação de genes, inclusive de genes envolvidos na apoptose e na regulação do ciclo celular ocorre após a inibição inicial da metilação do ADN, originando morte celular e paragem do ciclo celular, entre outros efeitos. Os compostos epigenéticos têm a vantagem de serem eficazes em baixas doses e de apresentar uma baixa toxicidade, no entanto o seu efeito é passageiro porque os padrões aberrantes podem ser revertidos, permitindo o reaparecimento de células malignas²².

Embora a hipermetilação de regiões do promotor seja observada no cancro, infelizmente a aplicação sistemática destes agentes inibidores não só afeta as células tumorais mas como também as células normais produzindo uma perda de metilação o que constitui um grave problema. Além disso, o uso de agentes desmetilantes pode agravar a situação, dado que uma

redução do nível de metilação dos oncogenes terá potencialmente efeitos nocivos. Deste modo, o ideal seria desenvolver moléculas específicas para as células tumorais³².

1.4. Agentes quimioterapêuticos

1.4.1. Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes foram usados durante a Primeira Guerra Mundial como armas químicas. Estes compostos induziam efeitos graves como o aparecimento de aplasia da medula óssea e pancitopenia alguns dias depois da intoxicação. A observação destes acontecimentos levou à primeira experiência de utilização do gás mostarda como um agente cancerígeno e à indução tumores em ratos. Outra importante constatação foi a da atividade anticancerígena dos agentes alquilantes que ocorreu aquando do derramamento acidental de gás mostarda, que ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial no porto italiano de Bari. Entre os soldados que foram expostos, observou-se uma taxa significativa de hipoplasia linfóide e mielossupressão. Estudos posteriores, realizados por Gilman e Goodman, evidenciaram o potencial anticancerígeno do gás mostarda através da sua eficácia notável no tratamento de linfomas. Os resultados foram publicados em 1946 e rapidamente surgiu a aprovação pela FDA do primeiro agente alquilante, mecloretamina (“Mustargen”) em 1949, aparecendo depois novas classes de agentes alquilantes³⁴. Os agentes alquilantes atualmente usados em quimioterapia classificam-se em seis classes: alquil sulfonatos (bussulfano); Etileneiminas e metilmelaminas (hexametilmelamina ou altretamina); mostardas azotadas (ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, clorambucila e melfalana); derivados da metilidrazina (procarbazina; triazenos: dacarbazina, temozolomida); nitrosureias (carmustina) e estreptozocina³⁵.

As principais fontes ambientais de agentes alquilantes são o ar, água, alimentação, como subprodutos biológicos (por exemplo, material vegetal abiótico) e poluentes (por exemplo, fumo do tabaco e produtos resultantes da combustão do combustível). No entanto, estes são também produzidos endogenamente e podem surgir como subprodutos dos danos oxidativos ou a partir de dadores de metil como o SAM, que é um co-factor comum nas reações bioquímicas^{36;37;38}. Os agentes alquilantes são, por isso, uma família ubíqua de produtos químicos reativos que transferem grupos alquilo a uma grande variedade de moléculas biológicas, alterando a estrutura e afetando a sua função³⁹.

Dependendo da posição no ADN, os adutos induzidos pelos agentes alquilantes podem comprometer a integridade do genoma através da mutagénese e/ou bloqueando processos biológicos essenciais, como a replicação e a transcrição do ADN, conduzindo potencialmente à morte celular. Devido às propriedades cancerígenas e citotóxicas, os agentes alquilantes podem ser considerados perigosos para a saúde humana. Contudo, estes compostos têm mostrado ser essenciais e benéficos no tratamento de vários tipos de cancro.

Os agentes alquilantes reagem com os anéis de azoto (N) e de oxigénio (O) presentes nas bases azotadas do ADN e originam vários adutos covalentes que variam desde simples grupos metilo a adições de grupos alquilo complexos^{39;40}.

As lesões causadas dependem do número de locais reativos (monofuncionais ou bifuncionais), da reatividade química (tipo S_N1 versus tipo S_N2), do grupo alquilo adicionado (por exemplo, metilo ou cloroetilo) e do substrato de ADN (cadeia dupla ou simples)⁴¹. Os agentes monofuncionais induzem adutos covalentes num único local do ADN, enquanto que os derivados de agentes bifuncionais contêm dois locais reativos e podem interagir com bases azotadas que se encontram em cadeias de ADN diferentes formando “inter-strands” cross-link (na cadeia oposta) do ADN ou “intra-strand” (na mesma cadeia) no ADN ou entre o ADN e as proteínas.

Dependendo da natureza do agente alquilante existem locais preferenciais de alquilação no ADN⁴². Os agentes alquilantes do tipo S_N2 (por exemplo, metanossulfonato de metilo, MMS) alteram principalmente átomos de azoto nas bases do ADN, ao passo que os agentes alquilantes do tipo S_N1 (p. ex. N-metil-N-nitrosourea, MNU) podem modificar tanto os grupos de azoto como os de oxigénio⁴¹.

Em geral, a alquilação de bases ocorre predominantemente nas posições N^7 e O^6 de guaninas do ADN (formando lesões N^7 -alquilG e O^6 -alquilG, respetivamente), na posição N^1 e N^3 de adeninas (originando respetivamente N^1 -alquilA e N^3 -alquilA), e na posição N^3 de citosinas (formando N^3 -alquilC). As alquilações noutros locais como as N^6 e N^7 - adenina, O^2 , N^3 e O^4 - timina, ou O^2 - citosina também foram observada, mas em menor número. Os adutos N-alquilação correspondem a mais de 80% das bases alquiladas e exibem uma estabilidade diferente. Por exemplo, N^7 -MeG (que corresponde a 70% das lesões produzida por agentes monofuncionais) é o aduto mais estável. Os níveis de O^6 -metilguanina (O^6 MeG) variam de 0.3% após a exposição com metanossulfonato de metilo (MMS) a 8% após a exposição com N-metil-N-nitrosourea (MNU), no total de adutos metilo do ADN⁴².

Em geral, as O-alquilações (O^6 -alquilG e O^4 -alquilT) são altamente mutagénicas e genotóxicas, ao passo que N-alquilações (por exemplo, N^3 -alquilA e N^1 -alquilA) são citotóxicas,

mas menos mutagénicas⁴¹. As N-alquilações normalmente resultam em efeitos tóxicos devido à inibição da replicação do ADN relacionada com a presença de bases alquiladas ou danos induzidos no ADN devido à reparação ineficaz destas lesões –por enzimas envolvidas na reparação do ADN, principalmente devido à ação rápida do sistema de reparação por excisão de bases (BER). Por outro lado, as O-alquilações como a O⁶-metilguanina (O⁶MeG) são mutagénicas devido à formação do emparelhamento incorreto O⁶MeG:T que leva a transições A:T após dois ciclos de replicação. Alternativamente, os efeitos citotóxicos podem ocorrer devido à persistência de adutos nas bases da cadeia do ADN. Isto ocorre por causa da capacidade do sistema reparação mismatch (MMR) para corrigir danos O⁶MeG:T, um fenómeno conhecido como “futile cycle”. Eventualmente este processo poderá induzir citotoxicidade através da geração de quebras simples ou duplas na cadeia do ADN.

Os agentes alquilantes usados como fármacos quimioterapêuticos são maioritariamente agentes metilantes (por exemplo, temozolomida (TMZ) e estreptozocina) ou agentes cloroetilantes (p. ex., carmustina (BCNU), lomustina e fotemustina)³⁶.

O composto BCNU é um dos agentes quimioterapêuticos mais usado no tratamento de glioblastomas, mas a taxa de sobrevivência é baixa (6-10% por ano) para o glioma maligno. Alguns investigadores mostraram que o tratamento simultâneo com TMZ e radioterapia em pacientes recentemente diagnosticados com este tipo de cancro levou a um aumento da sobrevida média para 14.6 meses⁴³.

Como anteriormente referido, os agentes alquilantes podem causar diferentes tipos de lesões, e cada lesão é reparada por várias enzimas e vias de reparação na tentativa de estabilizar o genoma. Os efeitos dos compostos alquilantes são fortemente modelados por processos de reparação de ADN. Existem vários sistemas de reparação específicos para os danos alquilantes o que indica que estes tipos de danos são bastante citotóxicos. Todos os mecanismos principais de reparação de ADN [reversão direta dos danos, reparação por excisão de bases (BER), reparação por excisão de nucleótidos (NER), sistema reparação de mismatch (MMR)} estão envolvidos no processamento tanto dos produtos primários de alquilação (p. ex. metilações e cloroetilações), como dos danos secundários desses produtos (p. ex. locais abásico, quebras nas cadeias e “interstrand cross-links” (ICLs)). A compreensão e o controlo dos processos de reparação do ADN são uma estratégia promissora para o aumento da eficácia dos agentes alquilantes quimioterapêuticos permitindo o desenvolvimento de novas terapias³⁹.

Os adutos N-alquilação são reparados pela via BER. Existem muitos estudos que mostram que a baixa eficácia do sistema BER, proveniente da inibição de proteínas-chave como a

endonuclease apurínico/apirimidínico 1 (APE1), polimerase β ou poli - (ADP-ribose) polimerase (PARP), pode levar à sensibilização das células tumorais a agentes alquilantes. Vários inibidores da atividade da APE1 foram identificados, com o intuito de sensibilizar diversos tipos de células humanas a agentes alquilantes. A metoxiamina (Mx) é um inibidor da APE1, que tem a capacidade de bloquear a reparação através do sistema BER reagindo com um grupo aldeído-açúcar do AP, causando um aduto intermédio metoxiamina-AP estável que bloqueia a atividade da APE1. A inibição do sistema BER usando o Mx demonstra potencial efeito citotóxico de numerosos agentes alquilantes em vários tipos de células tumorais⁴¹.

Por outro lado, a PARP desempenha um papel crítico no reconhecimento de danos no ADN, especialmente de adutos N^7MeG e N^3MeA e, conseqüentemente, os inibidores da PARP foram desenvolvidos para potenciar a citotoxicidade dos agentes alquilantes independentemente da produção de O^6MeG . Observou-se *in vitro*, em modelos xenográficos e em várias investigações clínicas que o uso do TMZ com inibidores da PARP pode, por exemplo, proporcionar um aumento da sobrevida em pacientes com melanoma metastático⁴¹.

A compreensão dos mecanismos celulares pelos quais as células respondem aos agentes quimioterapêuticos alquilantes fornecerá uma visão global de como os diferentes mecanismos de reparação do ADN podem prever a sensibilidade/resistência de tumores a agentes alquilantes. A combinação de diferentes abordagens (como genómicas, transcriptómicas e proteómicas) permitirá a personalização da terapia quimioterapêutica reduzindo, desta forma, a toxicidade ou mutagenicidade e maximizando a morte de células tumorais.

1.4.2 5-Fluorouracil (5-FU)

O composto 5-Fluorouracil (5-FU) foi desenvolvido em 1957 como um possível agente terapêutico no tratamento de câncros avançados⁶³.

O 5-FU é um dos agentes anticancerígenos mais amplamente usado na clínica, sendo um composto quimioterapêutico particularmente útil no tratamento dos câncros colo-retal e da mama. A quimioterapia com o 5-FU melhora a sobrevida em pacientes com cancro do colon no estágio III e em pacientes com cancro colo-retal nos estádios II e III. Contudo, as taxas de resposta individual dos pacientes ainda são, no geral, baixas (20–30%)⁶⁴.

O 5-FU é um análogo do uracilo com um átomo de flúor na posição C-5, em vez de um hidrogénio. O composto 5-FU necessita de ser convertido na sua forma ativa - trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) - para conseguir ligar-se ao ARN e produzir o efeito desejado. A

incorporação 5-FU no ARN afeta a síntese de ADN por meio de inibição da timidilato sintase (TS) que é responsável pela produção de trifosfato de timidina. Contudo, o 5-FU tem outro mecanismo de ação que depende de outro metabolito ativo, o trifosfato fluorodina (FUTP). Neste mecanismo ocorre a substituição do uracilo que é capaz de se incorporar no ARN, inibindo o seu processamento e, conseqüentemente, o crescimento celular (Figura 6)^{65,66}.

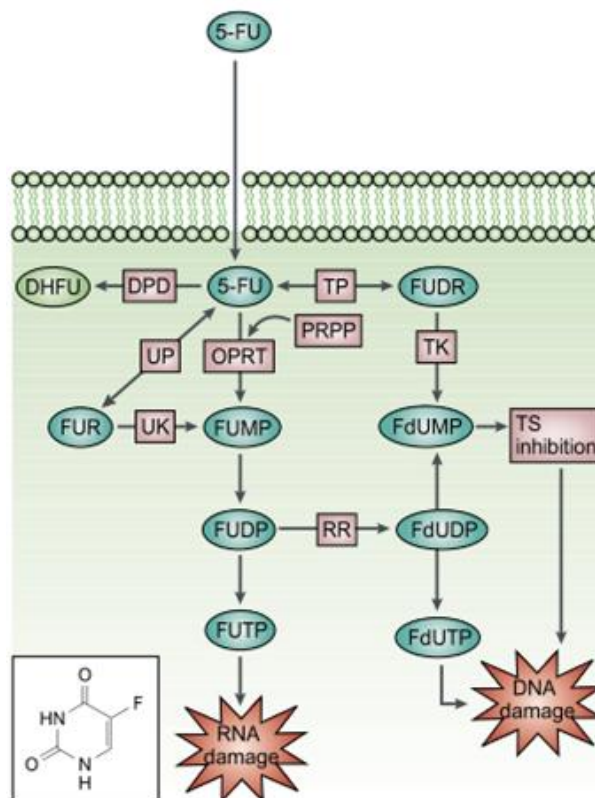


Figura 6 – Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil. Adaptado do⁶⁵

A inibição TS conduz à acumulação de desoxiuridina monofosfato (dUMP) que pode levar, posteriormente, ao aumento dos níveis de desoxiuridina trifosfato (dUTP). Tanto o dUTP como os FdUTP podem ser mal incorporados no ADN. A reparação do uracilo e do 5-FU pela enzima uracilo-ADN-glicosilase (UDG) do sistema NER é inútil na presença de elevadas proporções (F)dUTP/dTTP e só resulta na incorporação de falsos nucleótidos. Estes "futile cycles" de mal incorporação, a excisão e reparação conseqüentemente levam a quebras na cadeia do ADN e à morte celular⁶⁵.

Para predizer se o tumor de um paciente é resistente à quimioterapia 5-FU, são necessários estudos adicionais para caracterizar os fatores biológicos implicados na resposta ao 5-FU⁶⁷. Meyers e os colegas mostraram *in vitro* que a restauração da atividade MLH1, numa linha celular maligna com défices no sistema MMR aumenta a sensibilidade destas células ao 5-FU. Este facto

indica que as células com o sistema MMR disfuncional são menos sensíveis ao 5-FU. Consequentemente, os pacientes com o fenótipo MSI mostram um pior prognóstico e uma sobrevivência limitada depois do tratamento com o agente quimioterapêutico 5-FU⁶⁸.

1.5. Mecanismos de reparação de ADN

O ADN é uma molécula muito importante, visto que contém a informação genética e, por isso, a sua estabilidade e integridade são essenciais para a vida dos organismos. Contudo, o ADN sofre constantemente modificações induzidas por vários agentes adversos provenientes tanto de fontes endógenas como exógenas. Os danos podem ser causados por espécies reativas de oxigénio (ROS), metais, agentes alquilantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, mudanças de temperatura, raios ultravioleta (UV) e radiação ionizante. As principais alterações induzidas por estes agentes incluem reações de desaminação, oxidação, alquilação e dimerização das bases dos nucleósidos, perda de bases, quebras simples e duplas no ADN, ICLs, a formação de locais apurínicos/apirimidínicos (AP, também conhecidos como locais abásicos) e crosslinks ADN-proteína⁴⁴. Muitas destas lesões são extremamente perigosas para as células e podem comprometer os processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição do ADN. Se não forem corretamente reparados, muitos destes danos conduzem a mutações e/ou de morte celular.

Para manter a integridade do genoma, os organismos desenvolveram vários mecanismos de reparação do ADN. A reparação ocorre sobretudo em células em divisão e em todos os organismos. Os mecanismos de reparação do ADN são responsáveis por reparar e remover vários tipos de danos. Todavia, as células também têm vias de tolerância de danos que asseguram a replicação do ADN mesmo quando as lesões não são reparadas⁴¹.

Como referido anteriormente, os sistemas de reparação do ADN mais importantes responsáveis pela reparação de danos de alquilação incluem: o sistema BER, o sistema NER, o sistema MMR e o de reparação de quebras duplas da cadeia de ADN (DSBs). Para além destes sistemas, a reparação dos danos alquilantes também pode ocorrer pela reversão direta dos danos, pela proteína O⁶-metilguanina-ADN metiltransferase (MGMT), que realiza a reparação direta do ADN sem a remoção da base danificada (Figura 7).

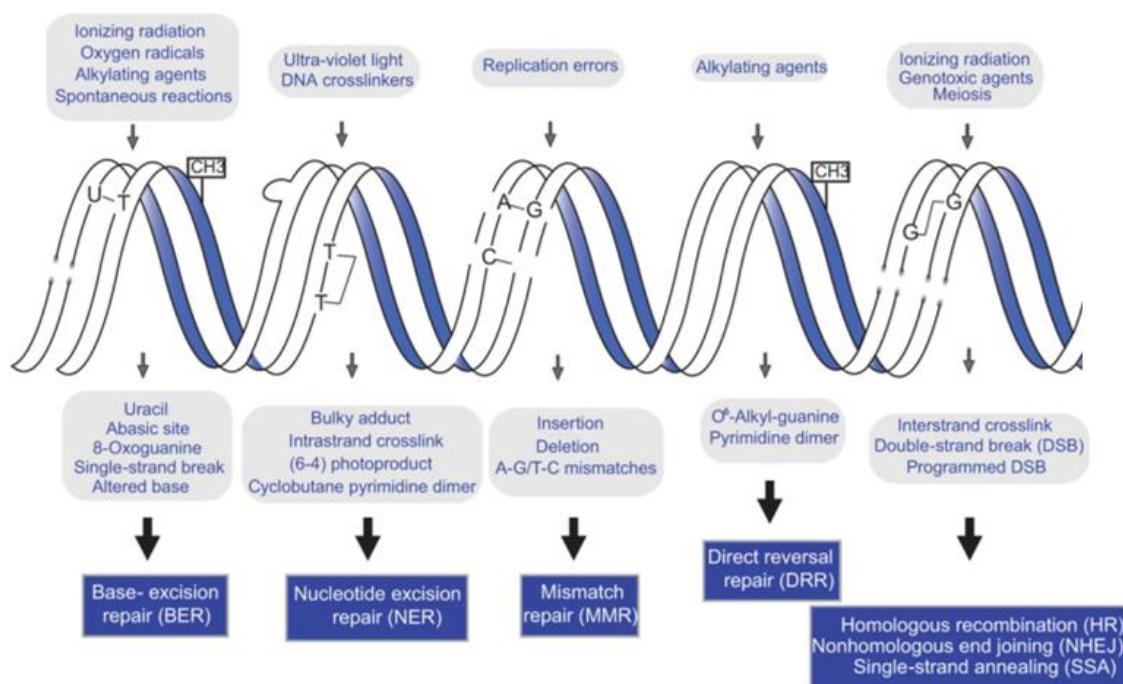


Figura 7– Tipos de danos no ADN e respetivas vias de reparação de ADN. Adaptado do⁴⁶

1.5.1. Reversão direta dos danos de ADN pela enzima MGMT

O gene *O⁶-metilguanina-ADN metiltransferase (MGMT)*; também conhecido como ATase, AGT) é transcrito num mRNA de 866 nucleótidos, que codifica uma proteína com 207 aminoácidos e com um peso molecular de 24 kDa. A MGMT é uma proteína relativamente estável, com um tempo de meia-vida de 24 h. Esta proteína localiza-se no citoplasma e desloca-se para o núcleo quando ocorrem danos provocados por alquilação, sendo responsável por reparar, como por exemplo, a adição de um grupo de metilo (CH₃-) na posição O⁶ da guanina. O dano O⁶MeG-conduz ao-emparelhamento com uma timina em vez de com uma citosina e promove mutações do tipo transição G:C para A:T⁴⁵. As lesões O⁶-alquilação são reparadas num único passo pela MGMT. Esta proteína transfere o grupo metil a partir da guanina alquilada para o resíduo de cisteína (Cys 145) presente no centro ativo⁴⁶. Esta reação é irrevogável e culmina na inibição da proteína que posteriormente sofre ubiquitinação e degradação no proteasoma⁴⁷.

Cada MGMT só consegue reparar um aduto alquilo, pelo que a capacidade das células para remover adutos O⁶-alkylguanine depende do número total de moléculas MGMT por célula e da taxa de ressíntese da MGMT. A MGMT remove os grupos metilo muito mais rápido do que, por exemplo, os grupos etilo ou isopropílico⁴⁵. Por exemplo, o BCNU têm efeito citotóxicos devido à alquilação da posição O⁶ da guanina (O⁶- cloroetilguanina - O⁶-ClethG). Este monoaduto é

convertido através de ciclização interna em N¹-O⁶-ethanoguanina (N¹-O⁶-ethanoG) que é capaz de reagir com a citosina presente na cadeia complementar (N³-citosina), o que conduz à formação de N¹-guanina-N³-citosina ICLs⁴⁸. Os danos do ADN originados por este agente necessitam de vias de reparação complexas. Inicialmente, os danos O⁶-ClethG são reparados pela MGMT. A MGMT pode transferir o grupo cloroetilo de O⁶-ClethG, antes da formação de ICLs prevenindo a formação deste dano, que é prejudicial⁴⁵.

Devido à estequiometria da reação de reparação, a capacidade de reparação é determinada inicialmente pelo número de moléculas MGMT ativas. Por conseguinte, se os níveis de danos excederem os níveis de moléculas da proteína preexistentes, a taxa de síntese *de novo* da proteína aumenta depois da inativação. A MGMT é importante não só na prevenção do cancro, mas também na resposta das células aos agentes alquilantes. Alguns estudos demonstraram que as células com deficiência na MGMT são incapazes de reparar os danos O⁶MeG, sendo, conseqüentemente mais sensíveis aos efeitos induzidos pelos agentes metilantes do que as células normais que expressam a versão ativa da MGMT. Experimental e clinicamente utilizou-se um inibidor da MGMT, um análogo O⁶MeG, O⁶benzylG (BG) que inativa a MGMT. Contudo, em alguns tumores, o p53 disfuncional suprime a expressão da MGMT ou causa a hipermetilação do promotor do seu gene, resultando no silenciamento do mesmo. O estado do promotor do gene MGMT é muito importante, podendo inclusive ser um fator de prognóstico, dado que a ausência da atividade da MGMT considera-se positiva para pacientes que estão a ser tratados com agentes quimioterapêuticos alquilantes. Deste modo, se a MGMT continua a ser expressa, os compostos quimioterapêuticos devem ser administradas simultaneamente com o inibidor BG^{42,46}.

1.5.2. Sistema de reparação de mismatch (MMR)

O sistema MMR atua durante o processo de replicação e lida com emparelhamentos incorreto base-base causados por deaminações, oxidações e metilações. Os principais alvos do MMR são erros de emparelhamento como G/T (resultado da deaminação da 5-metilcitosina), G/G, A/C e C/C. Além da reparação dos danos acima mencionados, este sistema tem um impacto significativo ao nível dos danos causados por agentes alquilantes, dado que medeia a resposta celular induzida por O⁶MeG. Os danos O⁶MeG presentes na cadeia de ADN levam à formação do emparelhamento incorreto do O⁶MeG:T e conseqüentemente quebras simples na cadeia do ADN (SBs). O sistema MMR também reconhece cross-links "1,2-intrastrand" (GpG) gerados pela cisplatina, fotoprodutos induzidos por UV, adutos de purina de benzo[a]pireno-7,8-diidrodiol-

9,10 epóxidos, 2-aminofluorene, N-acetil-2-aminofluorene e 8-oxoguanina. Em suma, o sistema MMR é relevante para a manutenção da estabilidade genómica e na redução de mutações⁴⁷.

No funcionamento do sistema MMR, os principais passos são (a) o reconhecimento das alterações no ADN; (b) excisão da base e (c) síntese de reparação do nucleótido modificado. O sistema MMR tem como alvo a nova cadeia sintetizada ao contrário dos sistemas NER e BER. O reconhecimento do dano no ADN realiza-se através do complexo MutS α que se liga ao dano. A MutS α é constituída pelas proteínas homólogas MutS, a MSH2 e a MSH6. A MSH2 também pode formar um complexo com a proteína MSH3. Este complexo designa-se por MutS β e liga-se também a zonas danificadas no ADN. Os heterodímeros MutS α e MutS β têm papéis diferentes, porque atuam em danos diferentes. O complexo MutS α liga-se aos emparelhamentos incorreto base-base e pequenos emparelhamentos incorretos de inserção/deleção, ao passo que o MutS β é responsável pelo reconhecimento de grandes emparelhamentos incorretos de inserção/deleção. Quando a MutS (α ou β) se liga ao ADN, formam um “sliding clamp” capaz de se deslocar em qualquer direção no ADN até reconhecer um emparelhamento incorreto. Após o reconhecimento do erro, a conformação da MutS modifica-se para permitir o recrutamento da MutL originando um complexo ternário dependente de ATP. Os homólogos humanos da MutL são o MLH1-PMS2 (MutL α), o MLH1-PMS1 (MutL β) e o MLH1-MLH3 (MutL γ). O MLH1-PMS2 (MutL α) é o complexo de MutL mais proeminente que, quando complexado com MutS, atua como uma endonuclease. O MLH1-PMS1 (MutL β) mostrou não ter uma atividade significativa no sistema MMR em estudos *in vitro*. Por sua vez, a MLH1-MLH3 (MutL γ) pode integrar o sistema MMR e estar envolvida, principalmente, na recombinação meiótica devido à sua atividade de endonuclease. Pensa-se que a formação dos complexos MutS-MutL, que podem deslocar-se em qualquer direção ao longo do ADN, está implicada no recrutamento da exonuclease I (ExoI) e na excisão específica na cadeia subsequente. A ExoI é recrutada para remover nucleótidos na direção 5'-3'. No caso da excisão 3', a ExoI recruta o fator de replicação C (RFC) para executar uma excisão 3'-5'. A proteína de replicação A (RPA) estabiliza o ADN na cadeia simples e inibe a ExoI para prevenir uma nova degradação de nucleótidos^{47;49}.

Para a síntese da cadeia principal, liga-se o antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA), que determina a orientação da incisão por MLH1-PMS2, e também é requerido para o reconhecimento do emparelhamento incorreto pela interação com MutS e para a ativação das endonucleases. Após a seleção apropriada da cadeia e da incisão, o PCNA coordenada com a ExoI, que tem atividade de exonuclease 5'-3' intrínseca, para a excisão da região que contém a

incompatibilidade. A Pol δ (lagging strand) ou ϵ (leading strand) preenche a quebra com nucleótidos complementares e através da ação da ligase ADN I a incisão é fechada (Figura 8)⁴⁷.

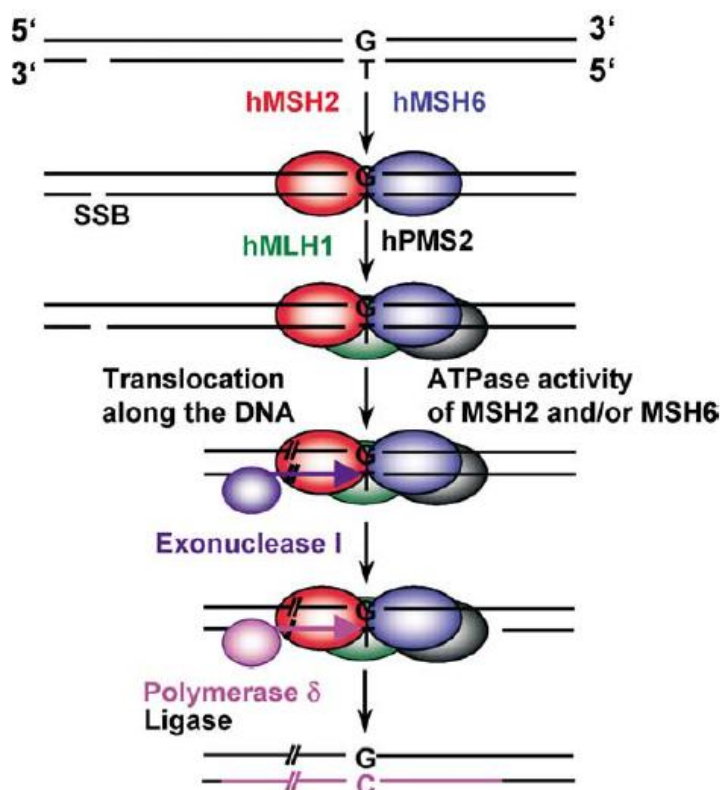


Figura 8– Mecanismo de reparação pelo sistema mismatch repair (MMR)⁴⁷

As células de mamíferos com o sistema MMR ativo são geralmente mais sensíveis aos agentes alquilantes do que células com o sistema MMR disfuncional. Nas células com o sistema MMR ausente, os danos no ADN acumulam-se e não ocorre a morte celular. O papel do sistema MMR na morte celular é decisivo e determina a resistência às drogas quimioterapêuticas (por exemplo, MNU e TMZ). A resistência aos agentes citotóxicos está associada à perda da atividade do sistema MMR, em particular quando há disfuncionalidade da MGMT. Na ausência da MGMT-ativa, as lesões O^6MeG não são reparadas, formando-se o emparelhamento incorrecto $O^6MeG:T$ durante a replicação. Os danos $O^6MeG:T$ ativam o sistema MMR. Este sistema tem a capacidade de eliminar o que existe na cadeia complementar criando um espaço livre, mas, o O^6MeG não reparado emparelha-se com outra timina no ciclo de replicação seguinte. Enquanto o O^6MeG permanece na cadeia do ADN, há repetição do processo que leva a um "futile cycle" e à re-introdução do resíduo T. Por fim, um SBs é produzido e inicia-se uma resposta apoptótica. A inativação do MMR por mutação ou por silenciamento do promotor previne o "futile cycle" e a

produção de SB, por conseguinte também a apoptose, resultando na resistência aos compostos alquilantes (Figura 9)⁴².

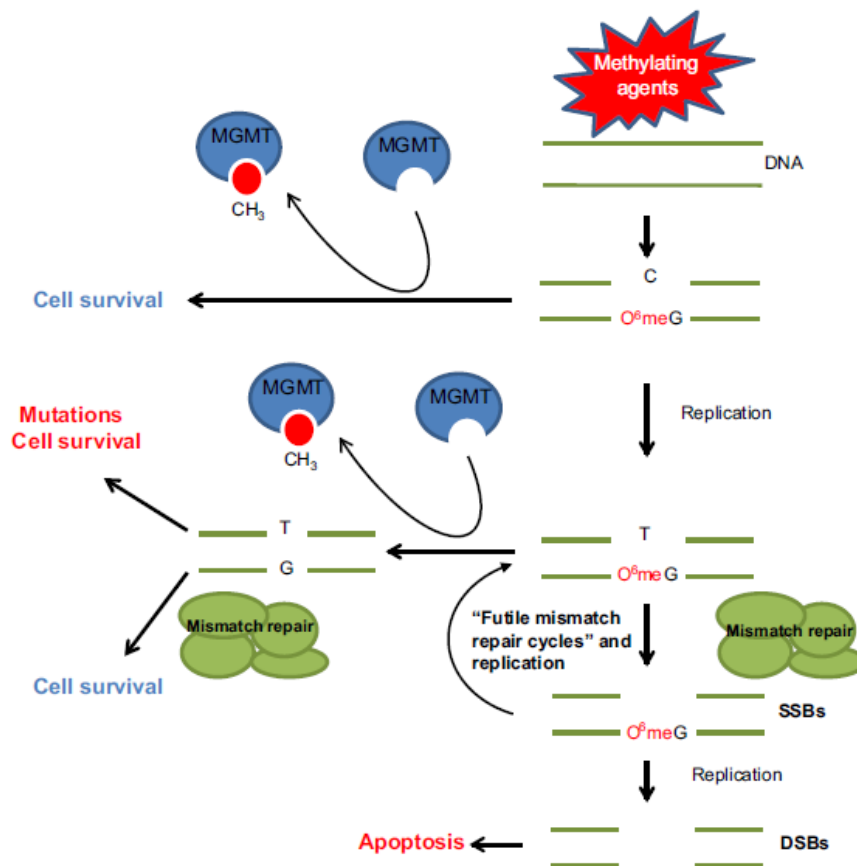


Figura 9 – Reparação dos danos de ADN induzido por um agente metilante envolvido nas vias MGMT e MMR⁵⁰.

1.5.3. Sistema de Reparação por excisão de bases (BER)

Os principais danos detetados pelo sistema BER são as bases oxidadas, que surgem espontaneamente durante as respostas inflamatórias ou em consequência da exposição a agentes exógenos. As outras alterações reparadas pelo sistema BER são alquilações induzidas por espécies alquilantes endógenas e carcinogêneos exógenos tais como as nitrosaminas. As lesões removidas do ADN pelo sistema BER incluem: uracilo incorporado, pirimidinas fragmentadas, purinas N-alquiladas (N⁷-metilguanina, N³-metiladenina e N³-metilguanina), 8-oxo-7,8-dihydroguanina (8-OxoG), entre outras. É essencial reparar estes tipos de danos, uma vez que podem ter consequências fatais para as células, tal como o dano 8-OxoG, que é altamente mutagénico⁴⁷.

O sistema BER inicia-se com o reconhecimento da base danificada por uma ADN glicosilase, que elimina a base, originando um local AP. Existem ADN glicosilases específicas que reconhecem um tipo de dano específico no ADN [(por exemplo, as lesões alquilantes são reconhecidas pela N-

metilpurina-ADN-glicosilase (MPG)]. Para além disso, algumas ADN glicosilases são glicosilases simples, ou seja, catalisam só a remoção hidrolítica da base o que forma um local AP, ao passo que outras ADN glicosilases (“AP liases” ou “bifuncional ADN glicosilases”) também são capazes de clivar locais AP e também promovem a eliminação do 3'-fosfato. O local AP recém-criado é processado pela endonuclease AP, originando um espaço de apenas um único nucleótido no ADN. Posteriormente, o espaço é preenchido por uma ADN polimerase, e o corte resultante é ligado por uma ADN ligase, ou seja a ADN ligase conclui o processo de reparação e restaura a integridade da hélice⁵¹.

Quando a glicosilase não possui atividade de liase, a endonuclease AP 1 (APE1) incisa a extremidade 5' do local AP deixando um espaço de um nucleótido com um resíduo de 5'-fosfato de desoxirribose (dRP). A ADN polimerase β (Pol β) retira o resíduo dRP, através da sua atividade liase dRP, e preenche o espaço usando a sua atividade de polimerase. Neste sistema, apenas um nucleótido é substituído. Assim, a via mediada pela APE1 e Pol β chama-se reparação por excisão de base pela via curta. A outra via é a reparação por excisão de base pela via longa. A primeira via caracteriza-se pela ressíntese de um único nucleótido pela Pol β . Por contraste, a via longa do sistema BER implica a ressíntese, pela Pol β ou pela Pols δ/ϵ , de um oligonucleótido abrangendo dois a sete nucleótidos (Figura 10)^{47:52}.

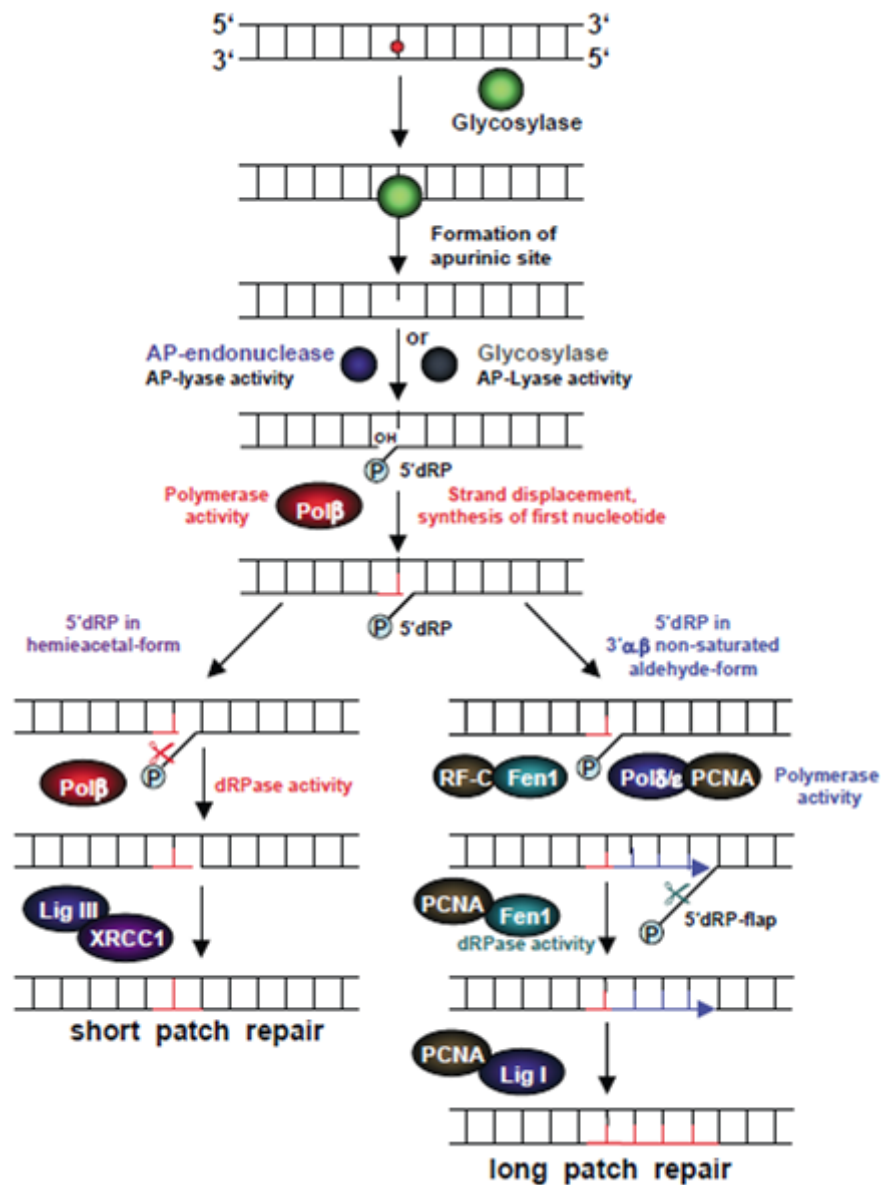


Figura 10 – Mecanismo de reparação por excisão de base (BER) ⁴⁷

1.5.4. Sistema de Reparação por excisão de um nucleótido (NER)

O sistema NER reconhece e repara uma variedade ampla de lesões do ADN. Muitas dessas lesões são originadas por produtos químicos que se ligam covalentemente a bases do ADN e formam o designado aduto “bulky” no ADN⁵³. As lesões pirimidina ciclobutano e “(6-4)-photoproducts” são lesões muitas vezes induzidas pela luz ultravioleta⁵³. Os passos básicos do sistema NER são (i) o reconhecimento do dano; (ii) incisão na cadeia em ambos os lados da lesão para formar um oligômero de 24-32 nucleótidos; (iii) liberação do oligômero; (iv) síntese de

reparação do ADN para substituir os nucleótidos removidos e por último (v) a ligação dos nucleótidos⁵⁴.

O sistema NER pode ser dividido em duas vias: a via de reparação global do genoma (GGR) que processa os danos no ADN nas partes transcriptionalmente inativas do genoma e a via da reparação acoplada à transcrição (TCR) que é responsável pela reparação das cadeias transcritas de ADN (Figura 11)⁵⁵.

Depois da indução de lesões “bulky” no genoma, a lesão é reconhecida e, dependendo da sua posição no genoma, será reparada por umas das duas vias de reparação. A via GGR inicia com fator específico - o XPC–HR23B - e os complexos RPA–XPA que identificam as lesões no ADN. Outro fator importante implicado na via GGR é a proteína de ligação do ADN danificado (DDB), que é um heterodímero com dois polipéptidos DDB1 e DDB2 que pertencem ao grupo XPE-complementação⁴⁷. Propôs-se que a DDB se liga primeiro à lesão, e posteriormente recruta a XPC/HR23B⁵⁶ ou a XPA–RPA⁵⁷. Depois do reconhecimento da lesão, o fator de transcrição TFIIH composto por sete proteínas diferentes (XPB, XPD, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, CDK7, CCNH e MNAT1) é recrutado para o local do dano pelo complexo XPC–HR23B. A TFIIH é necessária no local para desenrolar a hélice do ADN em volta do dano⁴⁴. Consequentemente, forma-se o complexo de excisão pelo recrutamento do complexo XPA–RPA e das duas endonucleases específicas XPG e XPF-ERCC1, capazes de efetuar incisão no ADN em 3' e 5', respetivamente⁵⁸.

Os espaços criados no ADN são reparados usando a cadeia de ADN complementar como modelo. Este processo chama-se síntese de reparação. O espaço no ADN é preenchido pela ação da Pol δ ou ϵ , PCNA, RPA e ligase⁵⁵.

Em contraste com o GGR, o mecanismo de TCR não está tão bem elucidado. A via TCR inicia-se quando a RN polimerase II (RNAPII) para num dano. Isto leva ao recrutamento da CSA, CSB e/ou TFIIH para local da lesão, a RNAPII é removida do ADN ou desloca-se do local, tornando-o acessível às exonucleases XPF-ERCC1 e XPG, que cortam a cadeia que apresenta o dano. A ressíntese ocorre novamente devido à ação da Pol δ ou ϵ e à ligação dos nucleótidos pela ação da ADN ligase I⁴⁷.

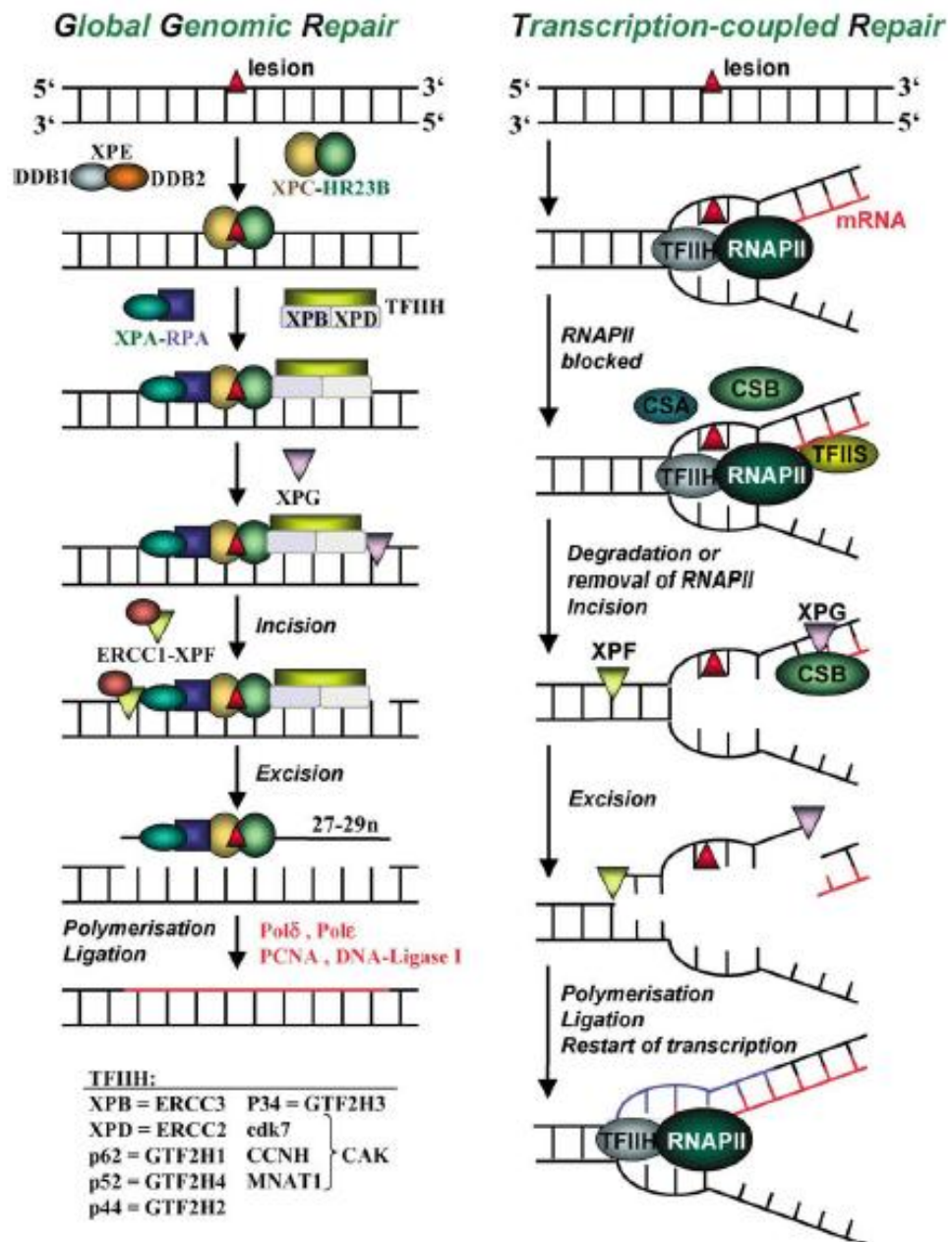


Figura 11 – Mecanismo de reparação por excisão de um nucleótido (NER)⁴⁷

1.5.5. Sistema Reparação das quebras duplas no ADN

As quebras duplas (DSBs) no ADN podem ter efeitos genotóxicos (quebras e trocas cromossômicas) e, e em última instância, causa a morte celular. Nos eucariotas, quando as DSBs não são reparadas, estas podem inativar um gene essencial e, assim serem suficientes para induzir morte celular pela via apoptótica. A reparação das DSBs pode ocorrer pelas vias de

recombinação homóloga (HR) ou de “non-homologous end-joining” (NHEJ). A via NHEJ ocorre principalmente nas fases G0/G1, ao passo que a via HR ocorre durante as fases S e G2⁴⁷.

A via NHEJ inicia-se com o heterodímero Ku70/80 (KU) que se liga nas extremidades onde ocorre a quebra da cadeia dupla. Posteriormente, o KU recruta e ativa a subunidade catalítica ADN-PKcs que provoca uma extensa cascata de sinalização⁵⁹. A reparação pela via NHEJ é facilitada por proteínas como XRCC4 e XLF que se ligam à ADN Ligase IV, que é a enzima responsável por ligar a quebra (Figura 12)⁶⁰.

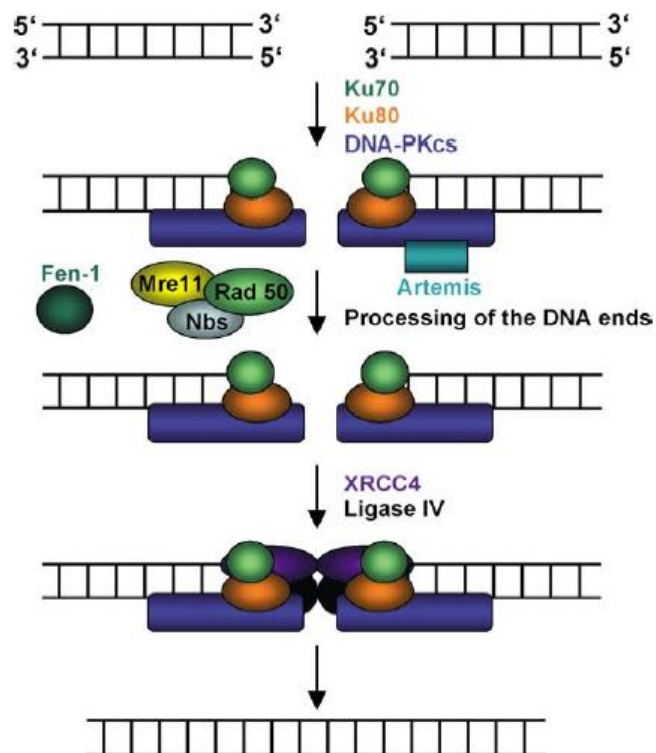


Figura 12 – Mecanismo de “non-homologous end-joining” (NHEJ)⁴⁷

Os componentes e os passos básicos do sistema de reparação de DSB pela HR encontram-se bem caracterizados⁶¹.

Durante a reparação das quebras de cadeia dupla de ADN (DSBs) são recrutadas quatro nucleases: MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), Exo1, ADN2, CtIP e uma helicase a BLM. A RPA (proteína de replicação A) liga-se à cadeia simples de ADN (ssADN) e forma uma barreira cinética contra os filamentos compostos pela proteína RAD51. Como consequência, necessita das chamadas proteínas mediadoras, como RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 ou BRCA2, para permitir a formação do filamento Rad51 com os ssADN-RPA. Posteriormente, o filamento Rad51 procura homologia e invade a cadeia do ADN, gerando um “D-loop”. De seguida, a proteína Rad54 é recrutada para estabilizar o filamento Rad51 e para estimular a síntese de ADN, dissociando-se do

filamento Rad51. Finalmente, no HR distinguem-se três sub-vias, que são “break-induced replication” (BIR), “synthesis-dependent strand annealing” (SDSA), double “Holliday junction” (DHJ). Cada uma destas vias têm enzimas específicas. O “D-loop” representa o ponto que irá definir qual será a sub via de reparação (Figura 13)⁶².

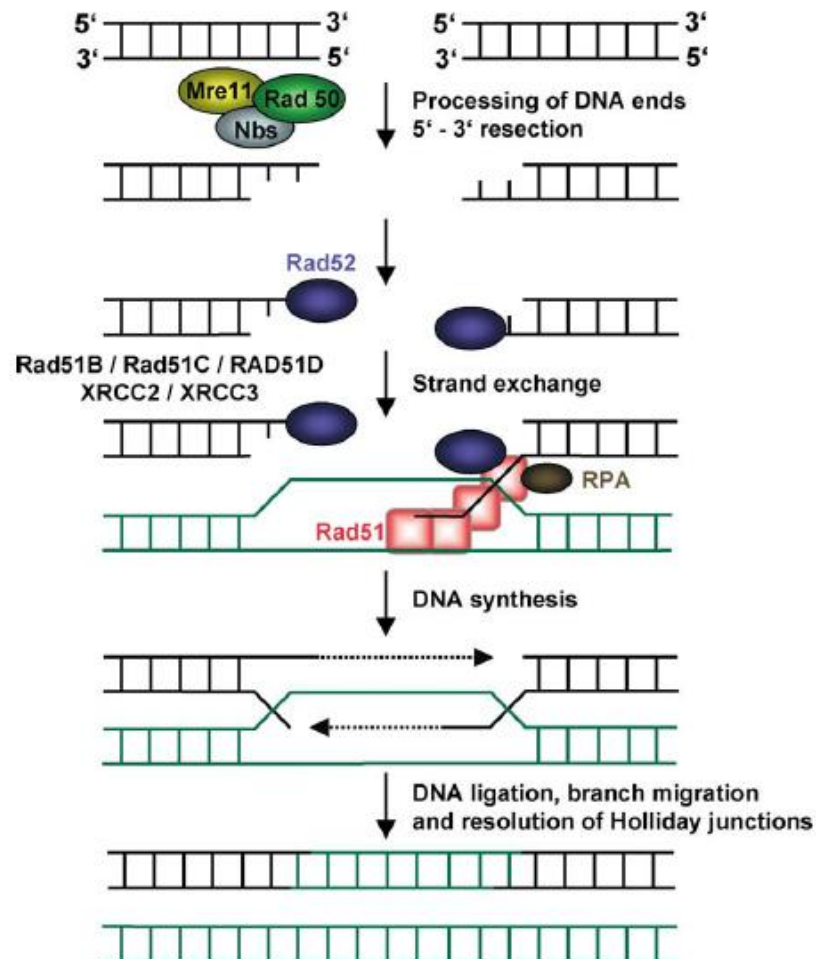


Figura 13– Mecanismo de recombinações homólogas (HR)⁴⁷

1.6 O ensaio cometa no estudo de lesões no ADN e a capacidade de reparação do ADN

1.6.1 O ensaio cometa padrão

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única (SCGE) é um método usado para medir quebras na cadeia de ADN em células individuais e utiliza-se em vários campos científicos como no estudo da genotoxicidade, biomonitorização humana e ecogenotoxicidade. Esta técnica

é bastante usada devido à ampla gama de características atrativas, tais como, rapidez, facilidade, sensibilidade, fiabilidade, versatilidade, baixo custo.⁶⁹

Em 1970, Peter Cook e os colegas descreveram uma forma de estudar a molécula de ADN recorrendo a lise celular com um detergente não-iónico de alta molaridade. Este tratamento promove a rutura das membranas, do citoplasma e do nucleoplasma e rompe os nucleossomas. Além disso, quase todas as histonas são solubilizadas pela alta concentração de sal. Quando ocorre o desenrolamento do “supercoiling” acrescenta-se o brometo de etilo que intercala com o ADN, e ao expandir os “loops” para fora do núcleo, forma-se um “halo”⁷⁰.

Em 1984, Ostling e Johanson introduziram a ideia de eletroforese de microgel como uma forma de medir quebras simples na cadeia de ADN onde as caudas incluem o ADN danificado. Estes autores empregaram um pH inferior a 10, demonstrando que não é necessário um pH elevado para detetar quebras na cadeia de ADN⁷¹. Singh e os colegas apresentaram em 1988 uma nova versão do ensaio de cometa, usando condições mais alcalinas durante a eletroforese e a microscopia de fluorescência para visualizar a migração dos fragmentos de ADN para a cauda, a partir das células individuais envolvidas em agarose. Se o ADN contiver quebras, o ADN relaxado e as extremidades livres são capazes de migrar em direção ao ânodo durante a eletroforese. No entanto, se o ADN não estiver danificado não ocorre migração devido à falta de extremidades livres e às grandes dimensões que os fragmentos apresentam⁷².

Os passos gerais do ensaio cometa padrão são constituídos pela preparação das lâminas com as células envolvidas em gel de agarose, lise celular, ADN “unwinding”, eletroforese, neutralização, desidratação, coloração e quantificação (

Figura 14)⁷³.

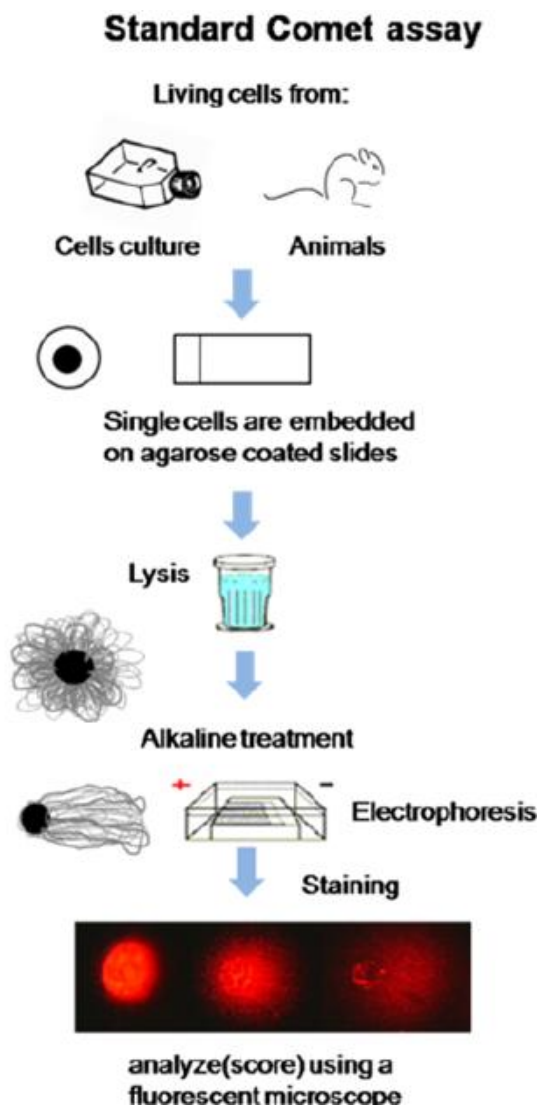


Figura 14 – Passos gerais do ensaio cometa padrão⁷⁴

Para a preparação das lâminas, os materiais mais comumente usados no ensaio são a lâmina de microscópio e o gel de agarose. A lâmina de microscópio deve ser previamente revestida por agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1%. As células são embebidas em agarose de ponto de fusão baixo (LMP) a 0.5%⁷⁵.

O passo de lise celular tem como objetivo promover a perturbação da membrana celular, do citoplasma e do nucleoplasma, ao passo que a desfragmentação dos nucleossomas e das histonas são obtidas pela saturação da concentração de sal. A solução de lise contém uma elevada concentração de sais e detergentes (2.5M NaCl, Na₂EDTA de 100 mm, 10 mm Tris Base, pH 10 mais 1% Triton de X-100)⁷³.

Durante a eletroforese (0.8V/cm e 300 mA) de 20 minutos, o ADN migra em direção ao ânodo, mas o movimento mais significativo apenas ocorre se as quebras estiverem presentes. Neste caso o ADN forma uma estrutura semelhante a um cometa, com uma cabeça (a região nuclear) e uma cauda que contém “loops” de ADN que se estenderam durante a eletroforese devido às quebras nesta molécula. A migração do ADN é dependente de vários parâmetros, tais como, concentração de agarose no gel, pH, temperatura, voltagem e a duração da eletroforese, mas principalmente do grau de quebras existentes na cadeia do ADN⁷³.

Após a eletroforese, neutraliza-se o gel através da sua submersão em água destilada. Depois da neutralização, a desidratação da agarose é conseguida através da utilização de etanol absoluto (à temperatura ambiente). As lâminas de agarose podem então ser coradas com o reagente fluorescente conveniente (p. ex. SYBRGold) para permitir a quantificação dos cometas⁷⁶.

1.6.2 Variantes do ensaio Cometa

A versão alcalina é a mais usada do ensaio cometa. Esta versão incluiu o tratamento das células com um tampão de eletroforese com um pH alcalino (>13), uma vez que este pH permitirá a separação das duas cadeias de ADN à volta da quebra, por desnaturação. Ao longo dos anos foram introduzidas modificações no pH que tornaram o ensaio cometa mais versátil⁷⁷.

Contudo, as quebras de cadeia simples (SBs) não são os danos mais preocupantes devido à sua rapidez de reparação, não sendo, por isso, considerados um dano significativamente letal ou mutagénico. Os locais AP são álcali-lábil e provavelmente são convertidos em quebras enquanto o ADN está no tampão de eletroforese com o pH alto. Além disso, podem observar-se quebras transitoriamente presentes quando as células apresentam os sistemas de reparação BER ou NER ativos, e portanto, um elevado nível de quebras no ensaio cometa pode indicar tanto um elevado número de danos, como uma elevada eficiência de reparação⁷⁸. O ensaio cometa em condições alcalinas reflete os danos existentes no ADN, como SBs e DSBs e os locais AP.

No ensaio cometa em condições neutras, os cometas surgem apenas quando ocorrem DSBs, o que pode ser confirmado quando as células sofrem um tratamento com o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), como referido por Olive e Banáth⁷⁹. Contudo, também foi demonstrado que as SB surgem também nestas condições⁶⁹.

Há outras modificações que tornam esta técnica mais sensível e permitem a medição de danos no ADN tais como pirimidinas e purinas oxidadas e alquilações. Várias enzimas específicas de reparação ADN podem ser usadas para reconhecer bases danificadas, introduzindo quebras no

local do dano. A endonuclease III (EndoIII), formamidopirimidina-ADN glicosilase (FPG) e AlkA são exemplos de enzimas que são incluídas depois do passo de lise e que permitem o aumento da sensibilidade e especificidade do ensaio cometa⁸⁰. A EndoIII, enzima de reparação de ADN da *Escherichia coli*, foi a primeira enzima usada para reconhecer e excluir pirimidinas oxidadas no ADN, deixando um local AP que se converte posteriormente em quebras⁸¹. O uso de enzimas de reparação foi especialmente útil para estimar os danos oxidativos induzidos no DNA de certos poluentes e drogas em vários modelos experimentais e em estudos de biomonitorização⁷⁴.

1.6.3 CoMeth assay

A nova modificação do ensaio cometa - o ensaio CoMeth – foi desenvolvida pelo nosso grupo e permite medir os danos alquilantes no ADN, do tipo O⁶MeG⁵⁰.

O ensaio inclui vários passos: em primeiro lugar, as células devem ser submetidas a um pré-tratamento com BG, permitindo a inibição total da proteína MGMT. Em segundo lugar, as células devem ser expostas a um agente alquilante e posteriormente avaliadas os danos no ADN. Em terceiro lugar, as células sem tratamento com BG devem ser incluídas como uma condição controlo. Os danos iniciais no ADN (se presentes) reparam-se num curto espaço de tempo, depois de alguns ciclos de replicação do ADN, na ausência do pré-tratamento com BG, os níveis de dano no ADN devem conter valores semelhantes ao controlo. Contudo, em células pré-tratadas com BG e com o agente alquilante, ocorre o aumento da introdução de danos no ADN com o tempo. A conversão de O⁶MeG em SBs corresponde à ativação do sistema de reparação MMR. A diferença entre os danos no ADN em células com ou sem pré-tratamento com BG reflete os níveis O⁶MeG induzidos pelo agente alquilante (

Figura 15). Este ensaio apenas pode ser usado em células com a MGMT-inativada e proeficientes no sistema MMR uma vez que desta forma o CoMeth vai permitir quantificar as lesões O⁶MeG depois da sua conversão em SBs. Deste modo, a acumulação de SBs torna-se citotóxica após alguns ciclos de replicação, e conseqüentemente, irão induzir morte celular por apoptose⁵⁰.

Em células com deficiências no sistema MMR, o ensaio CoMeth não irá detetar os danos O⁶MeG, que os danos no ADN não irão ser convertidos em SBs e por isso não serão detetados por este ensaio. Neste tipo de células o agente alquilante produzirá as lesões O⁶MeG e posteriormente irá ocorrer um emparelhamento incorreto, O⁶MeG:T, que não será reconhecido

eficazmente pelo sistema MMR. Consequentemente, estes erros não serão convertidos em SBs e o processo apoptótico não se desencadeará.

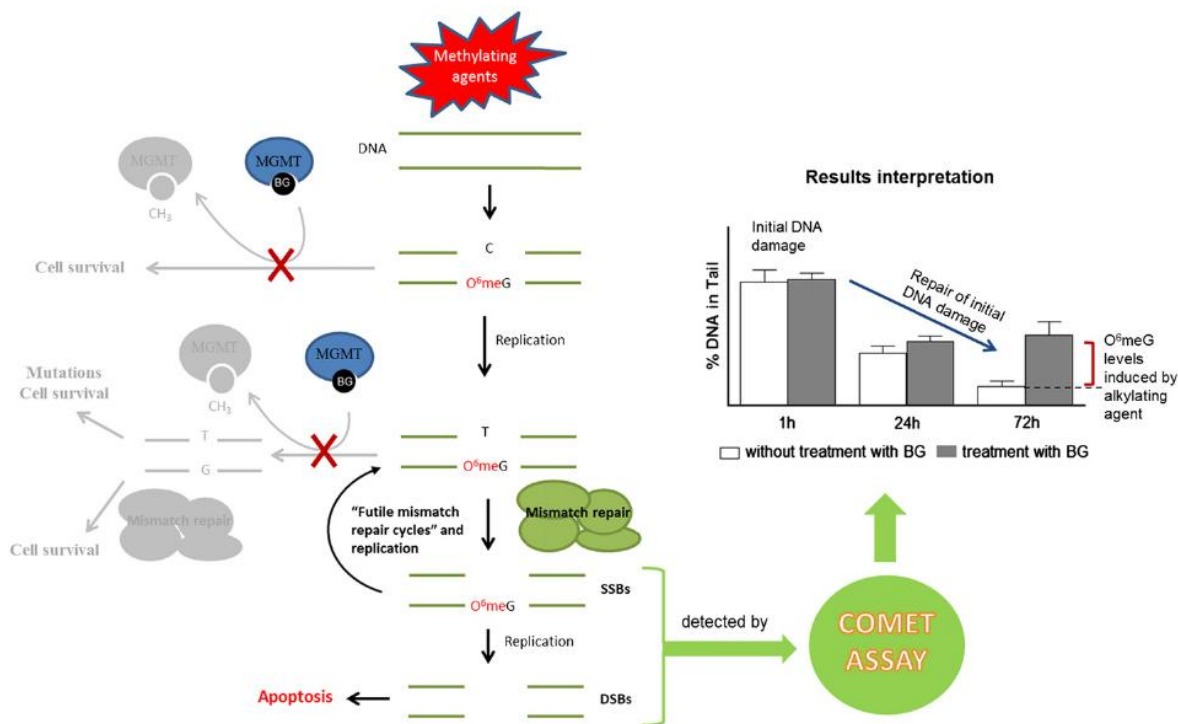


Figura 15 – Detecção de danos O^6MeG induzidos no ADN detetados pelo ensaio CoMeth⁸².

1.6.4 Quantificação dos Cometas

Os cometas têm uma forma complexa composta por uma cabeça e uma cauda, tendo variações na sua proporção. A cabeça é composta pelo ADN intato e a cauda por fragmentos provenientes das quebras do ADN. Quanto mais longa é a cauda de um cometa mais elevado é o número de quebras no ADN. A quantificação dos cometas pode obter-se por marcação visual ou automática baseada na análise de imagem⁷⁷.

A marcação visual usando um micrometro ocular permite a medição da migração de fragmentos de ADN como comprimento da cauda/imagem (mm). Alternativamente, depois do exame visual, os cometas podem ser classificados usando um esquema de classificação por categoria (por exemplo num esquema de classificação de 5 categorias, o 0 corresponde a nenhum dano e o 5 indica que quase todo o ADN está na cauda (corresponde a um maior número de quebras no DNA), baseado em comparações com imagens padrão⁷⁵.

Para a marcação automática baseada na análise de imagem existem vários programas que calculam os parâmetros desejados tais como: comprimento da cauda, a intensidade de

fluorescência na cabeça e na cauda do cometa (normalmente expresso como uma percentagem de ADN na cauda) e o momento da cauda que são os parâmetros mais utilizados neste ensaio⁷⁵.

A intensidade relativa da cauda é o parâmetro mais útil porque reflete uma relação linear entre a frequência das quebras (na teoria, de 0 a 100% de ADN na cauda). Este parâmetro também fornece uma indicação muito clara de qual é a organização do cometa. Ao contrário do momento da cauda (o produto do comprimento da cauda e intensidade da cauda) que não é linear com a dose e não permite visualizar a forma do cometa⁷³.

1.6.5 Vantagens do ensaio cometa

O ensaio cometa é um método muito versátil e económico, tendo assim uma elevada aplicabilidade no laboratório. Uma das razões da sua versatilidade passa pela sua aplicação em diferentes tipos de amostras celulares como células em cultura, células sanguíneas obtidas a partir de animais ou seres humanos, células provenientes da hemolinfa de moluscos e insetos, esperma, células obtidas pela desagregação de tecidos animais, leveduras, núcleos libertados do tecido de plantas; de uma forma geral, qualquer tipo de célula eucariótica que se possa obter como uma célula individualizada parece ser acessível à análise através do ensaio cometa⁶⁹. Para além disso é possível produzir cometas a partir de cromossomas isolados⁸³.

Outro ponto fundamental é a variedade de danos que deteta. Como mencionado anteriormente, o SCGE deteta SBs, DSBs e locais AP. Com algumas alterações neste ensaio, como por exemplo a digestão do ADN, depois do processo de lise celular, com uma enzima específica para um dano que se liga e remove a base formando um AP, assim é possível analisar outros tipos de danos através da sua conversão em quebras⁶⁹. O “ensaio de reparação celular” mede a capacidade das células de repararem as quebras induzidas por agentes danificadores do ADN. Neste ensaio, as células são tratadas por exemplo com um agente presente na dieta após a exposição a um agente danificador do ADN e posteriormente analisa-se a capacidade de reparação de danos induzidos no ADN.

O ensaio cometa é considerado económico pois necessita apenas de um reduzido número de células por amostra e de baixas quantidades da substância a ser testada. Adicionalmente, o material e as soluções usadas tem um baixo custo, sendo também considerado um método simples e rápido⁷³.

1.6.6 Limitações do ensaio cometa

Alguns dos passos deste ensaio são considerados críticos e devem ser realizados cuidadosamente para que os resultados sejam fiáveis, como o passo da preparação da lâmina no qual a quantidade de agarose e a densidade celular são essenciais para assegurar o êxito da análise. Elevadas densidades celulares podem resultar numa sobreposição de cometas, sobretudo quando existem níveis elevados de danos no ADN. Além disso, elevadas concentrações de agarose pode afetar a migração do ADN⁷⁶.

Embora seja possível o uso de diferentes tipos de amostras a utilização de células animais é mais simples. Para tecidos e outras fontes de células, tais como plantas são necessários procedimentos adicionais.

Alguns investigadores afirmam ainda que os cometas com cabeças de pequenas dimensões e caudas de grandes dimensões (muitas vezes designados de cometas 'hedgehog') indicam apoptose. Por definição a apoptose é irrevogável, por isso, aumentando o tempo de incubação o 'hedgehog' deveria continua a existir. Contudo, os cometas 'hedgehog' produzidos em células tratadas com H₂O₂ podem desaparecer caso as células sejam incubadas durante uma hora⁸⁴. Por isso, é um erro considerar 'hedgehog' como indicativo da apoptose ou de citotoxicidade⁶⁹.

1.6.7 Utilização do ensaio cometa na otimização da quimioterapia

Os danos e a reparação incorreta do ADN são eventos moleculares essenciais que conduzem à iniciação e à progressão do cancro. Muitos estudos têm demonstrado que os resultados observados pelo ensaio cometa fornecem informações essenciais acerca da genética de um determinado cancro, e que podem ser usados por um oncologista na determinação da melhor abordagem terapêutica⁸⁵.

Quando a terapia envolve um agente quimioterapêutico persiste sempre a dúvida de qual será a resposta do tumor ao tratamento, sendo a resistência o maior obstáculo para uma quimioterapia bem sucedida⁸⁵. Naturalmente, há algumas limitações na utilização do ensaio cometa como um instrumento para prever respostas ao tratamento quimioterapêutico, e uma das principais limitações passa por nem todos os compostos produzirem danos que possam ser detetados por este ensaio. A sensibilidade das células a agentes quimioterapêuticos está relacionada com a sua capacidade de reparar o dano. Vários medicamentos que são utilizadas habitualmente na quimioterapia, foram investigados usando o ensaio cometa numa variedade de

linhas celulares cancerígenas humanas *in vitro*, incluindo a cisplatina, tamoxifeno⁸⁶, mitomicina C⁸⁷, epirrubicina e mais recentemente drogas alquilantes.

Esta abordagem seria bastante promissora na clínica, dado que a utilização de células tumorais *in vitro* poderia possibilitar a previsão da citotoxicidade de um determinado composto quimioterapêutico em pacientes com cancro. Vários estudos *in vitro* com linhas celulares cancerígenas demonstram o valor do ensaio cometa como um instrumento para definir a capacidade citotóxica das drogas⁸⁵.

2. Objetivos

Na sociedade ocidental, o estilo de vida sedentário e a dieta pouco diversificada e hipercalórica são fatores de elevado risco para algumas doenças incluindo o cancro colorretal (CCR). O CCR é o terceiro tipo de cancro mais comum e o quarto com maior mortalidade. Contrariamente às mutações, o silenciamento epigenético pode ser revertido levando à reativação de genes supressores tumorais. O fenótipo metilador das ilhas CpG é uma via epigenética envolvida na carcinogénese do CCR. Geralmente, o CCR apresenta o promotor de alguns genes hipermetilados ocorrendo conseqüentemente o silenciamento da sua expressão. As metilações anormais do promotor do *MLH1* ocorrem frequentemente no CCR. A reativação da expressão do gene e, conseqüentemente, da proteína MLH1 pode ser obtida, em linhas celulares, através da desmetilação do promotor do *MLH1*. Esta abordagem poderá ser interessante não apenas para a prevenção do cancro mas também como terapia visto que os compostos com possíveis efeitos epigenéticos podem ser usados para reverter a resistência a agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento do CCR.

Neste contexto, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Demonstrar a aplicabilidade do ensaio CoMeth, que foi desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo, na avaliação de compostos com capacidade epigenética. Para além disso, para a validação do método usou-se um modelador desmetilante amplamente descrito, o 5-Aza, concomitantemente com o agente metilante, MNU, e a percentagem de ADN na cauda foi determinada;
- Investigar, através de qRT-PCR, o efeito nos níveis de expressão dos genes *MLH1* e *DNMT1*;
- Aplicar o ensaio CoMeth para determinar se o 5-Aza poderia melhorar a eficácia do composto quimioterapêutico 5-FU;
- Determinar, após validação do método CoMeth, se alguns compostos naturais, incluindo o EGCG, SO, AA, induzem efeitos epigenéticos semelhantes aos induzidos pelo composto 5-Aza;
- Avaliar se os dois compostos, 5-Aza e SO, poderiam ter efeitos moduladores no sistema de reparação do ADN BER.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e material vegetal

Compostos químicos:

- N-metil-N-nitrosourea (MNU), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- O⁶-benzilguanina (BG), 5-azacitidina (5-Aza), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Metoxiamina (Mx), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Metilmetanossulfonato (MMS), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- SYBR Gold (cora ácidos nucleicos), Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA
- 5-Fluorouracil (5-FU), Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Hoechst, Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA.

Reagentes da cultura de células:

- Tripsina-Ácido etilenodiaminotetracético (Trypsina-EDTA) solução, Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Meio RPMI - 1640 , Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Solução Antibiótico / antimicótico, Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EUA;
- Soro fetal bovino (FBS), Biochrom KG, Berlim, Alemanha;

Quantitativo em tempo real -PCR:

- iScript™ cADN Synthesis Kit and SsoFast EvaGreen supermix, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA;
- ARN extraction SV Total ARN Isolation System, Promega, Madison, WI, EUA;
- Primeres, STAB VIDA, Lda, Caparica, Portugal;
- GreenSafe Premium staining, NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal

Material vegetal:

- Extrato aquoso de *Salvia officinalis* (SO)

Equipamento e software

- Thermo Scientific Shandon Cytospin® 4 Cyto centrifuge;

- Comet IV analysis system, Perceptive Instruments Ltd, Haverhill, UK;
- Inverted fluorescence microscope, Olympus IX71;
- Thermocycler MyCycler and CFX96TM Real-Time system, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA;
- Graphpad Prism 4 Software, San Diego, CA, EUA.

Preparação do extrato aquoso de *Salvia officinalis*:

A *Salvia officinalis* (SO) foi recolhida entre 2001 e 2003 em Arouca, Portugal. O extrato aquoso foi preparado como descrito previamente por Lima *et al.* (2005)⁸⁸. O filtrado do extrato aquoso foi liofilizado e armazenado a -20°C.

3.2. Linhas celulares e condições de cultura

A linha celular RKO proveniente de carcinoma do cólon humano foi mantida em cultura numa incubadora com 5% de CO₂, 95% de humidade e a uma temperatura constante de 37 °C. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10mM HEPES, 0.1mM piruvato, 1% (v/v) solução antibiótico/ antimicótico e 6% (v/v) de soro fetal bovino (FBS). Quando as células atingiam uma confluência de 80%-90% na placa de cultura, a subcultura celular era realizada. As células RKO foram mantidas e cultivadas em frascos de cultura de tecidos de 25cm². Para efetuar subculturas e o plaqueamento, as células foram recolhidas utilizando uma solução de tripsina-EDTA, neutralizada pelo meio fresco, sendo posteriormente, ressuspensas, permitindo assim a suspensão das células. Em seguida, parte da suspensão foi colocada numa câmara de Neubauer, tendo sido estimada a concentração das células.

Dependendo da experiência, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços (MTT e ensaio cometa) ou em placas de 6 (RT-PCR e condensação nuclear) com 1 ou 2ml/poço, respetivamente, contendo uma densidade celular de 0.2 x 10⁵ células/mL.

As soluções stock de BG, MNU, 5-FU, Mx, MMS, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e as alíquotas foram mantidas a -20°C. Enquanto, os compostos testados foram adicionados ao meio de cultura com a concentração desejada, assegurando que a concentração de DMSO não excedia 0,5% (v/v).

3.3 Avaliação da viabilidade / proliferação celular pelo ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis) em cristais de formazan, permitindo deste modo estabelecer uma relação com o número de células viáveis⁸⁹.

Este ensaio foi realizado de forma a avaliar a toxicidade do agente quimioterapêutico, 5-FU. Para isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 5-FU (5µM, 10µM, 15µM, 20µM e 25µM) por 48h, e posteriormente incubadas com MTT (concentração final de 0.5 mg/ml) durante 1h a 37°C no escuro. Os cristais de formazan foram dissolvidos com a solução DMSO/etanol (1:1), sendo adicionados 200µL de solução a cada poço. De seguida, a absorvância foi medida num leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader – Molecular Devices) a um comprimento de onda de 570nm. No branco, usou-se apenas 200µL da solução DMSO/etanol. O número de células viáveis por cada poço foi estimado através da capacidade das células reduzirem o MTT usando a seguinte formula: **(% do controlo) = (Abs amostra / Abs controlo) × 100**. Os resultados foram expressos como percentagem relativa ao controlo.

A toxicidade do MNU, Mx, MMS, 5-Aza, BG, EGCG, AA e SO foi previamente determinada pelo grupo de investigação.

3.4 Ensaio CoMeth

Em estudos prévios, o grupo demonstrou uma nova modificação do ensaio cometa, o ensaio CoMeth⁵⁰, que permite medir os danos alquilantes no ADN, principalmente danos O⁶-MeG, que posteriormente são convertidos em SBs, em células com a MGMT inativada e com o MMR-proeficiente. Este ensaio apenas pode ser aplicado em células com o sistema de reparação mismatch funcional, pois estas células são capazes de induzir quebras na cadeia, reconhecidas pelo ensaio CoMeth. Em linha celulares com o *MLH1* silenciado por hipermetilação do promotor, os compostos desmetilantes revertem este efeito e o ensaio CoMeth é funcional. Por isso, usou-se um composto desmetilante conhecido, o 5-Aza, que reverte o silenciamento do *MLH1* na linha celular RKO.

Nesta experiência, para a desmetilação do *MLH1*, as células foram pré-incubadas o com 5-Aza durante 48h. Após este pré-tratamento, mudou-se o meio às células e adicionou-se 5-Aza e BG (100µM) durante 2h, para inativar completamente a MGMT. Depois, sem mudança de meio, foi adicionado o agente alquilante MNU (500µM), por 48h ou 72h, induzindo danos alquilantes no

ADN. Como controlo, as células foram também incubadas apenas com o 5-Aza, BG, MNU ou DMSO.

Além disso, para avaliar os danos no ADN usou-se o ensaio cometa padrão como descrito anteriormente. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. Depois do desprendimento das células com tripsina-EDTA foi adicionado meio para inativar a tripsina-EDTA. Para cada poço foi necessário, pelo menos, 2×10^4 células por condição. Esta suspensão de células foi ressuspendida em 1% de agarose LMP a 37 ° C. Esta solução, em seguida, foi colocada sobre a superfície de uma lâmina, pré-revestida com NMP 1%. Posteriormente, foi colocada durante 10min a 4°C, permitindo a solidificação da agarose, depois as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5M de NaCl, 100mM de Na₂EDTA, Tris base a 10mM, 1% Triton X-100, pH 10) durante pelo menos 1h a 4 °C. Durante este procedimento, as membranas, os citoplasmas e os constituintes solúveis, tal como as histonas foram removidos. Após 1h, as lâminas foram imersas em tampão de eletroforese (0.3M NaOH, 1mM Na₂EDTA a pH13) por 40 minutos a 4°C. Durante este tempo, o ADN irá relaxar o superenrolamento e permitirá a expansão do ADN.

Após 40 minutos, as lâminas foram submetidas á eletroforese por 20 minutos a 300mA, 21V e a 4°C. Na eletroforese, o ADN relaxado que contiver quebras irá migrar para o ânodo, formando estruturas similares a cometas. Nesta experiência, pode-se visualizar a cabeça (região nuclear) e a cauda que têm as quebras de ADN. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em água destilada por 5 minutos. A desidratação foi realizada usando etanol 100% por 5min para fixar.

Para visualizar os cometas, o ADN foi corado com SYBR Gold, permitindo a correlação entre a intensidade e a quantidade de quebras de ADN em comparação com o controlo. Usou-se o microscópio de fluorescência e o sistema de análise Comet IV, que analisa alguns parâmetros como a intensidade de cauda que é o resultado mais importante, sendo necessário analisar aproximadamente 50 cometas por amostra.

3.5 Quantitativo em tempo real – reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR)

A extração do ARN total foi realizada usando SV Total ARN extraction system, seguindo as indicações do protocolo. Brevemente, as células RKO foram plaqueadas em placas de cultura de tecidos (\emptyset 60 × 16 mm) a 2.5×10^5 células/mL e ficaram 48h para aderir. Posteriormente as células foram incubadas com 5-Aza e SO durante 48h e 72h. Após este período de incubação, foram lavadas com PBS 1x e adicionada tripsina-EDTA por 3 minutos a 37 ° C. Após este processo, a

suspensão de células foi recolhida. Estes procedimentos foram realizados na hotte. A lise celular foi realizada através da adição de 175µL de tampão de lise de ARN, suplementado com β-mercaptoetanol e o pellet foi disperso vortexando vigorosamente. Em seguida, 350µL do tampão de diluição de ARN foram adicionados e a suspensão foi misturada por inversão do tubo, antes da incubação a 70°C, durante 3min seguido da centrifugação a 14000g durante 10min à temperatura ambiente.

O lisado que visualmente era mais claro foi transferido para um novo eppendorf em que foram adicionados 200µL de etanol a 95%, esta mistura foi posteriormente transferida para uma coluna spin e centrifugada a 14000g por 1min. Subsequentemente, o tratamento com a solução de ADNse, preparado no momento da utilização (5µL 0.09M MgCl₂, 5µL enzima ADNse I e 40µL de tampão yellow cure por amostra), foi adicionada á coluna e mantido por 15 minutos. Por fim, este tratamento terminou com a utilização de uma solução stop de ADNse, seguido por uma centrifugação a 14000g por 1min e por dois passos de lavagem. Por fim, 100µL de água livre de nucleases foi introduzida na coluna e recuperada para um novo eppendorf através uma centrifugação 14000g por 2min. Para quantificar a pureza do ARN bem como a concentração usou-se um espectrofotómetro, o NanoDrop ND- 1000. Foram apenas consideradas as amostras com um rácio de Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ entre 1.8 e 2.1. As amostras de ARN foram guardadas a -80°C para uma posterior análise.

Para obter-se o cADN utilizou-se o iScript™ cADN Synthesis Kit. Em resumo, para cada amostra os seguintes reagentes foram adicionados a um volume total de 20µL por reação de: 1x iScript reaction mix, iScript transcritase reversa, água livre de nucleases, 1µg de ARN template. As amostras foram colocadas em tubos e incubadas três vezes durante 5 minutos a 25°C, de 60min a 42°C e, por último, de 5min a 85°C, num termociclador MyCycler. O cADN foi, em seguida, armazenado a -20 ° C.

Finalmente, foi necessário amplificar o gene em estudo e quantificar os níveis expressão. A análise da expressão do gene foi realizada utilizando SYBR Green technology (SsoFast EvaGreen supermix) e CFX96™ Real-Time system. O Sso Fast EvaGreen Supermix kit foi aplicado de acordo com o protocolo do fabricante. A solução da reação foi composta por 10µL do SsoFast EvaGreen supermix, mais 500nM de cada primer (forward and reverse) e 1µL de cADN template. Os primers estão descritos na tabela 1. As sequências de cada primer foram encontradas na literatura ou desenhadas por nós, e confirmadas usando Primer-Blast tool fornecido pelo NCBI. Cada amostra foi analisada em triplicado, e os resultados foram apresentados como a médias das 3 análises. A β-actina serviu como controlo positivo. O “fold induction” foi determinado usando o método

$\Delta\Delta Cq$ descrito pelo Bookout e Mangelsdorf (2003)⁹⁰. Os produtos do qRT-PCR foram analisado através de eletroforese num gel de agarose a 1%, e por fim corado com GreenSafe Premium.

Tabela 1 – Sequência dos primeres usados no qRT-PCR

Primers para RT-PCR	Forward primer	Reverse primer
<i>MLH1</i>	GTATTCAGTACACAATGCAGG	GCACATTCTGGGGACTGATTC
<i>DNMT1</i>	CCATTGGCTTGGAGATCAA	TCCAGAATGCACAAAGTACTGC
<i>B-actina</i>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT

3.6. Condensação nuclear

O ensaio de condensação nuclear foi realizado na linha celular RKO para verificar os efeitos do 5-FU e os efeitos combinados do 5-FU e do 5-Aza, bem como, os efeitos do 5-Aza, BG + MNU e 5-Aza + BG + MNU (estas condições foram usadas como condições controlo).

Nesta experiência, para a desmetilação do *MLH1*, as células foram pré-incubadas com 5-Aza durante 48h. Após este pré-tratamento, o meio das células foi mudado e adicionou-se 5-Aza e BG (100 μ M) durante 2h, inativando completamente a MGMT. Depois, sem mudança de meio, foi adicionado o agente alquilante MNU (500 μ M) e 5-FU (10 μ M), por 96h. Nesta experiência, o meio foi removido permitindo a recolha das células mortas e das restantes células que foram tratadas com a solução de tripsina-EDTA. Depois disto, os tubos de falcon de cada condição foram centrifugados a 2000rpm durante 10min, o meio foi rejeitado, e os resíduos depositados foram ressuspendido em 500 μ l de meio. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) durante aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, lavadas uma vez com PBS. Depois, as células foram fixadas na superfície de lâminas tratadas com polilisina usando um Shandon Cytospin a 500rpm durante 5 min. Em seguida, a fim de visualizar o ADN nuclear, as células foram coradas com 20 μ L da Hoechst, durante 10min no escuro. Este corante foi diluído em PBS (1:100) com a concentração final de 5 μ L/mL. Para determinar o número de células de cada condição utilizou-se um microscópio invertido com fonte de luz fluorescente (filtro de fluorescência DAPI). Por fim, contabilizou-se pelo menos 500 células, as células apoptóticas foram divididas pelo número total de células contadas, dado a percentagem de células apoptóticas.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada através do Graphpad Prism 4 Software. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experiências independentes. A análise de variância foi realizada pela ANOVA e utilizou-se o Bonferroni *post-test* para avaliar o nível de significância. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Aplicação do ensaio CoMeth para avaliar efeitos epigenéticos e para determinar a eficácia do agente quimioterapêutico 5-FU

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade do ensaio CoMeth na detecção de efeitos epigenéticos no ADN. Para tal, utilizou-se a versão CoMeth, uma adaptação do ensaio cometa, previamente desenvolvida por Ramos et al (2013)⁸². O silenciamento do gene *MLH1* por hipermetilação no promotor é uma das características da linha celular de cancro colo-rectal, RKO. Desta forma e tendo em conta este aspeto, pretendia-se testar a hipótese que o ensaio CoMeth poderia ser usado para avaliar os efeitos de um agente epigenético bem conhecido e caracterizado, o 5-Aza, na citotoxicidade induzida pelo MNU.

Para testar esta hipótese, as células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) durante 48h e incubadas 2h com BG (100 μ M). Posteriormente foram expostas ao MNU (500 μ M) durante 72h. O composto BG foi adicionado para inibir completamente a expressão da proteína MGMT. A concentração de BG e o tempo de incubação que inibe significativamente a MGMT foi 100 μ M e incubação de 2h (valores definidos em estudos prévios)⁸². Os resultados na Figura 16 mostram que o tratamento com 5-Aza + BG + MNU aumentou significativamente os danos no ADN, quando comparado com as células tratadas apenas com BG + MNU. As células tratadas com 5-Aza + BG + MNU mostraram um aumento significativo de danos no ADN comparativamente ao controlo. Como era demonstrado, os resultados apresentam um reduzido nível de danos no ADN tanto nas células não tratadas (controlo), como nas células tratadas apenas com 5-Aza e com MNU. O DMSO foi usado como controlo em todas as experiências.

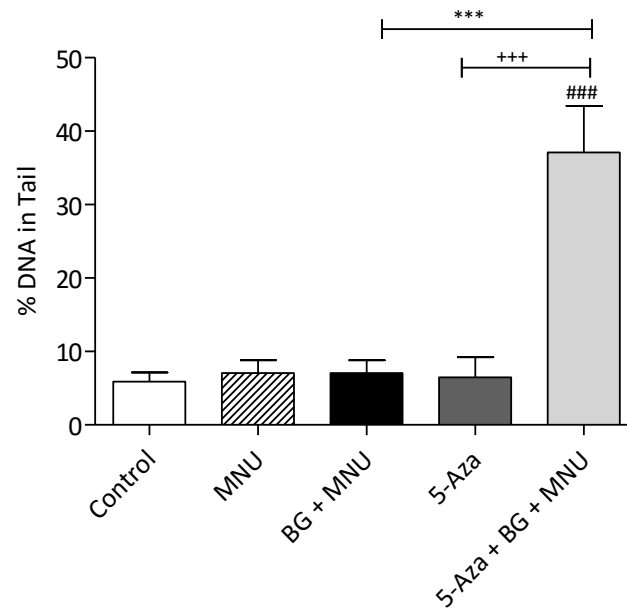


Figura 16 – Efeitos do composto desmetilante, 5-Aza, avaliados em células RKO pelo ensaio CoMeth nos danos no ADN induzidos por MNU. As células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) durante 48h, depois foi adicionado BG (100 μ M) por 2h seguido de uma incubação de 72h com MNU (500 μ M). Os valores correspondem à média \pm SEM de quatro experiências independentes. (###) 5-Aza + BG + MNU vs Controlo ($p < 0.0001$); (***) 5-Aza + BG + MNU vs BG + MNU ($p < 0.0001$); (+++) 5-Aza + BG + MNU vs 5-Aza ($p < 0.0001$). Para a análise estatística foi usado o teste One-way ANOVA seguido por Bonferroni *post-test*.

Tendo em conta estes resultados, decidiu-se explorar se os danos no ADN causados pelo 5-Aza + BG + MNU iriam induzir morte celular por apoptose, e para tal usou-se o ensaio de condensação nuclear após 96h de incubação. Por conseguinte, foram usadas as mesmas condições de incubação descritas na Figura 16. Os resultados obtidos para a morte celular estão apresentados na Figura 17 e estão de acordo com os resultados obtidos para os danos no ADN às 72h (Figura 16). No tratamento com 5-Aza + BG + MNU a percentagem de células apoptóticas aumentou significativamente, quando comparado com a condição BG + MNU (Figura 17). Os mesmos resultados foram observados quando se comparou o tratamento 5-Aza + BG + MNU com a condição 5-Aza. Para além disso, a condição 5-Aza + BG + MNU apresentou diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo. No entanto, não se observou um aumento significativo do número de células apoptóticas tanto para as células não tratadas (controlo) como para as células tratadas apenas com MNU.

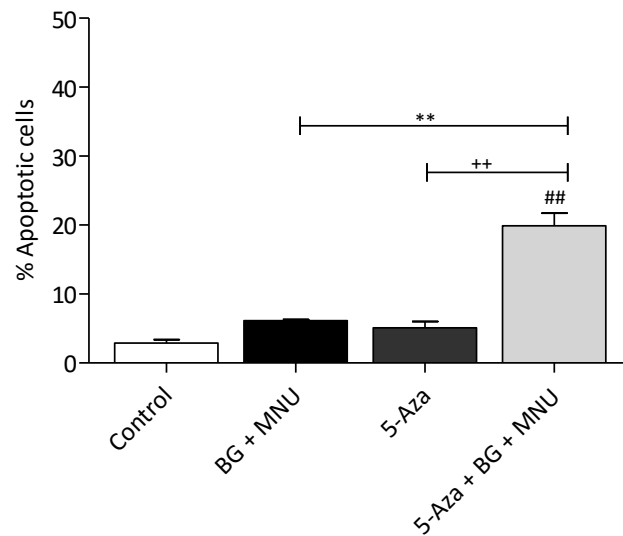


Figura 17 - Efeitos do composto desmetilante, 5-Aza na apoptose induzida pelo MNU em células RKO. As células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) durante 48h, depois foi adicionado BG (100 μ M) por 2h seguido de 96h de incubação com MNU (500 μ M). Os valores correspondem à média \pm SEM de quatro experiências independentes. (##) 5-Aza + BG + MNU vs Controlo ($p < 0.001$); (**) 5-Aza + BG + MNU vs BG + MNU ($p < 0.001$); (++) 5-Aza + BG + MNU vs 5-Aza ($p < 0.001$). Para a análise estatística foi usado o teste One-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test.

O 5-FU é frequentemente aplicado no tratamento de CCR, e desta forma neste trabalho pretendia-se usar a combinação do agente quimioterapêutico 5-FU com o 5-Aza, para determinar se os compostos desmetilantes poderiam melhorar a eficácia deste composto quimioterapêutico de referência. Para definir o IC₅₀ (a concentração que inibe 50% do crescimento das células) do 5-FU, nas células cancerígenas RKO, realizou-se o ensaio de redução do MTT. O IC₅₀ determinado para o 5-FU foi de 10 μ M (dados não apresentados). O ensaio CoMeth foi aplicado para avaliar os danos no ADN induzidos pelos dois tratamentos, o 5-FU e o 5-Aza + 5-FU, numa linha celular com o sistema de reparação MMR deficiente. As células foram incubadas com 5-FU durante 72h, e os resultados estão representados na Figura 18. As células com 5-Aza + 5-FU foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) por 48h e depois expostas por 72h a 5-FU (10 μ M). Ambos os tratamentos - 5-FU e 5-Aza + 5-FU – apresentam um aumento estatisticamente significativo de danos no ADN em relação ao controlo. Como observado na Figura 18, o aumento de danos no ADN que ocorreu na condição 5-Aza + 5-FU é superior comparativamente à condição 5-FU. Como era expectável, ao longo de todo o tempo experimental os danos no ADN na condição controlo permaneceram baixos.

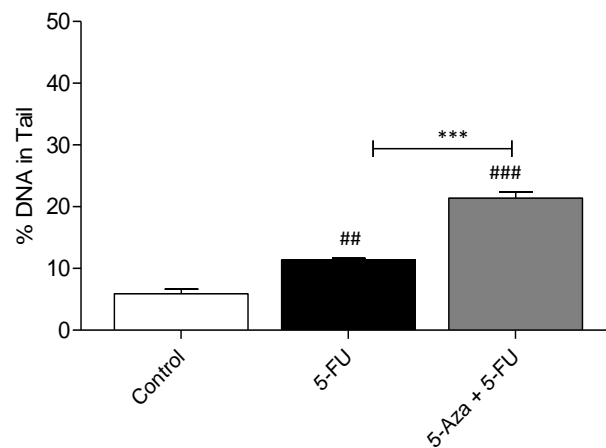


Figura 18 - Danos no ADN, medidos pelo ensaio CoMeth, com o tratamento com 5-FU e 5-Aza + 5-FU na linha celular RKO. As células tratadas com 5-FU foram incubadas com 10 μ M durante 48h. As células tratadas com 5-Aza + 5-FU foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) por 48 h seguido de uma incubação de 72h com 5-FU (10 μ M). Os valores correspondem à média \pm SEM de quatro experiências independentes. (###) 5-FU + 5-Aza vs Control ($p < 0.0001$); (##) 5-FU vs Control ($p < 0.001$); (***) 5-FU + 5-Aza vs 5-FU ($p < 0.0001$) Para a análise estatística foi usado o teste One-way ANOVA seguido por *Bonferroni post-test*.

Tendo em conta estes resultados, pretendeu-se determinar se os tratamentos 5-FU e 5-Aza + 5-FU iriam desencadear morte celular por apoptose. Para cumprir este propósito realizou-se o ensaio de condensação nuclear após 96h de incubação com 5-FU. Deste modo, para a condição 5-Aza + 5-FU as células foram pré-incubadas com 5-Aza por 48h e depois expostas por 96h a 5-FU. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 19 estão concordantes com os resultados obtidos, relativamente aos danos de ADN, para as 72h (Figura 18). Ambos os tratamentos - 5-FU e o 5-Aza + 5-FU – mostraram um aumento estatisticamente significativo de morte celular por apoptose em comparação com o controlo. A percentagem de células apoptóticas aumentou significativamente na condição 5-Aza + 5-FU em relação à condição 5-FU. Como era esperado, as células não tratadas (células controlo) apresentam poucos danos no ADN.

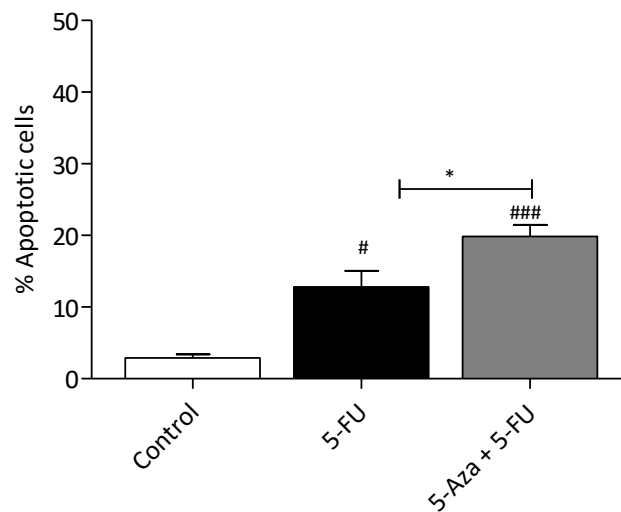


Figura 19 -Morte celular induzida por apoptose, medida pelo ensaio de condensação nuclear, após tratamento com 5-FU e com a combinação 5-Aza + 5-FU. Células RKO tratadas com 5-FU foram incubadas com a concentração de 10 μ M durante 96h. As células tratadas com 5-Aza + 5-FU foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) durante 48 h, seguida de uma incubação de 96h com 5-FU (10 μ M). Os valores são a média \pm SEM de quatro experiências independentes. (###) 5-FU + 5-Aza vs Controlo ($p < 0.0001$); (#) 5-FU vs Controlo ($p < 0.001$); (*) 5-FU + 5-Aza vs 5-FU ($p < 0.001$). Para a análise estatística foi usado o teste One-way ANOVA seguido por Bonferroni *post-test*.

As ADN metiltransferases (DNMT) são as principais enzimas envolvidas na metilação do ADN. No CCR, um dos mecanismos responsáveis pela metilação anormal do ADN é a sobre-expressão da DNMT1^{17;91}. Tendo em conta este facto, um dos objetivos do trabalho foi analisar se os compostos 5-Aza e SO alteram a expressão do gene *DNMT1* (responsável pela manutenção dos padrões de metilação existentes no ADN). Para testar esta hipótese, as células foram incubadas apenas com 5-Aza ou SO durante 48h e 72h, e, posteriormente foi realizado o ensaio de qRT-PCR. Neste ensaio foi usada a β -actina como controlo endógeno. Neste resultado preliminar (Figura 20), observou-se que as condições 5-Aza e o SO diminuem os níveis de expressão do gene *DNMT1* quando comparado com a condição controlo. Para além disso, foi possível observar que o SO induziu uma maior redução na expressão quando comparado com o 5-Aza. Em conclusão, estes resultados sugerem que o 5-Aza e o SO inibem a expressão do *DNMT1*.

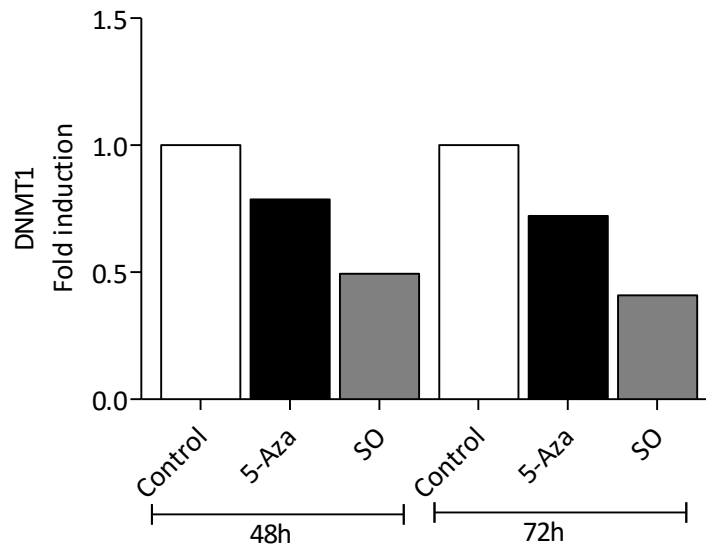


Figura 20 – Efeitos do 5-Aza ou SO na expressão do gene *DNMT1* determinados por qRT-PCR na linha celular cancerígena, RKO. As células foram incubadas com 5-Aza e SO durante 48h e 72h. Os resultados estão apresentados como “fold induction” relativamente ao controlo, usando a β -actina como controlo endógeno. Os valores representam apenas uma experiência.

Alguns investigadores têm descrito que o 5-Aza promove efetivamente a desmetilação do gene *MLH1*. Por isso nesta fase do trabalho experimental, pretendeu-se analisar se o 5-Aza alterava a expressão do gene *MLH1* na linha celular RKO através de qRT-PCR. Na Figura 21 é possível observar que as células na condição controlo não expressaram o gene *MLH1*. Por outro lado, quando as células são incubadas com 5-Aza apresentam um aumento da expressão do *MLH1* relativamente às células controlo. Adicionalmente realizou-se também esta experiência com células incubadas apenas com o composto natural SO, no entanto, não foram detetadas diferenças nos níveis de expressão do *MLH1* (resultados não apresentados).

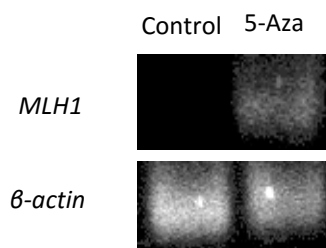


Figura 21 – Efeitos do composto 5-Aza na expressão do *hMLH1* usando qRT-PCR após 72h. Os produtos foram analisado através de eletroforese num gel de agarose a 1% e usando a β -actina como controlo endógeno. O gel corado com GreenSafe Premium e visualizado usando o Chemi Doc XRS detection system.

4.2. O ensaio CoMeth para o “screening” epigenético

No ensaio descrito anteriormente, demonstrou-se que a combinação 5-Aza + BG + MNU apresenta diferenças estatisticamente significativas comparativamente à incubação com BG + MNU (Figura 16). Além disso, este trabalho tinha como objetivo testar se outros compostos apresentam efeitos modulatórios do epigenoma similares ao 5-Aza. A Figura 22 representa o “screening” de compostos para verificar se estes têm efeitos desmetilantes e, para tal, foi usado o ensaio CoMeth. As condições experimentais definidas para atingir este objetivo foram as seguintes: as células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M), EGCG (4 μ M), SO (50 μ g/mL), AA (2mM) durante 48h sendo posteriormente adicionado BG (100 μ M) por 2h seguido de 72h com MNU (500 μ M). O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante bem conhecido e por esta razão o AA foi usado neste trabalho para compreender se os efeitos no ADN induzido pelo SO se devem às suas propriedades antioxidantes. Em comparação com o controlo, as combinações 5-Aza + BG + MNU, EGCG + BG + MNU, SO + BG + MNU e AA mostram diferenças estatisticamente significativas na percentagem de ADN na cauda (Figura 22). De facto, foi possível observar que nas condições com SO + BG + MNU e EGCG + BG + MNU os danos no ADN aumentaram significativamente comparativamente com a condição BG + MNU. Esta observação é semelhante aos efeitos causados no ADN pela condição 5-Aza + BG + MNU (Figura 18). Apesar disso, a incubação com AA + BG + MNU não apresentou um aumento significativo de danos no ADN em comparação com a condição BG + MNU. Como demonstrado na Figura 22, verificou-se que tanto as condições apenas com EGCG como com o SO isoladamente mostram diferenças estatisticamente significativas relativamente às combinações EGCG + BG + MNU e SO + BG + MNU, respetivamente. Como esperado, as células incubadas apenas com os compostos isolados MNU, BG, 5-Aza, EGCG, SO e AA não induzem danos no ADN. Além disso, os resultados permitem inferir que as condições EGCG + BG + MNU e SO + BG + MNU não apresentam diferenças estatisticamente significativas comparativamente à combinação 5-Aza + BG + MNU.

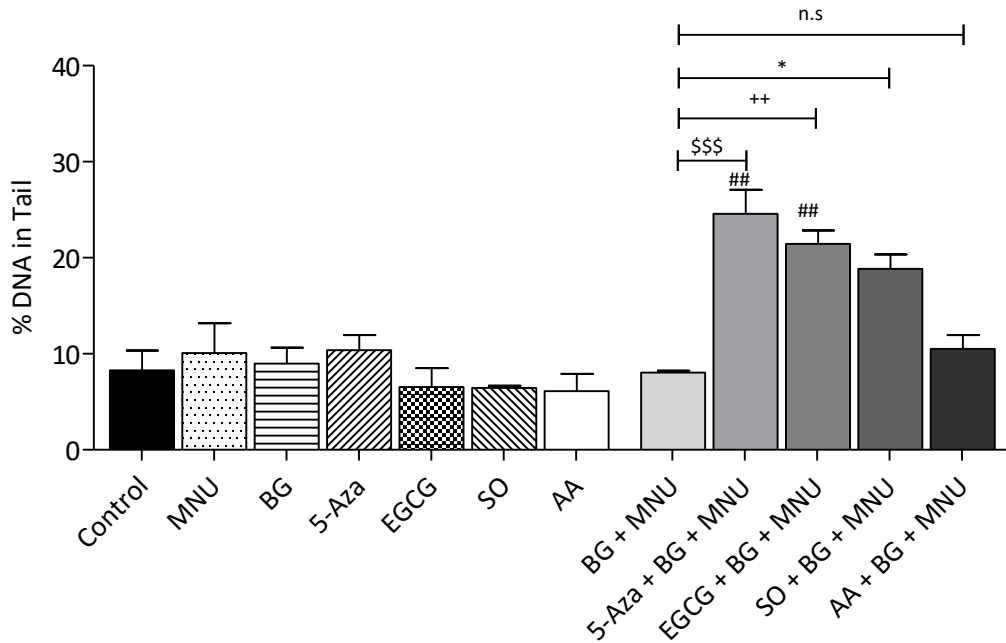


Figura 22 – “Screening” de compostos com possíveis efeitos desmetilantes usando o ensaio CoMeth. As células RKO foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M), EGCG (4 μ M), SO (50 μ g/mL), AA (2mM) por 48h e depois disto foi adicionado BG (100 μ M) por 2h seguido de 72h com MNU (500 μ M). Os valores correspondem à média \pm SEM de quatro experiências independentes. (##) 5-Aza + BG + MNU vs Controlo ($p < 0.001$); (##) EGCG + BG + MNU vs Controlo ($p < 0.001$); (\$\$\$) BG + MNU vs 5-Aza + BG + MNU ($p < 0.001$); (++) BG + MNU vs EGCG + BG + MNU ($p < 0.001$); (*) BG + MNU vs SO + BG + MNU ($p < 0.01$). A análise estatística foi feita usando One-way ANOVA seguido por *Bonferroni post-test*.

4.3. Os efeitos do 5-Aza e do SO no sistema de reparação BER

De forma a caracterizar os efeitos do 5-Aza e do SO no sistema de reparação BER, utilizamos o ensaio CoMeth na linha celular RKO em dois tempos distintos: 2h e 72h. O tempo de incubação de 2h permite observar vários tipos de danos no ADN causados pelo MNU, o agente alquilante, ao passo que às 72h é possível observar que os sistemas de reparação já repararam os erros permitindo apenas detetar os danos que são não reparados/persistentes.

Para esta experiência as células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) por 48h e de seguida foi adicionado o BG (100 μ M) e Mx (3mM) por 2h, por último foi feita uma incubação de 2h ou 72h com MNU (500 μ M). Para o período de 2h, observou-se danos no ADN significativamente diferentes em relação ao controlo para as condições MNU, BG + Mx + MNU, 5-Aza + BG + MNU, e 5-Aza + BG + Mx + MNU. Todavia, as incubações apenas com o composto Mx e com o 5-Aza não induziram danos significativos no ADN (não apresentado). Foram encontradas diferenças significativas entre o controlo e as condições BG + MNU, 5-Aza + BG + MNU e 5-Aza + BG + Mx + MNU após 72h de incubação. Em contrapartida, a condição controlo não diferiu estatisticamente das incubações Mx, MNU, 5-Aza e BG + MNU (não apresentado).

Como descrito anteriormente, na linha celular RKO a condição 5-Aza + BG + MNU aumentou significativamente os danos no ADN em relação a condição BG + MNU. Como consequência nesta parte do trabalho experimental, esta condição foi usada como controlo positivo do ensaio CoMeth. A incubação 5-Aza + BG + MNU aumentou significativamente os danos no ADN quando comparado com a condição 5-Aza, como é evidenciado na Figura 16. A percentagem de ADN na cauda do cometa foi elevada nas incubações às 2h com o MNU, contudo diminui significativamente com o tempo e nas incubações apenas com o MNU e com o BG + MNU. Por outro lado, os danos no ADN detetados às 2h nas condições 5-Aza + BG + MNU, BG + Mx + MNU e 5-Aza + BG + Mx + MNU permanecem elevados ao longo da experiência (72h) (Figura 23).

De forma a compreender se os danos induzidos no ADN após a incubação com 5-Aza + BG + MNU às 72h associou-se a esta condição um inibidor do sistema BER, o Mx. Este composto inibe a AP endonuclease 1 (APE1), resultando na acumulação de sítios AP, sendo este tipo de lesão detetada pelo ensaio CoMeth. Como era expectável, às 72h na condição BG + Mx + MNU os danos no ADN permanecem elevados e aumentam significativamente quando comparados com a condição BG + MNU. No entanto, quando comparamos a combinação 5-Aza + BG + Mx + MNU com a condição 5-Aza + BG + MNU não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas nos danos induzidos no ADN (Figura 23).

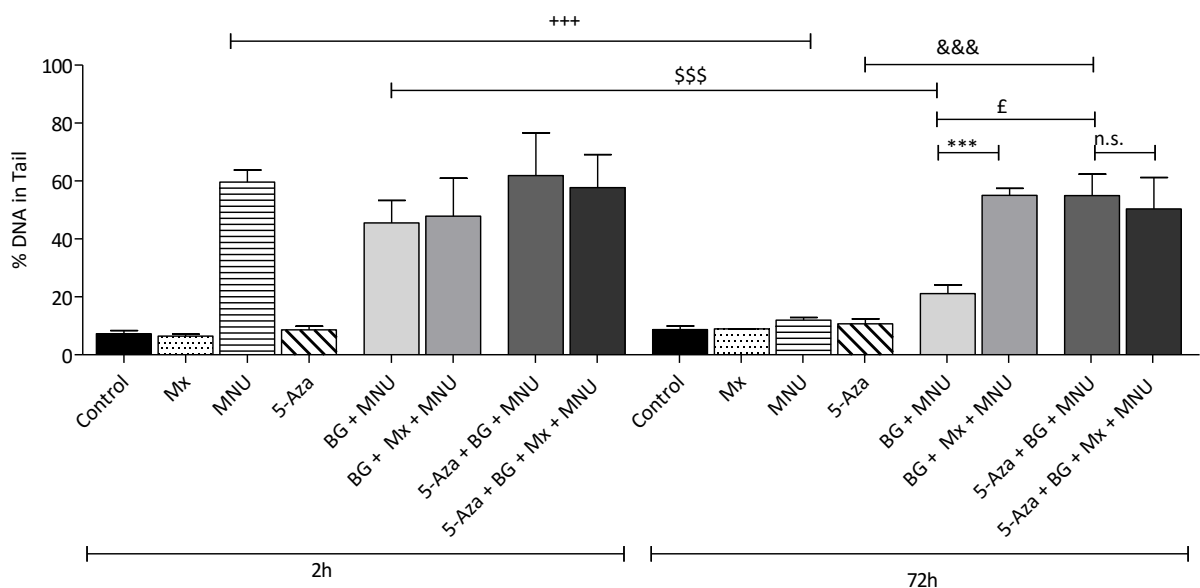


Figura 23 – Efeitos do 5-Aza no sistema BER monitorizados pelo ensaio CoMeth, na linha celular RKO. As células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) por 48h e depois disto foram adicionados BG (100 μ M) e Mx (3mM) por 2h seguido de 2h ou 72h com MNU (500 μ M). Os valores correspondem á média \pm SEM de quatro experiências independentes. (+++) MNU 2h vs MNU 72h ($p < 0.0001$); (\$\$\$) BG + MNU 2h vs BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (&&&) 5-Aza 72h vs 5-Aza + BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (£) BG + MNU 72h vs 5-Aza + BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (***) BG + Mx + MNU 72h vs BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (n.s.) 5-Aza + BG + Mx + MNU 72h vs 5-Aza + BG + MNU 72h ($p > 0.05$).

72h ($p < 0.01$); (***) BG + MNU + Mx 72h vs BG + MNU 72h ($p < 0.0001$). A análise estatística foi feita usando One-way ANOVA seguido por *Bonferroni post-test*.

Como é possível observar, os resultados obtidos (Figura 22) sugerem que o composto SO pode ter possíveis efeitos como agente desmetilante. Deste modo, decidiu-se explorar se este composto poderia ter efeitos no sistema BER. Para tal, foi usado o mesmo desenho experimental que foi aplicado para determinar o efeito do 5-Aza no sistema BER: pré-incubação com SO por 48h, seguido de uma incubação com BG e Mx e, por fim, incubação das células por 2h e 72h com o agente alquilante MNU. Mais uma vez, o ensaio CoMeth foi o método escolhido para avaliar os efeitos do SO no sistema BER (Figura 24).

De acordo com estes resultados, o efeito do SO no sistema BER foi similar ao 5-Aza e Mx, visto que na condição SO + BG + Mx + MNU não foram observadas diferenças estaticamente significativas na percentagem de ADN na cauda em relação à condição SO + BG + MNU. Para além disso, os restantes resultados estão de acordo com apresentados na Figura 23, como por exemplo, no controlo os danos induzidos no ADN permaneceram baixos. É importante salientar que ao longo do tempo os danos induzidos no ADN diminuíram significativamente, com exceção das condições SO + BG + MNU, BG + Mx + MNU e SO + BG + Mx + MNU em que os níveis de danos induzidos no ADN se mantiveram elevados (Figura 24).

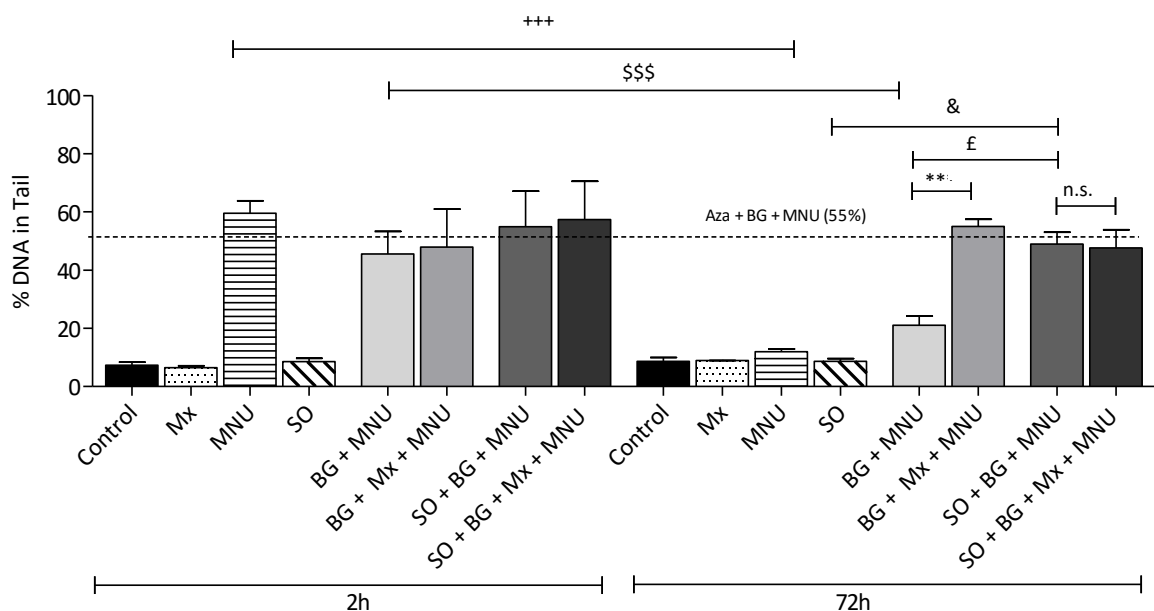


Figura 24 - Efeitos do SO no sistema de reparação BER monitorizados pelo ensaio CoMeth, na linha celular RKO. As células foram pré-incubadas com SO (50 μ g/mL) por 48h e depois foi adicionado BG (100 μ M) e Mx (3mM) por 2h, seguido de 2h ou 72h com MNU

(500 μ M). Os valores correspondem à média \pm SEM de quatro experiências independentes. (+++) MNU 2h vs MNU 72h ($p < 0.0001$); (\$\$\$) BG + MNU 2h vs BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (***) BG + MNU 72h vs BG + MNU + Mx 72h ($p < 0.0001$); (&) SO 72h vs SO + BG + MNU 72h ($p < 0.0001$); (£) BG + MNU 72h vs SO + BG + MNU 72h ($p < 0.01$).). A análise estatística foi feita usando One-way ANOVA seguido por Bonferroni *post-test*.

5. Discussão e Conclusão

Atualmente a epigenética é definida como o estudo de mudanças hereditárias na expressão de genes que ocorrem independentemente de mudanças na sequência primária do ADN³¹. Os estádios iniciais de desenvolvimento são mais suscetíveis a alterações epigenéticas²⁰. Vários mecanismos de alterações epigenéticas têm sido descritos, sendo que um dos mais estudados é a metilação do ADN. A interrupção da maquinaria epigenética desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do cancro. Os tumores frequentemente exibem hipometilação global, hipermetilação das ilhas CpG de alguns genes e alterações no genoma. Estas anomalias estão associadas com mudanças generalizadas na expressão dos genes, e consequentemente contribuem para a formação de tumores através da ativação de oncogenes e repressão de genes supressores tumorais⁹².

Estudos recentes de sequenciação de nova geração em tumores primários revelaram que uma elevada frequência de mutações somáticas em reguladores epigenéticos e histonas podem ser a chave para algumas modificações que se observam no cancro. A desregulação epigenética em algumas doenças levou ao desenvolvimento de novos medicamentos-alvo para estas vias⁹³.

O ensaio cometa padrão é amplamente usado para detetar danos no ADN, no entanto ainda não foi descrito -que este ensaio consiga detetar efeitos epigenéticos no ADN. O presente estudo, teve como objetivo principal demonstrar que o ensaio CoMeth, uma adaptação do ensaio cometa, pode ser usado para detetar efeitos epigenéticos e de reexpressão do gene MLH1.

O ensaio CoMeth desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo⁵⁰ baseia-se na inibição da MGMT usando um pseudosubstrato, o BG, e na exposição das células a um composto alquilante (por exemplo, o MNU) que induz maioritariamente danos O⁶MeG. Posteriormente, estes danos metilantes são reconhecidos pelo sistema MMR funcional iniciando-se a reparação da lesão através da introdução de quebras na cadeia de ADN. Estas quebras são posteriormente detetadas pelo ensaio CoMeth.

A MGMT têm um papel relevante na resposta a agentes quimioterapêuticos alquilantes, uma vez que é o primeiro sistema de reparação a ser ativado para reparar os danos O⁶MeG induzidos por estes agentes. Se esta enzima não reparar todas as lesões O⁶MeG induzidas pelos agentes metilantes, vai ocorrer um emparelhamento incorreto com uma timina formando O⁶MeG:T, nas células em divisão. Este novo dano é reconhecido pelas proteínas do sistema de reparação MMR, que irá promover a remoção da base azotada timina. No entanto, se os danos O⁶MeG permanecerem no ADN, o sistema MMR vai ser continuamente ativado, originando ciclos fúteis de reparação que levam ao desenvolvimento de SBs. A acumulação de SBs poderá tornar-se

citotóxica após alguns ciclos de replicação e, eventualmente, poderá induzir morte celular por apoptose.

Como descrito anteriormente⁵⁰, o conceito do ensaio CoMeth passa pela inibição da MGMT e pela utilização de uma linha com o sistema de MMR proeficiente. Desta forma, na linha celular RKO utilizada neste trabalho experimental apenas se irão formar cometas em resposta ao MNU quando o MMR estiver funcional. Em linhas celulares com o MMR disfuncional, o ensaio CoMeth não irá detetar danos O⁶MeG visto que estes danos não são transformados em SBs e, consequentemente não irão induzir cometas. Assim, foi usado um agente desmetilante (5-Aza) para reverter o silenciamento do gene *MLH1*, o que se traduzirá no aumento de quebras nas cadeias de ADN.

O 5-azacitidina (azacitidina, Vidaza™) é um análogo do nucleósido pirimidina citosina. O 5-Aza tem dois principais mecanismos de ação antineoplásica: a citotoxicidade, que resulta na incorporação no RNA e no ADN e a hipometilação do ADN. A indução de hipometilação no ADN requer uma dose mais baixa de 5-Aza comparativamente com necessária para induzir citotoxicidade⁹⁴.

Após a internalização pelas células, o 5-Aza é fosforilado a 5-azacitidina monofosfato pela uridina-citidina cinase e, em seguida, convertido para difosfato e trifosfato pela monofosfato pirimidina e difosfato cinases, respetivamente. A 5-azacitidina trifosfato é incorporada no RNA, interrompendo o metabolismo do RNA no núcleo e inibindo a síntese proteica. O 5-azacitidina difosfato é reduzida pela redutase ribonucleótido para 5-aza-desoxicitidina difosfato, que é posteriormente fosforilada por cinases nucleósido difosfato para 5-aza-desoxicitidina trifosfato, que é incorporada no ADN, resultando numa inibição da sua síntese⁹⁵. O 5-Aza inibe a metilação do ADN pela ligação estequiométrica com a DNMT resultando na hipometilação do ADN. O 5-Aza causa desmetilação e reativação da expressão de genes silenciados por hipermetilação. A descoberta da hipermetilação do gene *p15^{INK4B}* no síndrome de mielodisplasia (MDS) sugeriu que o 5-Aza é eficaz no tratamento deste síndrome^{94,95}.

O 5-Aza é uma das poucas terapias epigenéticas aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration), e é usada como tratamento padrão no MDS. O tratamento com 5-Aza, mesmo em pacientes com um mau prognóstico, melhora a sua qualidade de vida e aumenta o tempo de sobrevida (taxa de resposta que varia entre os 30-60%). Vários estudos clínicos têm sido conduzidos em casos de leucemia mieloide aguda (AML) sendo que recentemente um estudo clínico de fase III com 5-Aza em pacientes idosos com AML mostrou um aumento global da sobrevida em comparação com o tratamento convencional⁹³.

Alguns estudos demonstram que as ilhas CpG não metiladas associadas a uma variedade de genes se tornam parcialmente ou completamente metiladas em tumores, podendo os genes serem reativados através do 5-Aza, como por exemplo *MLH1*⁹⁶.

Como mencionado anteriormente, o 5-Aza é um composto epigenético que inibe a *DNMT*⁹⁷, e para verificar este facto realizou-se o ensaio qRT-PCR. Com este método demonstrou-se que nas células incubadas com 5-Aza, os níveis de expressão de *DNMT1* diminuíram comparativamente à condição controlo. Os resultados mostram que não só o 5-Aza mas também o SO inibem a expressão do *DNMT1*. Para além disso, com este método demonstrou-se que o 5-Aza pode reativar a expressão do *MLH1*, dado que as células do controlo não expressam o gene *MLH1*. Os resultados obtidos não só confirmam que o 5-Aza é um agente epigenético e, por isso reativa a expressão do *MHL1*, como também suportam a hipótese de que o ensaio CoMeth pode ser usado para avaliar funcionalmente os efeitos epigenéticos sobre genes de reparação do ADN (MMR).

A instabilidade dos microssatélites (MSI) reflete a existências de deficiências no MMR e é frequentemente observada em diversos tipos de cancro, principalmente no cancro colo-rectal, onde a presença de MSI pode ser usada como marcador específico de um subtipo de tumor bem como ter valor preditivo para a falta de sensibilidade para a quimioterapia⁹⁸.

O silenciamento do gene *hMLH1* por metilação do ADN é uma característica que tem sido reportada numa variedade de cancros esporádicos com MSI⁹⁹. Irving and Hall (2001)¹⁰⁰ demonstraram que tumores primários e linhas celulares que contenham defeitos no MMR são resistentes a uma ampla variedade de agentes terapêuticos, como os agentes metilantes [Temozolomida™; procabazina; N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG); N-metil-N-nitrosourea (MNU)], antimetabolitos (6-tioguanina; mercaptopurina) e compostos de platina (cisplatina, carboplatina)¹⁰⁰. Por conseguinte, justifica-se o facto de o MNU (agente quimioterapêutico usado na clínica) não induzir um aumento significativo de danos no ADN em células RKO, comparado com as células controlo.

Para verificar se os danos no ADN detetados desencadearam morte celular por apoptose realizou-se o ensaio de condensação nuclear. Confirmou-se que os danos obtidos, anteriormente no ensaio CoMeth, na condição 5-Aza + BG + MNU induziram morte celular por apoptose, uma vez que foi observado um aumento significativo da percentagem de células apoptóticas quando comparado com a percentagem de apoptose em células incubadas com BG + MNU (Figura 17).

A supressão da apoptose durante a carcinogénese tem um papel central no desenvolvimento e progressão do cancro e na resistência à terapia¹⁰¹. Existem vários mecanismos

moleculares que são usados pelas células tumorais para a supressão da apoptose incluindo o silenciamento de genes do sistema MMR. Por isso, é crucial reverter este processo através, por exemplo, do uso de compostos epigenéticos ou da sua combinação com outros tratamentos.

No tratamento de CCR, o 5-FU é frequentemente usado. No entanto, em alguns estudos^{102,103} tem sido reportado resistência à quimioterapia no tratamento de tumores em que o sistema MMR se encontra disfuncional. Este facto foi observado em células RKO tratadas com 5-FU, uma vez que os danos no ADN permaneceram baixos e não ocorreu indução de apoptose. Por outro lado, observou-se um aumento significativo de danos na condição 5-Aza + 5-FU comparativamente com a condição 5-FU. No que diz respeito à percentagem de células apoptóticas, esta também aumentou significativamente com o 5-Aza + 5-FU em relação à condição 5-FU.

O grupo de investigação de Meyers foi o primeiro a reportar que as células com o MMR disfuncional são resistentes ao 5-FU e 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdUrd)¹⁰⁴. Este grupo demonstrou que células HCT116 que têm o *MLH1* disfuncional foram 20 vezes mais resistentes ao 5-FU. Da mesma forma, células CT-5 de murino com o *MLH1* disfuncional foram 3 vezes mais resistente ao FdUrd do que células com o *MLH1* funcional¹⁰³. Outro estudo demonstrou que pacientes com CCR nos estágios II e III beneficiaram da quimioterapia adjuvante com 5-FU apenas quando o tumor tinha o MMR funcional¹⁰⁵. Um estudo recente confirmou os estudos retrospectivos que a quimioterapia adjuvante com 5-FU pode não ser útil nos estágios II e III de CCR com MSI^{103,106,107}. Os estudos referidos anteriormente são suportados pelos resultados obtidos neste trabalho uma vez que se confirma que as linhas celulares com deficiência no MMR são menos sensíveis ao tratamento com 5-FU.

Os inibidores da DNMT mostram ter uma atividade antitumoral no CCR em experiências *in vitro* e *in vivo*. Todavia em tumores sólidos, incluindo no CCR em humanos, foi relatado uma menor eficácia antitumoral usando modificadores epigenéticos. Além disso, já foi relatado que os mecanismos epigenéticos desencadeiam resistência a compostos anticancerígenos usados convencionalmente no tratamento de CCR. Assim, a quimioterapia combinada com modificadores epigenéticos pode ser uma via para a reversão da quimioresistência. Os inibidores de DNMT e de HDAC foram aplicados em ensaios pré-clínicos e clínicos com o intuito de desenvolver uma forma de superar a quimioresistência em tumores sólidos, incluindo no CCR. Por exemplo, foi relatado que inibidores da DNMT, como a decitabina e a 5-Aza, mostraram efeitos sinérgicos sobre a citotoxicidade induzida por fármacos anticancerígenos, tais como o 5-FU, irinotecano ou oxaliplatina em linhas celulares de CCR⁹⁸.

Os compostos naturais demonstram ter um papel importante na prevenção do cancro, bem como no seu tratamento, através da modulação de vias de sinalização, mas também na prevenção ou reparação de danos no ADN.

O nosso grupo de investigação já demonstrou alguns efeitos da dieta, nomeadamente na prevenção do CCR ao nível da proteção do ADN e/ou na indução da reparação de danos, bem como efeitos sobre alvos moleculares de proliferação e de morte celular. Estes estudos demonstraram, por exemplo que o ácido ursólico e a luteolina protegem o ADN dos danos oxidativos e aumentam a atividade de reparação do ADN¹⁰⁸. Estes compostos também apresentaram efeitos antiproliferativos e proapoptóticos¹⁰⁹. Adicionalmente, os extratos aquosos da planta do género *Salvia* mostrou potencial quimiopreventivo devido à estimulação da reparação do ADN e proteção das células contra os danos oxidativos no ADN, nas linhas celulares Caco-2¹¹⁰, CO115 e HCT15¹⁰⁸, e à diminuição da formação de criptas aberrantes *loci* num modelo *in vivo* de CCR¹¹¹. Outro estudo revelou também que este extrato induz apoptose e inibe a proliferação por interferir com a via de sinalização MAPK¹¹².

Desta forma e tendo em conta estes factos, no presente estudo, pretendeu-se encontrar compostos naturais que apresentem potencialmente efeitos modulatórios epigenéticos similares ao composto 5-Aza.

Os polifenóis são uma vasta família de produtos naturais estruturalmente caracterizadas pela presença de pelo menos dois anéis fenólicos com propriedades biológicas interessantes. Os polifenóis estão amplamente distribuídos nas plantas e abundantes em alimentos e bebidas comuns, e foram descritos por desempenhar papéis importantes na prevenção e no tratamento de várias doenças, incluindo o cancro, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas. Os compostos polifenólicos mostraram que podem interferir com uma grande variedade de macromoléculas, algumas das quais envolvidas na regulação de processos epigenéticos³³.

Os principais polifenóis do chá verde incluem (-) - epicatequina (EC), (-) - epicatequina-3-galato (ECG), (-) - epigallocatequina (EGC), e (-) - epigallocatequina-3-galato (EGCG)¹¹³. O EGCG foi descrito como sendo inibidor da DNMT, visto que alguns estudos recentes demonstraram que este composto modula a epigenética através da inibição da metilação do ADN¹¹⁴⁻¹¹⁶. O EGCG foi utilizado no presente estudo, e quando as células RKO foram incubadas com EGCG + BG + MNU a percentagem de ADN na cauda aumentou significativamente no ensaio CoMeth em comparação com a condição BG + MNU. Estes resultados estão de acordo com o que tem sido descrito, uma vez que o ECGC tem um efeito desmetilante semelhante ao composto 5-Aza (Figura 22) dado que aumentou a eficácia do agente quimioterapêutico alquilante utilizado (MNU).

Inúmeras atividades anticancerígenas e alvos moleculares do EGCG têm sido bem descritas. Em 2003, Fang *et al.*, descreveu a influência do EGCG na inibição da DNMT e na reativação de genes silenciados por metilação incluindo o *p16^{INK4a}* e o *hMLH1*, em células HT29 do colon e PC-3 do cancro da próstata¹¹⁴. Estudos recentes revelaram que o EGCG tem efeitos antiproliferativos, em parte, através da modulação da atividade de vários recetores tirosina-cinases e dos seus múltiplos percursos de sinalização a jusante, incluindo a via de sinalização PI3K/Akt, que controla a expressão de múltiplos genes alvo que participam na proliferação celular e na apoptose. Além disso, o EGCG ativa sinais de stress, tal como a cinase c-Jun N-terminal (JNK) e a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), e induz a apoptose em linhas celulares de CCR. O EGCG também tem sido associado à inibição do crescimento de células humanas de CCR¹¹⁷.

Neste estudo também se usou o extrato aquoso de *Salvia officinalis* (SO), para verificar se este composto natural também têm efeitos epigenéticos. O SO foi descrito como citotóxico para as células tumorais, incluindo as células C32 melanoma amelanótica, células renais de adenocarcinoma ACHN, carcinoma da próstata hormono-dependente LNCaP, e para a linha celular de cancro da mama MCF-7¹¹⁸. O extrato *S. officinalis* também inibe a proliferação e induz a apoptose em células do colon HCT115 e CO115¹¹². Adicionalmente, o extrato de SO mostrou inibir a angiogénese *in vitro* e *in vivo*, sugerindo ser um candidato útil para a terapia e prevenção de distúrbios relacionadas com angiogénese¹¹⁹. Para além disso, foi reportado que os três diterpenóides quinonas (royleanone, horminone e acetylhorminone) isolados a partir das raízes da SO induziram danos no ADN e apoptose em células Caco-2 do carcinoma do cólon e em células HepG2 de hepatoma¹¹⁷.

Portanto, neste estudo colocou-se a hipótese do extrato SO poder apresentar efeitos epigenéticos, uma vez que na Figura 22 foi possível observar que o tratamento com SO + BG + MNU aumentou significativamente os danos no ADN em comparação com a condição BG + MNU. Além disso, na Figura 20, observou-se que o SO inibiu a expressão do gene DNMT1. No entanto, não tem um efeito sobre a expressão *hMLH1* como seria de esperar, sendo um composto epigenético como o 5-Aza.

Poderão os efeitos do SO dever-se às suas propriedades antioxidantes? Para responder a esta pergunta utilizou-se a vitamina C (ácido ascórbico; AA) para comparar os seus efeitos com os do SO. A vitamina C pode ser adquirida a partir de fontes exógenas, nomeadamente frutos e legumes frescos, e pode encontra-se disponível na sua forma reduzida (ácido ascórbico; AA) e na sua forma oxidada (ácido desidroascórbico; DHA)¹²⁰.

A ligação entre a vitamina C e o cancro é controversa. Como antioxidante, o principal papel da vitamina C é neutralizar os radicais livre através da doação de um par de eletrões para induzir estabilidade. Tendo a vitamina C capacidade de redução torna-se, portanto, excelente para diminuir o stress oxidativo. Contudo, a vitamina C pode atuar como molécula prooxidante, promovendo a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), afetando a viabilidade celular. Recentemente, o efeito prooxidante do AA foi considerado o mecanismo responsável pelas propriedades anticarcinogénicas da vitamina C. Acrescendo a todas estas evidências, a maior parte das células tumorais não consegue transportar o AA diretamente para o seu interior, daí as células tumorais obterem a vitamina C na forma oxidada, DHA¹²⁰.

Comparando os efeitos da condição AA + BG + MNU com o tratamento BG + MNU (Figura 22) não houve diferenças significativas nos danos do ADN. Consequentemente, a capacidade redox do AA não parece induzir o aumento de danos no ADN neste ensaio. Uma vez que a combinação de SO + BG + MNU mostra diferenças significativas em relação à condição BG + MNU, isto sugere que o SO pode estar a provocar danos no ADN por outro mecanismo que não o de interferir com o equilíbrio redox.

O AA foi descrito como inibidor do crescimento de células tumorais. Pathi *et al.*, em 2001, demonstrou que doses farmacológicas de ácido ascórbico (<5 mM) diminuem a proliferação celular em células de CCR RKO e SW480 e induzem apoptose e necrose. Mamede *et al.*, em 2012, mostrou que a forma reduzida da vitamina C induz efeitos antiproliferativos e citotóxicos na linha celular de adenocarcinoma colo-rectal humano (WiDr) *in vitro* e que o tratamento com AA reduz a taxa de crescimento do tumor *in vivo*¹²⁰. Nestes estudos foi analisada a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e, ambos os estudos revelaram que a presença de ROS era elevada e que a citotoxicidade estava dependente dos seus níveis. Recentemente, Yun e os seus colaboradores reportaram que a viabilidade de células de CCR com mutações no KRAS ou BRAF era afetada quando estas células eram expostas a elevados níveis de vitamina C. Este efeito era causado pelo aumento da internalização da forma oxidada da vitamina C, DHA, pela via do transportador de glucose 1 (GLUT1)¹²¹, levando ao stress oxidativo. Estes resultados forneceram uma base para explorar a utilização terapêutica da vitamina C nos CCRs com mutações KRAS ou BRAF.

Os efeitos na reparação do ADN por influência do sistema BER também foram estudados como possível causa para a atividade do 5-Aza e do SO. A manipulação do sistema BER é outra forma de melhorar a eficácia da quimioterapia. Uma das principais proteínas da via BER é a PARP. A expressão/atividade da PARP aumenta significativamente em linhas celulares normais, em

linhas tumorais expostas a quimioterapia e também foram encontrados níveis elevados de PARP em alguns câncros. A inibição química da PARP é uma das estratégias para modular a citotoxicidade da quimioterapia no câncro. Inibidores da PARP, como o composto AstraZeneca (AZD2281) e o composto da Pfizer (AGO14699), estão a ser testados clinicamente em câncros portadores de mutações BRCA1 e BRCA2. O mecanismo destes inibidores envolve a criação inicial de SBs e subsequente indução de DSBs (quando encontrada a forquilha de replicação nas células em divisão), o que leva à morte celular. Na ausência das proteínas BRCA1 ou BRCA2, a reparação de DSB é defeituosa¹²¹.

Outro exemplo da aplicação clínica usando um inibidor do BER é a metioxianina (também conhecida como TRC-102; Tracon Pharma). A metioxiamina (Mx) bloqueia o BER por reação com um grupo açúcar-aldeído no sítio AP, causando um aduto modificado Mx-AP. Este aduto bloqueia a atividade da endonuclease AP 1 induzindo elevada citotoxicidade. A Mx induz uma grande variedade de danos no ADN por acumulação de sítios AP, que é um tipo de dano detetado pelo ensaio CoMeth.

O sistema BER remove um amplo espectro de adutos no ADN, tais como danos causados por compostos alquilantes (particularmente N⁷-metilguanina e N³-metiladenina)¹²¹. Conforme descrito anteriormente, o MNU não só induz O-alquilação, mas também N-alquilação.

Para testar a possibilidade do 5-Aza ou o SO terem efeitos no sistema BER, em células tumorais com o MMR disfuncional e com a inibição da MGMT, usou-se o inibidor do BER, Mx, e analisou-se os danos no ADN às 2h e às 72h. Os resultados (Figura 23 e Figura 24) às 2h mostram que a condição BG + MNU induz um aumento nos níveis de danos no ADN. Este era um resultado esperado, visto que o MNU é altamente citotóxico e pode provocar vários tipos de danos no ADN. Contrariamente, estes danos diminuiram às 72h, porque as células foram capazes de reparar outros danos que não os O⁶MeG. O mesmo ocorreu quando foram as células foram incubadas apenas com o MNU (Figura 23 e Figura 24), onde a MGMT reparou as lesões O⁶MeG e outras enzimas repararam os danos N-alquilação.

Quando as células RKO foram incubadas com BG + Mx + MNU, a percentagem de ADN na cauda permaneceu significativamente elevada às 72 horas. Nas condições 5-Aza + BG + Mx + MNU e SO + BG + Mx + MNU, às 72h, não houve diferenças significativas em relação às mesmas condições às 2h (Figura 23 e Figura 24).

Se o 5-Aza e o SO tivessem efeitos de modulação da atividade do sistema BER, seriam observados também, às 72h danos no ADN quando as células foram tratadas com 5-Aza + BG + Mx + MNU ou SO + BG + Mx + MNU em relação à condição BG + Mx + MNU às 72h. Estes

resultados poderão significar que as N- alquilações não estão a ser reparadas e, como consequência, contribuem para a persistência dos níveis elevados de danos de ADN detetados pelo ensaio às 72h. Por outro lado, estes compostos (5-Aza e SO) poderiam estar a inibir a atividade do Mx visto que não foram observadas diferenças significativas entre as condições 5-Aza + BG + MNU e 5-Aza + BG + Mx + MNU. Por outras palavras, a incubação com o inibidor do sistema BER não induziu diferenças nos danos no ADN (Figura 23 e Figura 24). Apesar de haver diferenças entre as condições BG + MNU e BG + Mx + MNU às 72h, o que poderia significar que as N-alquilações não foram reparadas pelo sistema BER. Experiências adicionais devem de ser realizadas para complementar o estudo.

Neste trabalho experimental foi usado outro agente alquilante, o MMS que é conhecido por induzir N-alquilações e praticamente não produzir danos O^6MeG ^{40,42}, para mostrar que o ensaio CoMeth deteta N-alquilações e demonstrar os efeitos dos compostos 5-Aza e SO no sistema BER. Como pode ser observado nos anexo 1 e 2, os resultados obtidos não foram conclusivos, pois era esperado que às 72h a condição MMS + Mx apresenta-se elevados danos no ADN, visto que o sistema BER estaria inibido pelo Mx. No anexo 3, era expectável ver o aumento de danos no ADN ao longo do tempo na condição MMS + Mx e a diminuição com o tratamento de MMS apenas, o que não sucedeu. Sirota *et al.*, em 2014 demonstrou que o ensaio cometa deteta N-alquilações, para isso incubou as células da medula óssea de rato com MMS e obteve cometas com o ADN altamente danificado¹²².

Conclusões finais

Neste trabalho foi possível demonstrar uma nova aplicação para o ensaio CoMeth, que pode ser utilizado eficientemente para detetar efeitos epigenéticos através da reversão do silenciamento do *MLH1* em células RKO. Foi observado que a pré-incubação das células com 5-Aza inibe a expressão do gene *DNMT1*, e reativa a expressão do *hMLH1* como foi verificado pelo ensaio qRT-PCR. Consequentemente, o composto desmetilante potencia os efeitos citotóxicos causados pelo agente alquilante, MNU. De acordo com estudos anteriores, verificou-se que para que os agentes de metilação induzam os efeitos citotóxicos nas células cancerígenas é necessário que o sistema MMR esteja funcional e a lesão O^6MeG seja convertida em quebras na cadeia de ADN (dano detetado pelo ensaio quando o MGMT está inibido).

Os resultados obtidos relativamente à percentagem de ADN na cauda e à percentagem de células apoptóticas após a incubação com o agente desmetilante 5-Aza e com o 5-FU isolados

sugere que, em termos clínicos, o uso concomitante destes compostos poderá ser uma nova estratégia terapêutica capaz de reduzir a resistência do CCR ao fármaco quimioterapêutico 5-FU, dado que a reativação do *MLH1* nas células tumorais torna-as mais sensível ao 5-FU.

Outro objetivo deste trabalho foi encontrar outros compostos naturais que apresentassem possíveis efeitos epigenéticos modulatórios semelhantes ao 5-Aza. Embora mais estudos sejam necessários, a elevada percentagem de danos no ADN detetados no ensaio CoMeth, após as incubações com EGCG + BG + MNU e SO + BG + MNU, sugerem que estes compostos têm potencial como agentes modulatórios da resposta ao MNU. Assim sendo, a adição destes compostos na dieta durante o processo quimioterapêutico poderá melhorar a eficiência terapêutica em pacientes com o sistema MMR não funcional, promovendo a ativação epigenética do *MLH1*.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o 5-Aza e o SO podem não ter efeitos modulatórios sobre o sistema BER.

Em conclusão, com este estudo desenvolveu-se uma nova aplicação para o ensaio CoMeth, um método fácil e versátil, que permite o “screening” de compostos com possível capacidade desmetilante de forma a melhorar a quimioterapia convencional. Usando uma linha celular com o sistema MMR disfuncional - epigeneticamente silenciada, foi possível demonstrar os efeitos de compostos desmetilantes.

Este novo método poderá ser uma importante e útil ferramenta, principalmente, no “screening” de novos fármacos e compostos naturais para descobertas de agentes epigenéticos modulatórios. Esta abordagem poderá ter impactos extremamente significativos e benéficos na terapêutica do cancro, nomeadamente do CCR.

6. Perspetivas Futuras

São necessários estudos complementares mais detalhados para que se possam tirar conclusões definitivas. Em particular, de forma a compreender melhor os efeitos do SO seria importante realizar um PCR específico de metilação para confirmar se este composto tem efeitos epigenéticos no gene *DNMT1*. Para além disso, seria interessante tentar realizar o ensaio CoMeth e a condensação nuclear para testar se a combinação SO + 5-FU tem efeitos semelhante à combinação 5-Aza + 5-FU nos danos no ADN e na indução de morte celular por apoptose, respetivamente.

Também seria interessante, avaliar e fazer o screen de outros compostos quimioterapêuticos, frequentemente usados na prática clínica, para determinar qual terá mais eficácia terapêutica em pacientes com o sistema MMR disfuncional bem como, testar a combinação com outros agentes epigenéticos, como inibidores da HDAC.

Para confirmar se o ácido ascórbico (AA) nestas condições atua como antioxidante ou como prooxidante seria importante quantificar a produção de ROS pelo ensaio DCF (dichlorodihydrofluorescein).

Seria importante, usando a técnica de western blot, verificar se o sistema BER permanece inibido após 72h de incubação com o Mx, e para isso seria relevante medir a expressão dos níveis de, por exemplo, proteínas como a MPG, a anti-Pol β e a APE1. Por outro lado, poder-se-ia testar outro inibidor do Sistema BER, como os inibidores da PARP, para confirmar os resultados obtidos com o composto Mx.

No ensaio CoMeth poderia testar-se a condição Mx + MNU, para garantir que os danos detetados seriam apenas N- alquilações, porque as lesões O⁶MeG seriam reparadas pela MGMT, visto que não seria usado o BG (composto usado para inibir a MGMT).

7. Referências

1. Anand, P. *et al.* Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **25**, (2008).
2. Lahtz, C. & Pfeifer, G. P. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 51–58 (2011).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Toiyama, Y., Okugawa, Y. & Goel, A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **455**, 43–57 (2014).
5. Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *Int. Agency Res. Cancer* <http://globocan.iarc.fr> (accessed Setembro, 2015); (2014).
6. Cotter, J. Cancro Colo-rectal: Portugal e o Mundo. *Acta Med. Port.* **26**, 485–486 (2013).
7. Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C. & Ward, E. M. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 1893–1907 (2010).
8. Center, M. M., Jemal, A. & Ward, E. International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 1688–1694 (2009).
9. Stock, C., Pulte, D., Haug, U. & Brenner, H. Subsite-specific colorectal cancer risk in the colorectal endoscopy era. *Gastrointest. Endosc.* **75**, 621–30 (2012).
10. Arvelo, F., Sojo, F. & Cotte, C. Biology of colorectal cancer. *ecancer Med. Sci.* 1–20 (2015). doi:10.3332/ecancer.2015.520
11. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
12. Watson, A. J. M. & Collins, P. D. Colon cancer: A civilization disorder. *Dig. Dis.* **29**, 222–228 (2011).
13. Kerr, D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 615–622 (2003).
14. Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet* **383**, 1490–1502 (2014).
15. Smith, G. *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9433–8 (2002).
16. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Ygast* **138**, 2073–2087.e3 (2010).
17. Grady, W. M. & Markowitz, S. D. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig. Dis. Sci.* 762–772 (2014). doi:10.1007/s10620-014-3444-4
18. Rashid, A. & Issa, J. P. J. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: A maturing field. *Gastroenterology* **127**, 1578–1588 (2004).
19. Lao, V. V. & Grady, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 686–700 (2011).
20. Huidobro, C., Fernandez, A. F. & Fraga, M. F. The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome. *Cell. Mol. life Sci.* **70**, 1543–73 (2013).
21. Vaissière, T., Sawan, C. & Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* **659**, 40–8 (2008).
22. Yoo, C. B. & Jones, P. a. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 37–50 (2006).
23. Hatzimichael, E. & Crook, T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J. Drug Deliv.* **2013**, 529312 (2013).
24. Jeltsch, A. & Jurkowska, R. Z. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem. Sci.* **39**,

- 310–318 (2014).
25. Sandoval, J. & Esteller, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 50–55 (2012).
 26. Santini, V. *et al.* Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 231–245 (2013).
 27. Jones, P. a & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415–28 (2002).
 28. Esteller, M. & Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* **196**, 1–7 (2002).
 29. Ahmed, F. E. Colorectal cancer epigenetics: the role of environmental factors and the search for molecular biomarkers. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **25**, 101–54
 30. Cihák, A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 405–422 (1974). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
 31. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. a. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27–36 (2009).
 32. Foulks, J. M. *et al.* Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *J. Biomol. Screen.* **17**, 2–17 (2012).
 33. Cherblanc, F. L., Davidson, R. W. M., Di Fruscia, P., Srimongkolpithak, N. & Fuchter, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 605 (2013).
 34. Puyo, S., Montaudon, D. & Pourquier, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89**, 43–61 (2014).
 35. Ralhan, R. & Kaur, J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* **17**, 1061–1075 (2007).
 36. Wirtz, S. *et al.* Both base excision repair and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **31**, 2111–7 (2010).
 37. Hecht, S. S. Progress and Challenges in Selected Areas of Tobacco Carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 160–171 (2008).
 38. Mirvish, S. S. *et al.* Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *J. Nutr.* **132**, 3526–3529 (2002).
 39. Drabløs, F. *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst).* **3**, 1389–407 (2004).
 40. Shrivastav, N., Li, D. & Essigmann, J. M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**, 59–70 (2010).
 41. Fu, D., Calvo, J. a & Samson, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 104–20 (2012).
 42. Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K. & Ohnishi, T. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–7 (2010).
 43. Rhee, D.-J. *et al.* Efficacy of temozolomide as adjuvant chemotherapy after postsurgical radiotherapy alone for glioblastomas. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **111**, 748–751 (2009).
 44. de Boer, J. & Hoeijmakers, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**, 453–460 (2000).
 45. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. & Roos, W. P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* **6**, 1079–1099 (2007).
 46. Kaina, B., Margison, G. P. & Christmann, M. Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.*

- 67**, 3663–81 (2010).
47. Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**, 3–34 (2003).
 48. Cui, B. *et al.* Bifunctional DNA alkylator 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea activates the ATR-Chk1 pathway independently of the mismatch repair pathway. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1356–1363 (2009).
 49. Muro, Y., Sugiura, K., Mimori, T. & Akiyama, M. DNA mismatch repair enzymes: Genetic defects and autoimmunity. *Clin. Chim. Acta* **442**, 102–109 (2015).
 50. Ramos, A. a, Pedro, D. F. N., Lima, C. F., Collins, A. R. & Pereira-Wilson, C. Development of a new application of the comet assay to assess levels of O6-methylguanine in genomic DNA (CoMeth). *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 41–8 (2013).
 51. Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. & Leiros, I. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 981–993 (2009).
 52. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. a., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
 53. Nospikel, T. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 994–1009 (2009).
 54. Batty, D. P. & Wood, R. D. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* **241**, 193–204 (2000).
 55. Friedberg, E. C., Friedberg, E. C., Southwestern, T. & Southwestern, T. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Life Sci.* 1–8 (2001).
 56. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 424–428 (1999).
 57. Wakasugi, M. *et al.* DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* **277**, 1637–1640 (2002).
 58. Costa, R. M. a, Chiganças, V., Galhardo, R. D. S., Carvalho, H. & Menck, C. F. M. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**, 1083–1099 (2003).
 59. Lieber, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
 60. Aparicio, T., Baer, R. & Gautier, J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*. **19**, 169–175 (2014).
 61. Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 113–139 (2010).
 62. Li, X. & Heyer, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**, 99–113 (2008).
 63. Carrillo, E. *et al.* 5-Fluorouracil derivatives: a patent review (2012 - 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 1–10 (2015).
 64. Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S. & Carethers, J. M. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **12**, 756–64 (2011).
 65. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
 66. Scartozzi, M. *et al.* 5-Fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? *Pharmacogenomics* **12**, 251–265 (2011).
 67. Iacopetta, B., Kawakami, K. & Watanabe, T. Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: Is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracil-responsive subgroup? *Int. J. Clin. Oncol.* **13**, 498–503 (2008).
 68. Meyers, M. *et al.* Role of the hMLH1 DNA Mismatch Repair Protein in Fluoropyrimidine-

- mediated Cell Death and Cell Cycle Responses Role of the hMLH1 DNA Mismatch Repair Protein in Fluoropyrimidine-mediated. *Cancer Res.* **61**, 5193–5201 (2001).
69. Azqueta, A. & Collins, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* **87**, 949–968 (2013).
 70. Cook, P. R. & Brazell, I. A. Characterization of nuclear structures containing super helical DNA. *J. Cell Sci.* **22**, 303–324 (1976).
 71. Ostling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291–298 (1984).
 72. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191 (1988).
 73. Hartmann, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **18**, 45–51 (2003).
 74. Ramos, A., Lima, C. & Pereira-Wilson, C. in *Selected Topics in DNA Repair* 237–270 (2011). at <http://cdn.intechopen.com/pdfs/22717/InTech-Dna_damage_protection_and_induction_of_repair_by_dietary_phytochemicals_and_cancer_prevention_what_do_we_know_.pdf>
 75. Collins, A. *et al.* The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **759**, 27–39 (2014).
 76. Tice, R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206–221 (2000).
 77. Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* **26**, 249–261 (2004).
 78. Collins, A. R., Dobson, V. L., Kennedy, G. & Stetina, R. The comet assay : what can it really tell us ? 183–193 (1997).
 79. Olive, P. L. & Banáth, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* **1**, 23–29 (2006).
 80. COLLINS, A. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **681**, 24–32 (2009).
 81. Collins, A. R., Duthie, S. J. & Dobson, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* **14**, 1733–1735 (1993).
 82. Ramos, A. a., Pedro, D. F. N., Lima, C. F., Collins, A. R. & Pereira-Wilson, C. Development of a new application of the comet assay to assess levels of O6-methylguanine in genomic DNA (CoMeth). *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 41–48 (2013).
 83. Cortes-Gutierrez, E. I. *et al.* New Application of the Comet Assay: Chromosome-Comet Assay. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 655–660 (2011).
 84. Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R. & Azqueta, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* **28**, 427–432 (2013).
 85. McKenna, D. J., McKeown, S. R. & McKelvey-Martin, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* **23**, 183–190 (2008).
 86. Liu, X. *et al.* Antiestrogenic and DNA damaging effects induced by tamoxifen and toremifene metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 832–7 (2003).
 87. McKenna, D. J., Gallus, M., McKeown, S. R., Downes, C. S. & McKelvey-Martin, V. J. Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair (Amst)*. **2**, 879–890 (2003).
 88. Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 383–389 (2005).
 89. Riss, T. L., Niles, A. L. & Minor, L. *Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. Assay Guidance Manual* (2004). doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006

90. Bookout, A. & Mangelsdorf, D. J. Quantitative Real-Time PCR Protocol for Analysis of Nuclear Receptor Signaling Pathways. *Nucl. Recept. Signal.* **1**, 1–7 (2003).
91. Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H. & Jair, K. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* **416**, 552–556 (2002).
92. Goel, A. & Boland, C. R. Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **143**, 1442–1460.e1 (2012).
93. Shinjo, K. & Kondo, Y. Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2015). doi:10.1016/j.addr.2015.10.006
94. Kaminskas, E. *et al.* Report from the FDA Approval Summary : Azacitidine for Treatment of Myelodysplastic Syndrome Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3604–3608 (2005).
95. Kaminskas, E. *et al.* FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™) for Injectable Suspension. *Oncologist* **10**, 176–182 (2005).
96. Christman, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483–5495 (2002).
97. Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H. & Lyko, F. Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **66**, 2794–2800 (2006).
98. Ikehata, M. *et al.* Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 67–73 (2014).
99. Cunningham, J. M. *et al.* Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **58**, 3455–3460 (1998).
100. Irving, J. a & Hall, a G. Mismatch repair defects as a cause of resistance to cytotoxic drugs. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **1**, 149–158 (2001).
101. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
102. Bracht, K., Nicholls, a M., Liu, Y. & Bodmer, W. F. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br. J. Cancer* **103**, 340–346 (2010).
103. Li, L. S. *et al.* DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 679–692 (2009).
104. Meyers, M. *et al.* Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPMS2. *Cancer Res.* **57**, 206–208 (1997).
105. Ribic, C. M. *et al.* Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 247–257 (2003).
106. Jover, R. *et al.* Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* **55**, 848–855 (2006).
107. Jover, R. *et al.* The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur. J. Cancer* **45**, 365–373 (2009).
108. Ramos, A. A., Pereira-Wilson, C. & Collins, A. R. Protective effects of Ursolic acid and Luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **692**, 6–11 (2010).
109. Xavier, C. P. R. *et al.* Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* **281**, 162–170 (2009).
110. Ramos, A. a., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C. & Collins, A. R. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7465–7471 (2010).

111. Pedro, D. F. N., Ramos, A. A., Lima, C. F., Baltazar, F. & Pereira-Wilson, C. Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking : Decreased DNA Damage and Cell Proliferation. *Phyther. Res.* (2015).
112. Xavier, C. P. R., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr. Cancer* **61**, 564–571 (2009).
113. MARUYAMA, T. *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses liver metastasis of human colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **2014**, 625–633 (2013).
114. Fang, M. Z. *et al.* Tea Polyphenol (-) -Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. 7563–7570 (2003).
115. Nandakumar, V., Vaid, M. & Katiyar, S. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 537–544 (2011).
116. Singh, B. N., Shankar, S. & Srivastava, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1807–21 (2011).
117. Slameňová, D. *et al.* Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of Salvia officinalis L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **94**, 282–290 (2004).
118. Loizzo, M. R. *et al.* Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Res.* **27**, 3293–9 (2007).
119. Keshavarz, M. *et al.* In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of Salvia officinalis. *Phytother. Res.* **24**, 1526–1531 (2010).
120. Mamede, A. C. *et al.* Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutr. Cancer* **64**, 1049–1057 (2012).
121. Kinsella, T. J. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1853–1859 (2009).
122. Sirota, N. P. *et al.* Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **770**, 16–22 (2014).

8. Anexos

8.1. Anexo 1

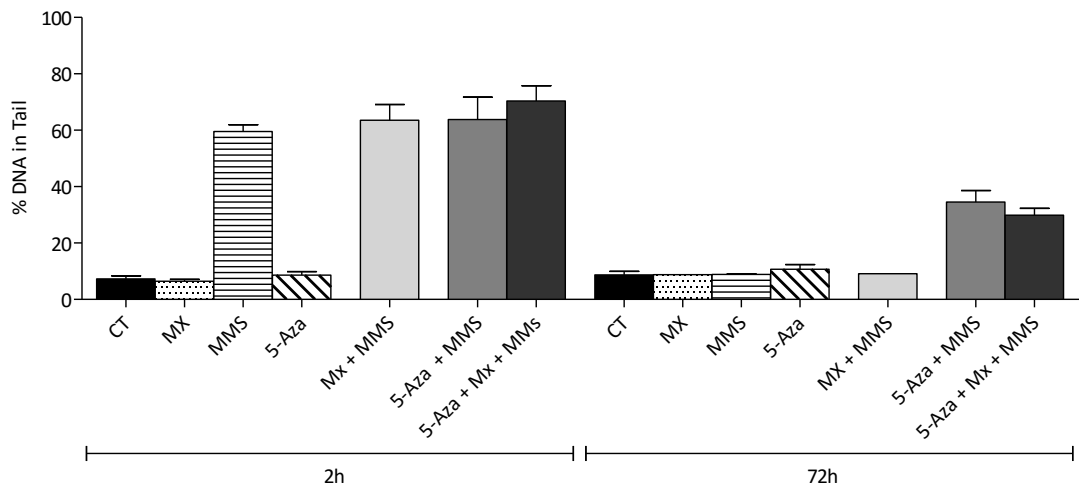


Figura 25 - Avaliar os efeitos do 5-Aza no sistema BER através do ensaio CoMeth em células RKO. As células foram pré-incubadas com 5-Aza (2 μ M) por 48h e depois disto foi adicionado Mx (3mM) por 2h seguido de 2h ou 72h com MMS (500 μ M). Os valores são média \pm SEM de três experiências independentes.

8.2. Anexo 2

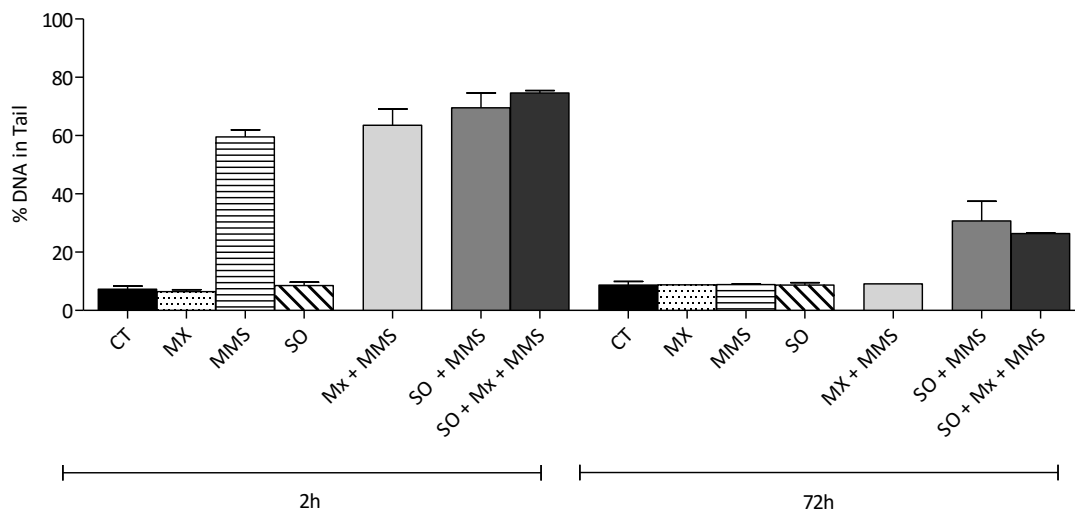


Figura 26 - Avaliar os efeitos do SO no sistema BER através do ensaio CoMeth em células RKO. As células foram pré-incubadas com SO (50 μ g/mL) por 48h e depois disto foi adicionado Mx (3mM) por 2h seguido de 2h ou 72h com MMS (500 μ M). Os valores são média \pm SEM de três experiências independentes.

8.3. Anexo 3

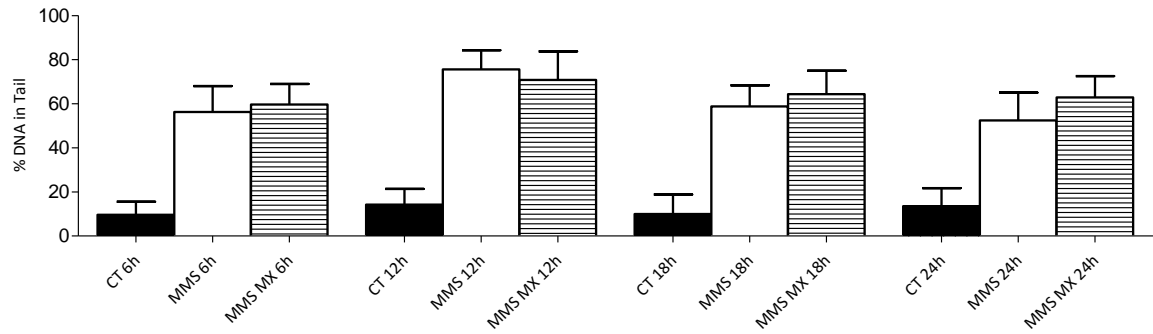


Figura 27 – Avaliar o efeito do MMR no sistema BER através do ensaio CoMeth nas células RKO. As células foram pré-incubadas por 2h com Mx (3mM) e posteriormente com MMS (500 μ M) por 6h, 12h, 18h e 24h with MMS. Os valores apresentados são de apenas uma experiência.