



ANÁLISE DO EFEITO DA EPIGALOCATEQUINA-3-O-GALATO (EGCG) NA TRANSCRIÇÃO DOS GENES DNMT-1, DNMT3A, DNMT3B

Palavras-Chave: EGCG, RNA, DNMT

Autores(as):

Fernando Umberto Vaz de Queiroz Neto, FOP/UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Ana Paula de Souza (orientador(a)), FOP/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As modificações epigenéticas representam alterações químicas que afetam a expressão do DNA e são herdáveis durante a divisão celular. Entre as alterações epigenéticas citamos a metilação do DNA, metilação e acetilação de histona, a regulação promovida pelos RNAs não codificantes (ncRNA). (MAIA et al. 2020). Essas modificações criam a “paisagem epigenética”, permitindo que o genoma exiba propriedades e padrões de distribuição únicos em diferentes tipos de células para sua identidade celular.

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil à citosina, gerando assim uma metilcitosina. As enzimas que moldam os padrões de metilação do DNA são as DNA metiltransferases (DNMTs), essas são responsáveis por inserir na posição C5 do resíduo de citosina, um grupo metil (5mC). A metilação é considerada uma marca epigenética, todavia, pode ser removida como consequência de processos de desmetilação estável, essa perda pode ser resultado da replicação sucessiva ou por regulação negativa de DNMT. Há estudos diversos que sugerem que os mecanismos epigenéticos como responsáveis pela progressão do processo de envelhecimento, além de sua relação com processos patogênicos diversos através da ativação e desativação de genes importantes para homeostase (Bouyahya et al. 2022).

O chá verde constitui um tipo de apresentação comercial das folhas da *Camellia sinensis*. Consumido predominantemente na China, Japão, Índia e países do norte da África, tem história antiga usada em ritos cerimoniais, refeições e para fins medicinais. Seu uso farmacológico foi introduzido no mercado como auxiliar de regimes dietéticos, e, hoje vem sendo estudados seus efeitos no combate do envelhecimento celular normal e induzido por radiação ultravioleta e na prevenção e tratamento do câncer. (Shin et al. 2006).

Tendo em vista esse contexto, é crescente o interesse da indústria farmacológica pelos polifenóis presentes na planta, uma vez que, apresentam inúmeras propriedades biológicas, com destaque para a epigalocatequina(3)galato (EGCG), que mostrou ter propriedades antioxidantes, contribuindo para sua utilidade terapêutica no que se refere a proteção contra patologias diversas, como o câncer e aquelas relacionadas ao envelhecimento, tornando interessante sua utilização em formulações tópicas. Ademais, outras atividades têm sido relatadas incluindo ação antiinflamatória, antibacteriana, imunostimulante, anti-alérgica e antiviral e também um função inibitória na atividade de enzimas que regulam a epigenética como as DNMTs. Sendo assim, no objetivo desse estudo foi avaliar 03 diferentes concentrações de EGCG sobre a expressão das enzimas DNMT-1, DNMT-3A e DNMT-3B em fibroblastos mantidos em cultura celular *in vitro*.

METODOLOGIA:

1- Cultura celular

Diante da aquisição dos reagentes utilizados para os testes, as células escolhidas para essa pesquisa (fibroblastos) de linhagem específica, foram devidamente testadas, a fim de conhecer seu padrão de crescimento e condições ideais de cultivo, para assim garantir manutenção da viabilidade celular e resultados mais confiáveis ao final da análise. Vale destacar que a linhagem escolhida não são modificadas por material genético viral.

Uma vez certificada a viabilidade das células e tendo ciência das condições de manutenção, os fibroblastos foram cultivadas em meio Low Serum Growth Supplement (LSGS) - meio completo, contendo: soro fetal bovino, rico em fatores de crescimento que induzem a proliferação e fatores de adesão que são responsáveis pela adesão celular ao substrato (placa) e que levam a aderência das células, fatores básicos de crescimento de fibroblastos, heparina, hidrocortisona, fator de crescimento epidermal, em condições de cultivo a 5% CO₂ e 37°C, sendo plaqueadas e cultivadas em placas de cultura com 6 cm.

Tendo feito isso, as células agora em cultura foram acompanhadas diariamente certificando-se da esterilidade do meio e crescimento. A cada 48 horas realizou-se trocas do meio de cultura até que se tivesse 70% de confluência na placa, o que foi observado com auxílio de microscópio óptico invertido após aproximadamente 7 dias após o cultivo.

Com a placa de Petri tendo ~70% da superfície ocupada pelos fibroblastos, estes foram coletados por tripsinização e contados com auxílio de câmara de Neubauer, para padronizar a contagem, foram excluídas as células dispostas sobre o limite superior e direito de cada quadrante. A contagem foi feita considerando 8 quadrantes da câmara, ao final obteve-se cerca de 1×10^6 células em toda solução (10 mL).

2- Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A partir do cenário supramencionado, os fibroblastos foram submetidos ao tratamento com a epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) em três diferentes concentrações (15 uM, 30uM e 60 uM), essas foram selecionadas de acordo com os achados na literatura científica.

Para certificação de que a droga estudada não era tóxica para as células usadas na pesquisa, realizou-se o ensaio de viabilidade celular, teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina), um teste colorimétrico para a determinação da citotoxicidade de agentes químicos para as células, tal teste quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídeos, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do MTT a formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular, podendo assim avaliar a viabilidade através de um espectrofotômetro de microplacas (Mosmann, 1983).

Para o ensaio do MTT, as 1×10^6 coletadas por tripsinização previamente foram plaqueadas em duas micro-placas de cultivo cada uma contendo 96 poços, para fins didáticos as placas foram nomeadas de A à B (A, B).

De cada placa, utilizou-se 8 poços (1 fileira) para controle negativo, tratando as células com triton, 24 poços (3 fileiras) para grupo controle, sendo cada fileira relativo ao controle para as diferentes concentrações de EGCG trabalhadas, por fim 8 poços (1 fileira) recebeu o tratamento com 15 uM de EGCG veículo tampão salino-fosfato (PBS), outros 8 poços (1 fileira) recebeu o tratamento com 30 uM da mesma droga no mesmo veículo e outros 8 poços da placa contendo fibroblastos recebeu tratamento com EGCG em uma concentração de 60 uM. Cada poço usado (controle, controle negativo e tratamento) recebeu cerca de 4×10^4 , quantidade de células satisfatória para avaliação do nível de absorvância por poço se as células estiverem em condições de viabilidade.

Após o plaqueamento, os fibroblastos foram analisados diariamente com auxílio de microscópio invertido, no 3º dia após o plaqueamento, foi feito o carenciamento visando à parada do ciclo celular na transição G1/S, e, após 24 horas (4º dia), as células da placa B foram tratadas com EGCG e o ensaio de MTT feito para a placa A.

Passadas 48 horas de tratamento e o ensaio de viabilidade celular foi realizado novamente, agora para a placa B, para que seja avaliada a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular dos fibroblastos diante do tratamento com EGCG nas concentrações utilizadas (15 μ M, 30 μ M e 50 μ M).

A leitura de absorbância foi feita com auxílio de um espectrômetro e os valores resumidos em mediana. De modo geral, os resultados revelam a viabilidade celular após o tratamento em diferentes concentrações, isso é, através do ensaio de MTT verificou-se que nessas concentrações a droga não é tóxica para as células e vale sua consideração para análise de seu efeito sobre a expressão de RNA.

3- Isolamento do RNA total

Uma vez que, os ensaios de viabilidade celular (MTT) foram concluídos e identificado o comportamento das células diante do tratamento com a epigallocatequina-3-o-galato (EGCG) e certificando-se de sua não toxicidade na concentração trabalhada, foi realizada a purificação do RNA total utilizando o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, USA). A preparação do RNA total isola todo o RNA em uma célula, incluindo RNA de transferência (tRNA), RNA ribossômico (rRNA), RNA mensageiro (mRNA) e micro RNA (miRNA ou microRNA).

Posteriormente, a qualidade e quantidade do material genético foi verificada em aparelho nanodrop. O sistema de retenção citado utiliza a tensão superficial para posicionar a amostra entre duas fibras ópticas permitindo a medição de amostras altamente concentradas, sem a necessidade de diluições com alta reprodutibilidade e precisão.

4- Análise de Expressão de mRNA

Para análise de expressão de mRNA e avaliação do efeito da epigallocatequina-3-o-galato (EGCG) na transcrição dos genes DNMT1, 3A, 3B em fibroblastos, foi realizado transcrição reversa, onde 1 μ g do RNA total purificado previamente, foi submetido ao tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen Carlsband, CA), segundo protocolo do fabricante.

Nesse processo, a quantidade dos ácidos nucleicos purificados foi analisada em aparelho Nanodrop novamente, permitindo a quantificação do material genético em pequenas amostras com alta precisão. Tal feito permitiu a padronização da massa do material genético para todas as amostras variando apenas o volume, considerando que para amplificação é necessário 1 μ g de RNA de cada amostra. Esta padronização da massa é fundamental para análise dos resultados uma vez que permitirealizar comparações dos resultados após amplificação.

Feito isso, 1 μ g de RNA (volume amostral obtido a partir da quantificação) foi diluído em volume final de 10 μ l contendo 1 μ l de tampão e 1 μ l da enzima DNase, RNA em volume variável por amostra e água. Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1 μ l de EDTA, somando 11 μ l e as amostras incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase.

Em seguida, foi realizado a reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), para isso, foi utilizado o kit Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix onde template de RNA foi combinado com 1 μ L de Oligo d(T) e 1 μ L de dNTP e após um mix em mini-centrífuga, levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos, nesse momento o primer se liga a cauda Poli-A presente na extremidade do RNA mensageiro. Posteriormente, novos reagentes são adicionados, incluindo, a transcriptase reversa, além de um inibidor de RNase para inativação da enzima, buffer e tampão. Após um mix em mini-centrífuga, novamente os microtubos tipo eppendorf são levados ao termociclador a 55° por 10 minutos e em seguida a 85° por mais 10 minutos.

Os primers para amplificação dos fragmentos foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos depositadas no Genome Browser. As reações de QPCR foram padronizadas individualmente para cada set de primers utilizando os reagentes do sistema Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit (Roche Diagnostic Co.).

RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO:

Os resultados parciais mostraram que as concentrações utilizadas nos estudo não apresentam citotoxicidade. O RNA total já foi extraído como também o cDNA confeccionado. As reações de PCR para os genes DNMT-1, DNMT-3A, DNMT-3B estão padronizadas e em fase final de realização para que então os resultados possam ser avaliados estatisticamente.

BIBLIOGRAFIA

Bouyahya, A.; Mechchate, H.; Oumeslakht, L.; Zeouk, I.; Aboulaghras, S.; Balahbib, A.; Zengin, G.; Kamal, M.A.; Gallo, M.; Montesano, D.; et al. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules* 2022, 12, 367.

Maia, Maria de Mascena Diniz, and Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva. "Conceitos básicos de epigenética para universitários." *Recife: EDUFRPE* (2020).

Mosmann, Tim. "Ensaio colorimétrico rápido para crescimento e sobrevivência celular: aplicação em ensaios de proliferação e citotoxicidade." *Journal of immunological methods* 65.1-2 (1983): 55-63.

Shin, Hyun-Jung, et al. "Effect of green tea catechins on the expression and activity of MMPs and type I procollagen synthesis in human dermal fibroblasts." *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 32.2 (2006): 117-121.