

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em
ratos expostos a metionina e doxorrubicina**

Cátia Lira do Amaral

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em
ratos expostos a metionina e doxorrubicina**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em **Ciências**.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Cátia Lira do Amaral

Orientador(a): Profa. Dra. Lusânia
Maria Greggi Antunes

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Amaral, Cátia Lira do
Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos a metionina e doxorubicina.
Ribeirão Preto, 2009.
78p. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Antunes, Lusânia Maria Greggi.

1. Metilação do DNA. 2. Metionina. 3. Doxorubicina. 4. *TP53*.
5. S-adenosilmetionina. 6. S-adenosilhomocisteína. 7. Glutaciona. 8. Ensaio do Cometa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cátia Lira do Amaral

Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos a metionina e doxorubicina

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta obra aos MEUS PAIS que transmitiram meus valores, e a DEUS que me deu força e perseverança.

Esta obra é fruto de trabalho, dedicação e esforço não apenas meu, mas de várias pessoas que contribuíram para que ela fosse finalizada. Reconheço que não seria possível realizá-la sozinha. Assim, agradeço a todos que, a sua maneira, colaboraram com ela.

Agradeço,

*Aos meus pais, **Aparecido e Jovelina**, que me ensinaram a enfrentar os desafios da vida e nos momentos mais difíceis incentivaram a não desistir.*

*Ao meu namorado **Glauco** que, apesar da distância física que nos separa, esteve sempre presente desde o início do doutorado disposto a me escutar e apoiar.*

*Ao meu irmão **Claudio**, minha cunhada **Gislaine**, e aos meus familiares e amigos que de alguma forma prestaram importante auxílio. Às minhas “irmãs” **Ana Leonor e Juliana**, que participaram nos momentos de descontração do dia a dia.*

*Aos amigos do laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição da FCFRP/USP, **Estela Beatriz Behling, Graciela Cristina dos Santos, Leonardo Meneghin Mendonça, Alexandre Ferro Aissa, Eliziani Mieko Konta, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Juliana Carvalho Ribeiro, Rita de Cássia Oliveira, Juliana Mara Serpeloni, Carla da Silva Machado e Mara Ribeiro de Almeida** pela ajuda e apoio que prestaram. Em especial, agradeço a **Rafaela** cuja amizade, apoio e dedicação foram essenciais para enfrentar as dificuldades durante os experimentos e superar nossos desafios.*

*À orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes** que acreditou em mim e me incentivou a realizar esta obra.*

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi pelo apoio e por toda estrutura disponibilizada no Laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP.

À Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pela disponibilização do microscópio de fluorescência para a realização das análises do cometa.

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiróz por permitir o uso das dependências e equipamentos do Laboratório de Análises Toxicológicas da FCFRP – USP para realização das dosagens de SAM e SAH.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP, discussões e supervisão na clonagem e sequenciamento das amostras.

À Dra. Raquel Alves dos Santos pelo treinamento e apoio nos ensaios do cometa.

Aos funcionários da FCFRP/USP Sônia, José Maria, Joana D'arc e Regislaine, que me ensinaram as técnicas utilizadas e cujo auxílio foi essencial para o desenvolvimento da parte experimental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Doutorado.

“O segredo é não correr atrás das borboletas. É cuidar do jardim para que elas venham até você.”
(Mário Quintana – Escritor)

“A honra não consiste em nunca cair, mas em levantar cada vez que se cai.”
(Confúcio – Filósofo Chinês)

Resumo

AMARAL, C. L. **Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos metionina e doxorrubicina.** 2009. 78f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - SP, 2009.

O estado de metilação é suscetível a mudanças quando os organismos são expostos a agentes ambientais tais como componentes dos alimentos e medicamentos. Uma dieta rica em metionina (Met) poderia modular a concentração de *S*-adenosilmetionina (SAM) e *S*-adenosilhomocisteína (SAH) e alterar o estado de metilação da região promotora de genes supressores de tumores. Tanto a hipometilação global quanto a hipermetilação de genes específicos estão envolvidas na instabilidade genômica e poderiam resultar em dano ao DNA. Este estudo avalia se a dieta suplementada com Met associada a doxorrubicina (DXR), um fármaco antitumoral que induz espécies reativas, resulta em alterações no estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, na razão SAM/SAH, na concentração de glutatona (GSH) e em dano ao DNA. Quarenta ratos machos Wistar foram separados em dois grupos: dieta suplementada com Met (ração comercial acrescida de 2% Met) e dieta controle (ração comercial) por seis semanas. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos que receberam DXR (1mg/Kg) ou solução salina intraperitoneal na terceira e sexta semanas de tratamento. Os rins e fígado foram utilizados para isolamento do DNA, determinação da concentração de SAM, SAH e GSH, e análise da instabilidade genômica. Todos os grupos apresentaram o mesmo estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, determinado pelo método de análise de restrição combinada com bissulfito (COBRA). Este fato poderia ser explicado pelo índice de metilação (razão SAM/SAH) que permaneceu inalterado, possivelmente devido a uma adaptação do ciclo da Met que manteve a concentração de SAM. A depleção de GSH não ocorreu quando DXR foi associada a dieta suplementada com Met. Portanto, a suplementação com Met manteve a concentração de GSH em ratos tratados com DXR. A dieta suplementada com Met não induziu instabilidade genômica e não alterou o dano ao DNA induzido pela DXR. Em conclusão, DXR induz depleção de GSH que é inibida pela suplementação com Met. Entretanto, a mesma suplementação não previne a instabilidade genômica induzida pela DXR. A dieta suplementada com Met aumenta a concentração de SAH renal sem alterar a concentração de SAM e GSH. Tanto a dieta suplementada quanto a DXR não induzem hipermetilação na região promotora do gene *TP53*.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Metionina. Doxorrubicina. *TP53*. *S*-adenosilmetionina. *S*-adenosilhomocisteína. Glutatona. Ensaio do cometa.

Abstract

AMARAL, C. L. ***TP53* gene methylation and genomic instability in methionine and doxorubicin exposed rats.** 2009. 78f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - SP, 2009.

The DNA methylation status is susceptible to changes when organisms are exposed to environmental agents such as food components and drugs. A methionine-rich (Met) diet may modulate *S*-adenosylmethionine (SAM) and *S*-adenosylhomocysteine (SAH) concentrations, which could change the DNA methylation status in the promoter region of tumor suppressor genes. Global hypomethylation and gene-specific hypermethylation are involved in genomic instability and it could result in DNA damage. This study intends to evaluate if a Met-rich diet associated with doxorubicin (DXR), an antitumoral drug that induces reactive species, result in changes in the methylation status of the *TP53* gene promoter, in the SAM/SAH ratio, in glutathione levels (GSH) and in DNA damage. Forty male Wistar rats were separated into two groups: Met-rich diet (standard chow plus 2% Met), and control diet (standard chow) for six weeks. Each group was subdivided into another two groups that received DXR (1mg/kg) or saline intraperitoneally in the third and sixth weeks of the experiment. The kidneys and the liver were removed for DNA isolation, SAM, SAH and GSH determination, and genomic instability assay. All groups showed the same unmethylated status in the *TP53* promoter according to the Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). This could be explained by the fact that the methylation index (SAM/SAH ratio) remained unchanged, possibly because of an adaptive Met pathway that maintains SAM levels. GSH depletion did not occur when DXR was associated with the Met-rich diet. As a matter of fact, the Met-rich diet improved GSH concentration in DXR-treated rats. Met-rich diet did not induce genomic instability, and it did not alter DNA damage induced by DXR. In conclusion, DXR induces GSH depletion which is inhibited by Met supplementation. However, Met-rich diet may not prevent genomic instability induced by DXR. A Met-rich diet increases SAH levels; however, it does not change GSH and SAM levels. Neither Met supplementation nor DXR induced DNA hypermethylation in the *TP53* gene promoter.

Keywords: DNA methylation. Methionine. Doxorubicin. *TP53*. *S*-adenosylmethionine. *S*-adenosylhomocysteine. Glutathione. Comet assay.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

