



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DE DNA EM CÉLULAS MCF-7 E
MCF-10A APÓS EXPOSIÇÃO TRANSIENTE DE NANOPARTÍCULAS
DE MAGHEMITA FUNCIONALIZADAS COM CITRATO

RAPHAEL SEVERINO BONADIO

2014

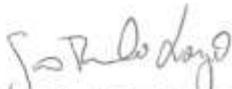
Dissertação de Mestrado

Raphael Severino Bonadio

Título:

“Perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 e MCF-10A após a exposição transiente de Nanopartículas de Maghemita funcionalizadas com citrato.”

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Presidente / Orientador
UnB / Nano


Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB / Nano


Prof. Dr. Guilherme Martins Santos
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB / FS

Márcio José Poças Fonseca
Membro Suplente
Interno não Vinculado ao Programa
UnB / GEM

Brasília, 29 de agosto de 2014.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

RAPHAEL SEVERINO BONADIO

PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DE DNA EM CÉLULAS MCF-7 E
MCF-10A APÓS EXPOSIÇÃO TRANSIENTE DE NANOPARTÍCULAS
DE MAGHEMITA FUNCIONALIZADAS COM CITRATO

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Nanociência e Nanobiotecnologia, pelo Programa
de Pós-Graduação em Nanociência e
Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

BRASÍLIA

2014

*Dedico este trabalho ao desconhecido,
fonte de motivação da investigação científica.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais-heróis, Maria do Carmo e Antônio, pelo apoio incondicional a todas as minhas decisões e por todo o amor e carinho. Muito obrigado por investirem tanto na minha educação e por todas as orações e conselhos, mesmo sem entender direito a vida de um cientista. Obrigado por não serem normais!

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, por ter me convidado para participar de um projeto de pesquisa desafiante e motivador. Obrigado por acreditar no meu trabalho e por seu exemplo de pesquisador.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo, exemplo de dedicação à pesquisa, por todos seus ensinamentos e por sua confiança e compreensão.

Ao prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca, exemplo de dedicação à pesquisa, por todo o apoio e por todas as discussões e ensinamentos desde minha chegada ao GEM.

A todos os professores do Departamento de Genética e Morfologia da UnB, por terem incentivado a minha qualificação e por todo o apoio nessa fase importante da minha vida.

Aos meus colaboradores Renatinha e Fred, pela extrema competência, paciência e dedicação. Obrigado por ajudar a construir esse trabalho.

A D. Zélia, por seu exemplo de competência profissional, sempre disposta a ajudar com boa vontade e alegria.

A todos os amigos e colegas que me apoiaram nessa trajetória, em especial os integrantes do Laboratório de Nanobiotecnologia, Laboratório de Genética Humana, Laboratório de Genética da Biodiversidade e Laboratório Maristella de Oliveira Azevedo. Sem vocês a ciência seria extremamente entediante.

A Mariana Carneiro, pelas intensas discussões que ajudaram a construir esse projeto.

Ao Marco Antônio, pela ajuda com as análises de PCR em tempo-real;

A prof. Emília Celma de Oliveira, por sintetizar as amostras utilizadas nesse estudo;

Ao Prof. Bernardo Neves da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter cedido o microscópio de força atômica utilizado na aquisição das imagens;

A UnB, por ceder sua estrutura para a realização desse trabalho.

As Agências de fomento: CNPq, CAPES, Finatec, FAP-DF, pelo fundamental apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: Diversos estudos reportam alterações na expressão gênica em resposta à exposição de células à nanomateriais, mas até o presente momento não há nenhum estudo sobre a toxicidade a nível epigenético causada por nanoestruturas e seus efeitos em sucessivas gerações celulares. Portanto, torna-se necessário estudar esses fenômenos a fim de contribuir no desenvolvimento de nanopartículas mais adequadas para aplicações biológicas. **Objetivo:** Avaliar o perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 e MCF-10A em cultivo após a cessão da exposição de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. **Materiais e métodos:** As NPM-citrato foram sintetizadas pelo método de coprecipitação de Fe (II) e Fe (III) e adição direta de ácido cítrico. As caracterizações das NPM-citrato foram realizadas por microscopia (MET, HRTEM, MEV e AFM) e por diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta. Para detectar as concentrações sub-letais IC-10 e IC-20, foram realizados a exclusão de viabilidade por contagem de células coradas com Azul Tripán e o ensaio de citotoxicidade pela detecção da Lactato Desidrogenase (LDH). O ensaio de proliferação celular foi realizado no sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA). A detecção de ferro intracelular foi realizada pelo ensaio do Azul da Prússia. O perfil de metilação global de DNA foi realizado por ensaio colorimétrico. A expressão das DNMTs foi realizada por qRT-PCR. **Resultados:** As NPM-citrato causaram efeito citostático em células MCF-7 e MCF-10A quando administradas nas concentrações 30 e 60µgFe/mL durante 24h. Após a cessão da exposição das NPM-citrato, verificou-se que a proliferação das células MCF-7 tratadas foi maior que das células não tratadas. Além disso, foi constatado que as NPM-citrato encontravam-se no interior das células durante todo o experimento e que havia uma dinâmica de metilação de DNA, mesmo após a exposição transiente das NPM-citrato. Também foram identificadas diferenças entre o acúmulo de transcritos de DNA metiltransferases. **Discussão:** Os nanomateriais possuem um risco intrínseco em aplicações biológicas, mesmo quando administrados em concentrações consideradas não-tóxicas por meio de técnicas convencionais. Isso porque seus efeitos em sistemas biológicos podem se estender a múltiplas gerações, mesmo durante exposição transiente. **Conclusão:** As NPM-citrato promovem alterações significativas no perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 e não promovem em MCF-10A e esse fenômeno pode ser explorado para aplicações biomédicas futuras.

ABSTRACT

Introduction: Several studies have reported changes in gene expression in response to exposure of cells to nanomaterials, but to date there is no study on the toxicity caused by nanostructures at epigenetic level and their effects in successive cell generations. Therefore, it becomes necessary to study these phenomena in order to contribute to the development of more appropriate nanoparticles for biological applications. **Objective:** To evaluate the profile of global DNA methylation in MCF-7 and MCF-10A cells in culture after cessation of exposure to maghemite nanoparticles functionalized with citric acid. **Methods:** The NPM-citrate were synthesized by coprecipitation of Fe (II) and Fe (III) method and direct addition of citric acid. The characterizations of NPM-citrate were performed by microscopy (TEM, HRTEM, SEM and AFM) and by analysis of the hydrodynamic diameter and zeta potential. To detect the sub-lethal concentrations IC-10 and IC-20, we performed the counting of the cells stained with Trypan Blue and cytotoxicity assay for detection of lactate dehydrogenase (LDH). The cell proliferation assay was performed in xCELLigence™ (Roche / ACEA) system. Detection of intracellular iron assay was performed by Prussian Blue. The profile global DNA methylation was performed by colorimetric assay. The expression of DNMTs was performed by qRT-PCR. **Results:** NPM-citrate caused cytostatic effect on MCF-7 and MCF-10A cells when given at concentrations of 30 and 60 μ gFe/ml for 24h. After the transfer of the NPM-citrate exposure, it was found that the proliferation of MCF-7 treated cells was higher than untreated cells. Furthermore, it was found that the NPM-citrate is found inside the cells throughout the experiment and had a dynamic DNA methylation even after transient exposure of NPM-citrate. Differences between the transcript accumulation of DNA methyltransferases were also identified. **Discussion:** The combination of nanotechnology and epigenetics is still poorly understood because these are frontier areas of knowledge. Thus, nanomaterials have an intrinsic risk in biological applications, even when administered in non-toxic concentrations considered by conventional techniques. This is because their effects on biological systems can be extended to multiple generations, even during transient exposure. **Conclusion:** The NPM-citrate promote significant changes in global DNA methylation in MCF-7 cells and do not promote in MCF-10A and this phenomenon can be exploited for future biomedical applications.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.1. Metilação e desmetilação do DNA. Modificado de Chen & Riggs, 2011....21
- Figura 1.2. Representação esquemática do metabolismo do ferro, retirado de Anderson et al, 2012).....28

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 3.1. Desenho experimental dos ensaios das seções 3.7-3.10. As células foram semeadas (1) e tratadas com meio de cultivo contendo PBS (2a), NPM-citrato 30 μ gFe/mL (2b) ou NPM-citrato 60 μ gFe/mL (2c). Os tratamentos foram substituídos por meio de cultivo (3) e as células foram analisadas 0h, 24h, 48h, 72h e 96h após a remoção dos tratamentos (+0, +24, +48, +72 e +96).....41

RESULTADOS

- Figura 4.1. Caracterização das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. A. Eletromicrografia de Transmissão. Barra de escala: 200nm. B. Histograma do diâmetro de 1000 nanopartículas contadas, com média de 10nm. C. Eletromicrografia de Varredura. Barra de escala: 500nm. D. Modelo da organização da cobertura de citrato na superfície das nanopartículas de maghemita, evidenciando os grupamentos carboxila, de acordo com (Cheraghipour *et al*, 2012).....50

- Figura 4.2. Fotomicrografia obtida por microscópio de força atômica das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. A superfície das NPM-citrato apresenta morfologia esférica com irregularidades. Barra de escala: 307,6nm.....51

- Figura 4.3. Eletromicrografia de Transmissão de Alta Resolução das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. O círculo vermelho evidencia o núcleo de uma nanopartícula de maghemita. É possível visualizar a estrutura cristalina característica de óxidos de ferro. A seta preta indica a cobertura de citrato. Barra de escala: 5nm.....51

Figura 4.4. Análise de estabilidade das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato ao longo de 360 dias após a síntese. As amostras foram mantidas em 4°C, temperatura ambiente ou 37°C e foram realizadas as medições de diâmetro hidrodinâmico em água (A) e em PBS (B), potencial zeta em água (C) e em PBS (D) e índice de polidispersão em água (E) e em PBS (F).....52

Figura 4.5. Contagem de células com auxílio do corante azul Tripan. As células foram tratadas com NPM-citrato (10-600µgFe/mL) por 24h e as células vivas e mortas foram contadas em hematocitômetro. Há uma diminuição no número de células vivas (MCF-7 e MCF-10A) de maneira concentração-dependente, mas não foi observado um aumento significativo do número de células mortas em nenhum dos tipos celulares analisados..54

Figura 4.6. Curva de viabilidade celular após tratamento com NPM-citrato (10-600µgFe/mL) por 24h. Foi realizada a transformação logarítmica após a normalização dos dados da figura 4.5 para obtenção das IC10 e IC20 em MCF-7 e MCF-10A.....54

Figura 4.7. Ensaio de citotoxicidade por detecção da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). As células MCF-7 e MCF-10A foram expostas às NPM-citrato (10-600µgFe/mL) durante 24h e a enzima LDH do sobrenadante das células foi quantificada por ensaio colorimétrico. Não foi observada citotoxicidade por rompimento da membrana plasmática em nenhuma das concentrações testadas.....55

Figura 4.8. Análise da dinâmica de proliferação de células MCF-7 (A) e MCF-10A (B) segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Entre -48h e -24h o perfil de proliferação das células MCF-7 e MCF-10A é semelhante. Entre -24h e +0h percebe-se que as NPM-citrato inibem o crescimento das células MCF-7 e MCF-10A. Após +0h as células MCF-7 tratadas exibem taxa de proliferação maior que as células não tratadas (controle), enquanto as MCF-10A entram em processo de morte celular.....57

Figura 4.9. Tempo de duplicação de células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. (A) Comparação do tempo de duplicação celular entre os tratados e o controle em intervalos de 24h. A diferença estatística foi detectada por ANOVA two-way com pós teste Tukey. (B) Análise da área sob a curva da duplicação celular durante todo o período em estudo. As NPM-citrato induzem uma diminuição no tempo de duplicação

celular de forma concentração-dependente, com conseqüente aumento na taxa de duplicação celular.....58

Figura 4.10. Análise do IC50 tempo-dependente em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. O IC50 das células tratadas apresenta um aumento em +72h, sugerindo um aumento da resistência das células ao tratamento com NPM-citrato.....59

Figura 4.11. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Agregados de NPM-citrato podem ser identificados durante todo o período de estudo. Barra de escala 30µm.....60

Figura 4.12. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-10A segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Agregados de NPM-citrato podem ser identificados durante todo o período de estudo. Barra de escala 30µm.....61

Figura 4.13. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-7 e MCF-10A durante 10h de tratamento (-14h). As células MCF-7 e MCF-10A interiorizam uma grande quantidade de NPM-citrato. Barra de escala 30µm.....62

Figura 4.14. Microscopia Eletrônica de Transmissão de células MCF-7 tratadas com 60µgFe/mL nos tempos +0h (A) e +96h (B). As NPM-citrato organizam-se em agregados no citoplasma das células, mas também se encontram individualizadas (quadrante superior esquerdo). Apenas células em +96h apresentaram NPMs no núcleo (círculo vermelho). As setas brancas indicam a membrana nuclear. Barra de escala: 2µm (célula) e 10nm (NPM-citrato).....63

Figura 4.15. Perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Observa-se a hipometilação de DNA em células expostas à 60µgFe/mL imediatamente após a remoção do tratamento (+0h). Após o período +24h ocorre a restauração gradual do perfil de metilação. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA two-way com pós-teste Tukey.....64

Figura 4.16. Perfil de metilação global de DNA em células MCF-10A segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos grupos pelo método ANOVA two-way com pós-teste Tukey.....65

Figura 4.17. Análise de correlação de Pearson entre as concentrações utilizadas nos tratamentos e o tempo após a remoção das NPM-citrato. Observa-se uma correlação positiva em +48h e correlação negativa nos outros tempos analisados.....65

Figura 4.18. Análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL das amostras de RNA total de células MCF-7. Os RNAs utilizados na PCR em tempo real estavam íntegros e livres de contaminação com DNA. Cada fotografia refere-se a uma réplica biológica independente. (A) Controle +0h; (B) 30µgFe/mL +0h; (C) 60µgFe/mL +0h; (D) Controle +24h; (E) 30µgFe/mL +24h; (F) 60µgFe/mL +24h; (G) Controle +48h; (H) 30µgFe/mL +48h; (I) 60µgFe/mL +48h; (J) Controle +72h; (K) 30µgFe/mL +72h; (L) 60µgFe/mL +72h; (M) Controle +96h; (N) 30µgFe/mL +96h; (O) 60µgFe/mL +96h.....67

Figura 4.19. Quantificação dos transcritos *DNMT1* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. As diferenças estatísticas foram detectadas por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).....67

Figura 4.20. Quantificação dos transcritos *DNMT3A* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. A diferença estatística em relação ao controle foi detectada por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).....68

Figura 4.21. Quantificação dos transcritos *DNMT3B* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. Diferença estatística detectada por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).....68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
μ	Micro
5mC	5-metilcitosina
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA two-way	Análise de variância de dois fatores
AuNP	Nanopartícula de ouro
CaCo	Cacodilato de sódio
CBP	CREB binding protein
cDNA	DNA complementar
CdTe	Telureto de cádmio
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
Ct	<i>Cycle treshold</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F12
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe	Ferro
FM	Fluido magnético
g	Gramma
g	Gravidade
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
h	Hora
HDAC8	Histona desacetilase 8
HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução
IC	Concentração inibitória
K	Quilo
KG-1	Macrófago de leucemia humana
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
m	Metro
m	Mili
M	Molar
MCF-10A	Célula de epitélio mamário humano de origem não-tumoral
MCF-7	Célula de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	Célula de adenocarcinoma mamário humano
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
MRI	Ressonância magnética por imagem
n	Nano
NPM	Nanopartícula magnética
NPM-citrato	Nanopartícula de maghemita funcionalizada com citrato
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica

PARP-1	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial de hidrogênio
PLGA	Poli (ácido lático co-glicólico)
PROS1	Gene codificador da Proteína S (alfa)
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo-real
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
RQ	Quantificação relativa
seg	Segundos
STEAP	<i>Sixtransmembrane epithelial antigen of the prostate</i>
T-47D	Célula de carcinoma ductal mamário humano
Tf	Transferrina
TFR1	Receptor de transferrina 1
UHRF1	<i>Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1</i>
V	Volt

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Epigenética	18
1.2 Metilação de DNA.....	19
1.3 Fatores ambientais	22
1.4 Nanociência e Nanotecnologia	24
1.5 Nanotoxicologia e metabolismo do ferro	26
1.6 Nanoepigenética e toxicologia.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Síntese das NPM-citrato	34
3.2 Caracterização Nanoscópica das NPM-citrato	34
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET	35
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução – HRTEM	35
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	36
3.2.4 Microscopia de Varredura por Sonda/Força Atômica (AFM).....	36
3.3 Ensaio de estabilidade das NPM-citrato.....	36
3.5 Perfil citotóxico/citostático das NPM-citrato	37
3.5.1 Perfil de viabilidade celular por coloração com Azul Tripán.....	37
3.5.1.2 Análise Estatística.....	38
3.5.2 Ensaio de detecção da lactato desidrogenase (LDH).....	39
3.6 Desenho experimental - ensaios de avaliação epigenética (seções 3.7-3.11).....	40
3.7 Dinâmica de proliferação celular.....	41
3.7.1 Análise Estatística	42
3.9 Análise ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de células MCF-7 tratadas com NPM-citrato.....	43
3.10 Perfil de metilação global de DNA de células MCF-7 e MCF-10A tratadas com NPM-citrato.....	43
3.10.1 Análise Estatística	45
3.11 Análise do acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de DNA metiltransferases	45
3.11.1 Análise Estatística	47
4. RESULTADOS	49
4.1 Caracterização nanoscópica das NPM-citrato	49
4.2 Perfil citotóxico/citostático das NPM-citrato	53
4.3 Perfil de proliferação das células MCF-7 e MCF-10A	55
4.4 Presença de ferro intracelular	59

4.5 Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	62
4.6 Perfil de metilação global do DNA	63
4.7 Análise do acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de DNMTs	65
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epigenética

Todas as células de um organismo multicelular carregam o mesmo genoma, se não forem consideradas as mutações que podem ocorrer ao longo da vida, que são pouco frequentes (Hodgkinson & Eyre-Walker, 2011). Apesar disso, células em diferentes estágios do desenvolvimento e com diferentes funções devem expressar apenas um conjunto de seus genes, cujos produtos são característicos desses tipos celulares. Dessa forma, o potencial transcricional de um gene em um determinado tipo celular não é determinado por diferenças na sequência de DNA em relação à outros tipos celulares, mas por diferenças no seu perfil epigenético (Sarkies & Sale, 2012). O termo Epigenética foi originalmente cunhado por Conrad Hal Waddington em 1942 em um contexto específico, a fim de descrever os processos entre o genótipo e o fenótipo durante o desenvolvimento embrionário que não podiam ser atribuídos diretamente à sequência de DNA, mas que sofriam influências ambientais (Waddington, 1942). Com a descoberta das marcas epigenéticas e seus mecanismos de ação, que serão apresentados posteriormente, o conceito de Epigenética evoluiu, sendo definido como o estudo dos fatores ou processos moleculares herdáveis por mitose ou por meiose e potencialmente reversíveis que regulam a atividade genômica de forma independente da sequência de DNA (Skinner, 2011a). Esses fatores ou processos não são estáticos durante a vida, pois sofrem mudanças coordenadas em estágios definidos do desenvolvimento embrionário, particularmente em mamíferos. Além da dinâmica pré-estabelecida do epigenoma, existe também a variação estocástica, cujo propósito biológico é desconhecido, mas acredita-se que possa ser mediado por fatores ambientais (Feil & Fraga, 2012).

Hoje sabe-se que os eventos epigenéticos participam de diversos processos biológicos, como na oncogênese, doenças autoimunes, obesidade, senescência celular, problemas na reprodução assistida e na clonagem por transferência nuclear de células somáticas, plasticidade neuronal, desenvolvimento embrionário, distúrbios comportamentais humanos e até mesmo na evolução das espécies (Jablonka & Lamb, 2002; Gluckman & Hanson, 2004; Petronis, 2010). Nesse sentido, a modulação epigenética parece representar um mecanismo de regulação da expressão gênica universal, ainda que pouco compreendido. As marcas ou fatores epigenéticos identificados até o presente momento são a metilação de DNA, as modificações pós-

tradicionais de histonas (metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação), os RNAs não codantes e os príons (Grossniklaus *et al*, 2013). O foco deste trabalho é o estudo da dinâmica da metilação global de DNA em células epiteliais de mama após exposição transiente de nanopartículas magnéticas, por isso, as outras modificações epigenéticas não serão abordadas em detalhes.

1.2 Metilação de DNA

A ligação covalente do grupamento metil (-CH₃) na posição C-5 da citosina (5mC) é a marca epigenética melhor caracterizada até o momento. Em mamíferos, encontra-se predominantemente em um contexto de dinucleotídeos CpG, ou seja, uma citosina adjacente a uma guanina localizadas na mesma fita de DNA. A metilação de sequências não-CpG é rara em mamíferos e sua função ainda é desconhecida (Lister *et al*, 2009). Estima-se que 70-80% de todos os CpGs de células somáticas humanas são metilados (Arand *et al*, 2012), ou seja, aproximadamente 2-5% de todas as citosinas do genoma, dependendo do tipo celular (Bollati & Baccarelli, 2010).

Em 1975, dois trabalhos independentes sugeriram que a metilação do DNA poderia ser uma marca epigenética e que estava relacionada diretamente com o silenciamento gênico (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975). Essa visão restritiva da função da metilação do DNA permaneceu por muito tempo, mas hoje sabe-se que essa marca pode assumir diferentes funções, dependendo de seu contexto e sua distribuição no genoma. Mais da metade dos genes de vertebrados contém pequenas regiões ricas em CpG (aproximadamente 1kb), conhecidas como ilhas CpG. Essas regiões são comumente encontradas nos promotores dos genes, próximas ao sítio de iniciação da transcrição. Em geral, quando uma grande porção de citosinas presentes em ilhas CpG encontram-se metiladas, há uma inibição do acoplamento do aparato transcricional no DNA e conseqüentemente uma inibição da transcrição. No entanto, quando a 5mC encontra-se no corpo do gene observa-se geralmente o efeito inverso, ou seja, ao invés de inibir a transcrição, ela estimula sua alongação. Além disso, estudos mostram que a metilação nessa região pode exercer influência durante o *splicing* (Laurent *et al*, 2010). A metilação em regiões repetitivas (como os centrômeros) e em elementos transponíveis é importante para a estabilidade dos cromossomos. Outros trabalhos mais recentes

discutem as possíveis influências da metilação do DNA na atividade de elementos regulatórios, como *enhancers* e insuladores (Jones, 2012).

Em concordância com sua importância funcional, os padrões de metilação de DNA são bem regulados ao longo das gerações. Apesar dos padrões de metilação serem amplamente mantidos através da divisão de células somáticas, mudanças no padrão de metilação ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e durante a diferenciação celular ou ainda sob algum estímulo ambiental. As enzimas que promovem a transferência do grupamento metil da S-adenosil-L-metionina para a citosina em CpG fazem parte da família das DNA metiltransferases (DNMTs), dentre as quais apenas três delas possuem atividade catalítica: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é a principal metiltransferase de manutenção. Essa enzima tem preferência por sítios CpG hemimetilados em sequências palindrômicas (CpG metilado em apenas uma das fitas de DNA) como os gerados pela replicação do DNA. Ela é responsável por copiar os padrões de metilação pré-existentes para a fita recém-sintetizada, provavelmente com a ajuda da proteína UHRF1 (*Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*), que também reconhece sítios hemimetilados (Hashimoto *et al*, 2009). As DNMT3A e DNMT3B são metiltransferases *de novo*, ou seja elas adicionam grupamento metil em um sítio antes não-metilado. Essas enzimas não possuem preferência por substratos CpG hemimetilados, mas estudos recentes mostram que elas também podem apresentar função de manutenção, possivelmente metilando os sítios CpG esquecidos pela DNMT1. Essa hipótese foi levantada pois, em células somáticas sua atividade é mais acentuada em regiões com alta densidade de CpGs metilados (Jones & Liang, 2009). As DNMT3L não possuem motivos de metiltransferase cataliticamente ativos, mas acredita-se que elas possam estimular a atividade de DNMT3A e DNMT3B. Análises estruturais indicaram que os domínios C-terminal de DNMT3A e DNMT3L formam um complexo tetramérico com dois sítios ativos, que metila preferencialmente dois CpGs separados entre 8-10pb (Jia *et al*, 2007).

A desmetilação, ou seja, a remoção do grupamento metil de CpG, também é um mecanismo importante para a manutenção da viabilidade em mamíferos e ocorre de forma global durante a reprogramação epigenética. Esse fenômeno é caracterizado por ondas de desmetilação global seguidas de metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário. É provável que esse evento ocorra para reestabelecer a totipotência no zigoto (Bergman & Cedar, 2013) e porque algumas regiões no genoma possuem padrões epigenéticos diferentes entre os cromossomos de origem materna e paterna

(*imprinting*). Esse padrão deve ser apagado nos gametas materno e paterno e posteriormente reestabelecido de forma sexo-específica na próxima geração. A reprogramação evita, por exemplo, que o padrão de *imprinting* de machos seja passado para as fêmeas da prole e vice-versa (Barlow, 2011). A figura 1 abaixo sumariza os principais mecanismos associados à dinâmica da metilação de DNA.

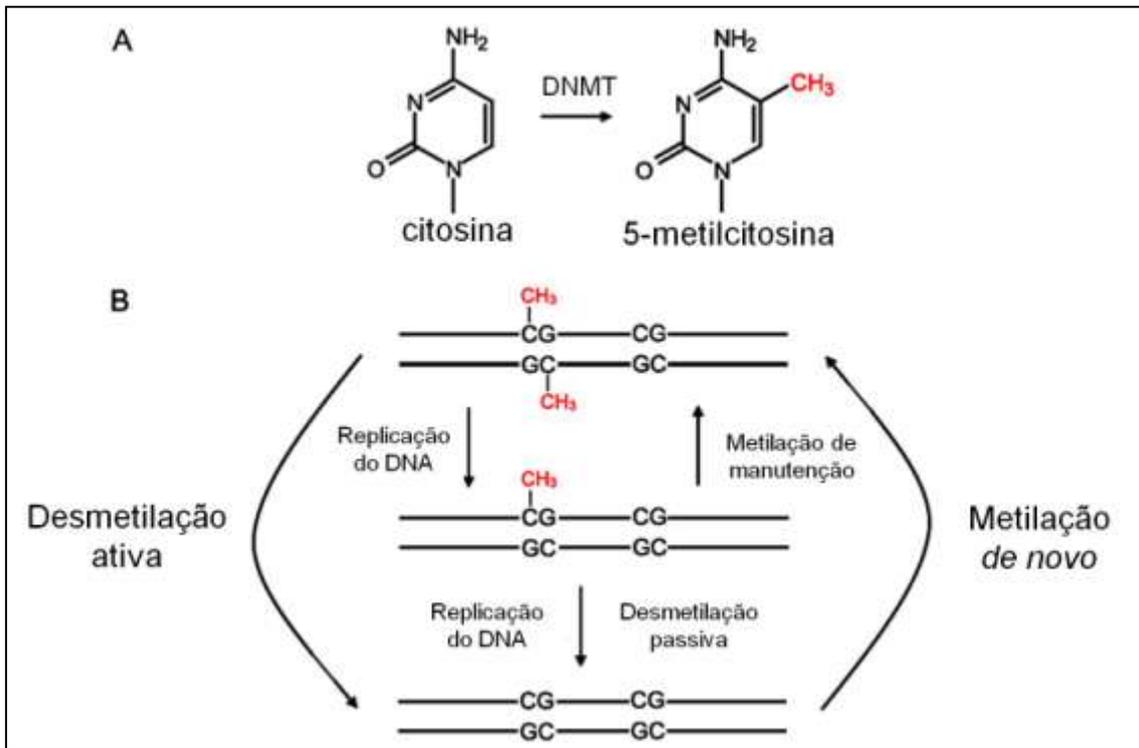


Figura 1.1. Metilação e desmetilação do DNA. Modificado de Chen & Riggs, 2011.

Após a fertilização, a maior parte do genoma de origem paterna é rapidamente desmetilado, sendo um indicativo de desmetilação enzimática ativa, cujos mecanismos ainda não estão bem elucidados. O genoma materno também é desmetilado, mas aparentemente sofre desmetilação passiva, dependente da replicação do DNA durante as divisões celulares na ausência da atividade da DNMT1 (Smallwood & Kelsey, 2012). Após a implantação, uma onda global de metilação *de novo* reestabelece os padrões de metilação de DNA que serão mantidos, em grande parte nos tecidos somáticos. As células germinativas primordiais surgem no sétimo dia embrionário (E7.5) e entre o décimo primeiro e o décimo segundo dias embrionários (E11.5 e E12.5) ocorrem novas ondas de desmetilação e metilação *de novo* para reestabelecer o padrão de *imprinting* sexo-específico nessas células. Em adição a essas mudanças globais, ocorrem eventos de desmetilação e metilação *de novo* gene-específica durante a diferenciação tecidual.

1.3 Fatores ambientais

Como mencionado anteriormente, fatores ambientais podem influenciar na herança epigenética e seu impacto depende do estágio de desenvolvimento. Evidências sugerem que o período gestacional é particularmente sensível à perturbação epigenética e que o ambiente pode exercer diferentes efeitos na placenta e no embrião (Sandovici *et al.*, 2012). Assim, alterações epigenéticas que surgem nos períodos mais precoces do desenvolvimento embrionário tendem a ser amplificadas pelas divisões celulares, afetando uma grande proporção de células do organismo adulto. Em contraste, alterações epigenéticas que ocorrem em células diferenciadas adultas permanecem restritas aquele tipo celular. Da mesma forma, quando ocorrem em células-tronco adultas permanecem restritas aquele tecido específico (Feil & Fraga, 2012). A suscetibilidade às alterações epigenéticas pode ser ligada também ao grau de pluripotência. Enquanto o epigenoma de células completamente diferenciadas parecem ser mais estáveis, o cultivo de embriões de mamíferos durante a reprodução assistida pode afetar o estabelecimento e a manutenção da metilação de DNA, particularmente em genes "imprintados" (Young *et al.*, 2001).

A herança transgeracional trata das alterações epigenéticas transmitidas às subsequentes gerações, em resposta a um impacto induzido por fatores ambientais (Heard & Martienssen, 2014). No entanto, é importante destacar que a herança transgeracional ocorre apenas se a alteração epigenética for transmitida à prole cujas células não foram expostas ao fator ambiental. Em mamíferos, por exemplo, somente marcas epigenéticas transmitidas à geração F3 são verdadeiramente transgeracionais, pois as células germinativas que darão origem à geração F2 já estão presentes durante o impacto ambiental e também podem ter sido expostas durante o desenvolvimento embrionário da geração F1. As alterações epigenéticas transmitidas até a geração F2 são chamadas de efeito parental (Heard & Martienssen, 2014).

Outro evento cuja nomenclatura ainda é alvo de debate é o equivalente à "herança transgeracional em células somáticas". Segundo Skinner (2011b), a habilidade do epigenoma ser replicado e transmitido por meio da mitose deve ser chamado de "estabilidade mitótica", pois o termo herança não é o mais adequado. Esse mesmo evento é referido por Halley-Stott & Gurdon (2013) como "memória epigenética". Huang (2013), por sua vez, discute que em um sistema *in vitro* após exposição transiente de um fator ambiental podem ocorrer três possíveis resultados: (1) as células

percebem a perturbação transiente do sistema e retornam a seu estado original (estabilidade mitótica epigenética); (2) as células percebem a perturbação transiente do sistema e sofrem alterações no seu estado epigenético (instabilidade mitótica epigenética) ou (3) as células não percebem a perturbação transiente e permanecem como se o fator ambiental ainda estivesse atuando (plasticidade).

Diversos tipos de fatores ambientais vêm sendo descritos na literatura como causa de desordens na homeostase, levando a doenças como o câncer por meio de herança transgeracional. Dentre eles, destacam-se fatores nutricionais, contaminantes inorgânicos, drogas, fungicidas, pesticidas, disruptores endócrinos e metais, como mostra a tabela 1.

Tabela 1.1. Principais fatores ambientais e seus efeitos transgeracionais em mamíferos. Adaptado de Skinner, 2010.

Fator ambiental	Efeito
DDT	Infertilidade, efeitos reprodutivos
Genisteína	Infertilidade, proteção de câncer de mama
Dietilbestrol	Câncer vaginal
Dicofol	Câncer de mama, folículos ovarianos anormais
Bisfenol A	Câncer de próstata
Aflatoxina	Câncer de fígado
Cádmio (tabaco)	Câncer de pulmão, problemas reprodutivos
Aminas heterocíclicas	Câncer de cólon, estômago e de mama
Arsênico	Câncer de fígado
Dioxina	Câncer de mama
Vinclozolin	Infertilidade em machos
Metoxicloro	Infertilidade em machos
Ftalatos	Infertilidade em machos

No entanto, é importante lembrar que o desenvolvimento de doenças por causas ambientais também pode ter contribuições genéticas, pois esses eventos não são mutuamente exclusivos. De fato, diversas pesquisas mostram a intercomunicação entre componentes genéticos e epigenéticos nos estados patológicos, principalmente em câncer. Um dos mecanismos descritos durante a transformação maligna é a hipometilação global do DNA, seguida de hipermetilação em ilhas CpG de promotores de genes específicos (You & Jones, 2012). De qualquer forma, é cada vez mais comum encontrar na literatura dados sobre influências ambientais na herança transgeracional, pois acredita-se que elas sejam mais comuns do que as variações genéticas, visto que o

epigenoma é mais flexível que o genoma. Assim, torna-se necessário investigar o papel dos fatores ambientais na etiologia de doenças para direcionar o alvos terapêuticos com menores efeitos adversos.

Novos materiais vêm sendo desenvolvidos pelo homem, dentre os quais destacam-se os nanomateriais. Estima-se que, até 2015 aproximadamente 15% da produção industrial mundial será de produtos provenientes da nanotecnologia (Kovalev, 2013). Essa perspectiva indica o volume de nanomateriais que estão sendo produzidos, justificando a necessidade de caracterizar seus potenciais de toxicidade em nível epigenético.

1.4 Nanociência e Nanotecnologia

A nanociência estuda os materiais que, quando organizados em escalas nanométricas apresentam propriedades novas e específicas que não são observadas em escalas macroscópicas, como alterações em seu comportamento óptico, elétrico e catalítico. Uma das razões para o surgimento dessas propriedades é a alta razão entre a área de superfície em relação ao volume dos nanomateriais, que os torna potencialmente mais reativos (Kucheryavy *et al*, 2013). Por exemplo, óxidos de ferro menores que 30nm não apresentam magnetização permanente, mas respondem a um campo magnético externo, sendo considerados portanto como materiais inteiramente novos, cujas propriedades podem ser exploradas para aplicações biomédicas (Mahmoudi *et al*, 2012).

A nanotecnologia por sua vez, é a aplicação da nanociência e desperta grande interesse público por apresentar grande potencial econômico e social. As aplicações dos nanomateriais são as mais diversas, abrangendo áreas desde a engenharia aeroespacial até a medicina. Dentre eles, as nanopartículas vêm se tornando um dos componentes principais da nanotecnologia, sendo uma das classes de nanomateriais que apresentam as três dimensões na nanoescala (Mahmoudi *et al*, 2012). As nanopartículas podem ser geradas de forma não intencional por meio de combustão e são encontradas, por exemplo entre as partículas de poluição do ar, ou sintetizadas de forma intencional (nanopartículas engenheiradas). As propriedades das nanopartículas dependem de sua forma (esférica, cúbica, hexagonal, etc) e de seus constituintes, que podem ser orgânicos (polímeros, lipídios, etc) ou inorgânicos (metais). Em geral, as nanopartículas

engenheiradas são mais homogêneas quanto a essas características quando comparadas com as nanopartículas naturais (Chaudhuri & Paria, 2012).

As nanopartículas de óxido de ferro (NPM) por sua vez, podem ser utilizadas em diversas aplicações biológicas, devido a suas propriedades, por possuírem baixo potencial de toxicidade (Singh *et al*, 2010). Quando dispersas em um solvente carreador, orgânico ou inorgânico, e funcionalizadas com uma camada molecular estabilizante (como citrato, dextran ou ácido dimercaptosuccínico, por exemplo) são chamadas de fluido magnético (FM). Em um FM, a interação das NPM com o solvente permite que toda a solução coloidal responda a um campo magnético e não somente as NPM. Essa propriedade vêm sendo muito explorada na pesquisa para o diagnóstico e tratamento de doenças, inclusive para o câncer. Mais recentemente, o potencial teragnóstico (junção entre terapia e diagnóstico) das NPM vêm sendo investigado, pois permite acelerar o tratamento e conseqüentemente contribuir para uma diminuição nos efeitos adversos comumente relatados nos tratamentos convencionais. Essa estratégia consiste em rastrear, por exemplo as células neoplásicas no organismo e simultaneamente promover o tratamento, visto que essas NPM também podem apresentar atividade antitumoral. Para isso, existem duas principais estratégias: a entrega de drogas sítio-dirigida e a magnetohipertermia.

A estrutura das NPM comporta a associação de fármacos, anticorpos e outras biomoléculas, permitindo a veiculação de drogas a um tecido-alvo, com o auxílio de um magneto externo, aumentando a especificidade do tratamento e resultando em menor toxicidade sistêmica (Mahmoudi *et al*, 2012). Outra aplicação em desenvolvimento é a magnetohipertermia, que consiste no aquecimento e destruição tumoral quando as NPM estão sob campo magnético externo alternado, que provoca a vibração das NPM seguida de uma intensa liberação de energia térmica. Essas nanopartículas também podem ser usadas no melhoramento das técnicas de imageamento biomédico por ressonância magnética (MRI), sendo usadas como agentes de contraste (Nigam *et al*, 2011). Dessa forma, é possível utilizar NPMs para o direcionamento e rastreamento de células-tronco transplantadas *in vivo* (Andreas *et al*, 2012) e monitorar a progressão de metástases de forma eficiente, inclusive em câncer de mama (Leuschner *et al*, 2006).

Dentre os nanomateriais aprovados para uso clínico e comercializados, encontram-se as NPM funcionalizadas com dextran (Feridex) ou com carboxidextran (Resovist), que possuem entre 50 e 200nm e carga neutra. Como são facilmente fagocitadas pelas células do sistema retículoendotelial, são utilizadas no imageamento

de hepatocarcinomas, por meio de ressonância magnética. Assim, áreas onde o tecido hepático não sofreu transformação maligna (tecido normal) são detectadas por um baixo sinal de MRI, pois o sistema reticuloendotelial está atuante, enquanto áreas de hepatocarcinoma apresentam um alto sinal de MRI, onde o sistema reticuloendotelial é deficiente (Liu *et al*, 2013).

No entanto, essas NPM não são bem internalizadas por outros tipos celulares, limitando sua aplicação (Andreas *et al*, 2012). Por isso, uma busca por novas NPM vêm sendo feita no sentido de identificar nanomateriais com maiores possibilidades de aplicação. Nesse cenário, surgem as NPM de maghemita estabilizadas com agentes quelantes ou pequenos ligantes aniônicos, como o citrato.

A maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a magnetita (Fe_3O_4) são as NPMs mais utilizadas atualmente por serem facilmente sintetizadas em laboratório, a baixo custo. Também apresentam alta estabilidade química em condições fisiológicas e, em geral baixa toxicidade, principalmente a maghemita por apresentar-se em um estado mais oxidado e portanto menor reatividade (Ling & Hyeon, 2013). As nanopartículas de óxido de ferro não apresentam estabilidade coloidal em pH fisiológico, sendo estáveis somente em condições ácidas ou alcalinas. Para a manutenção da estabilidade em pH fisiológicos, estes materiais geralmente são recobertos com moléculas biocompatíveis que permitem que estas partículas se mantenham dispersas, como por exemplo o citrato.

O citrato é um íon derivado do ácido cítrico que participa de vias metabólicas essenciais para a célula, como o ciclo do ácido cítrico e a síntese de ácidos graxos, o que sugere sua alta biocompatibilidade (Icard *et al*, 2012). Nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato (NPM-citrato) mostraram alta eficácia no tratamento de anemias e na terapia contra o câncer (Foy & Labhasetwar, 2011). No entanto, os possíveis efeitos colaterais induzidos por essas nanopartículas devem ser avaliados, a fim de estabelecer os limites de segurança para o uso clínico desses produtos.

1.5 Nanotoxicologia e metabolismo do ferro

Diversos parâmetros, como tamanho, carga, forma, composição, área de superfície e volume modificam as propriedades físico-químicas da matéria quando em escala nanométrica, podendo tornar os nanomateriais altamente reativos e desestabilizar a homeostase dos sistemas biológicos (Schrand *et al*, 2010). Em geral, quanto menor

um nanossistema, maior a proporção de átomos expostos em sua superfície capazes de reagir com o meio biológico. Estima-se que apenas 1% dos átomos de uma micropartícula situam-se em sua superfície, enquanto que em uma nanopartícula de 10nm aproximadamente 10% dos átomos estão expostos (Jones & Grainger, 2009).

A nanotoxicologia explora os efeitos nocivos da interação entre um nanomaterial e um sistema biológico, por meio da avaliação de integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, identificação de corpos apoptóticos, danos ao material genético e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) tanto à nível celular quanto tecidual (Singh *et al*, 2010). Se um nanomaterial não apresenta toxicidade significativa *in vitro* na dosagem ideal para determinada aplicação biomédica, então ele é testado em modelos *in vivo* e, posteriormente, em testes clínicos em humanos (Mahmoudi *et al*, 2012).

As nanopartículas de maghemita contém ferro, que é crucial para o metabolismo celular normal e desempenha um papel importante em processos como síntese de DNA e respiração celular. A cada dia os humanos absorvem entre 1-3mg de ferro na dieta, utilizando a proteína DMT1 (*divalent metal transporter 1*) dos enterócitos. O ferro férrico (Fe^{3+}) é liberado para o plasma através do canal exportador (ferroportina) onde se liga a transferrina (Tf). O complexo Tf- Fe^{3+} se liga ao receptor de transferrina 1 (TFR1), que é amplamente expresso na superfície das células. Após ser endocitado, o Fe^{3+} é reduzido no endossomo à Fe^{2+} por meio das redutases STEAP e transportado para o citoplasma pelo transportador DMT1. O ferro pode então ser incorporado em sítios ativos de proteínas, como as ribonucleotídeo redutases, que participam da conversão catalítica de ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos. Além disso, pode ser usado na síntese de grupamento heme e *clusters* ferro-enxofre, que são incorporados em proteínas que participam do ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa e muitas outras funções essenciais. O excesso de ferro é estocado na proteína de estoque ferritina ou exportado novamente. Antes de ser exportado, a proteína hefaestina oxida o ferro de volta para a forma Fe^{3+} para que ele possa ser carregado pela transferrina (Torti & Torti, 2013).

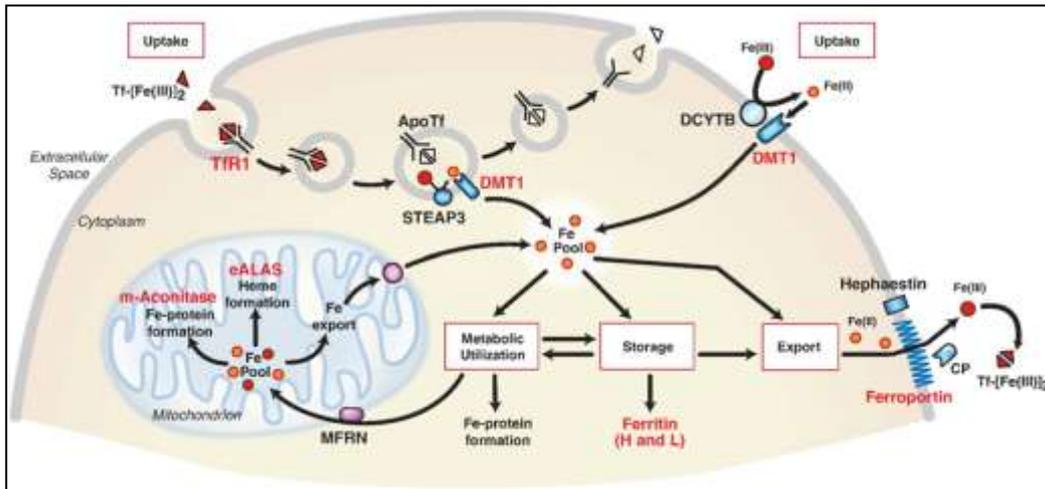


Figura 1.2. Representação esquemática do metabolismo do ferro, retirado de Anderson *et al.*, 2012).

O ferro é cuidadosamente regulado para manter a homeostase em células normais, o que não acontece em células cancerosas, que possuem uma maior demanda de ferro para sobreviver. Por exemplo, o baixo prognóstico de pacientes com câncer de mama está correlacionado com altos níveis do receptor de transferrina TfR1 (Bystrom *et al.*, 2014). No entanto, a habilidade de ganhar e perder elétrons, também permite que o ferro participe de reações que envolvem radicais livres potencialmente deletérias. Entre essas está a reação de Fenton, na qual o ferro ferroso doa um elétron em uma reação com o peróxido de hidrogênio para produzir o radical hidroxil, uma espécie reativa de oxigênio (ERO). Essa reação não somente pode danificar lipídios e proteínas, mas também causar dano oxidativo ao DNA, incluindo modificações de base e quebras na dupla-fita, podendo levar a mutações. Assim, o ferro é ser essencial, mas potencialmente tóxico.

Não existe nenhum consenso sobre os riscos intrínsecos, tolerância e toxicidade para quase todos os nanomateriais. É muito comum encontrar na literatura opiniões divergentes sobre a segurança de um mesmo nanomaterial em um mesmo sistema biológico (Jones & Grainger, 2009). Isso pode ocorrer porque os testes toxicológicos empregados são muito restritos e o microambiente celular pode não ser rigorosamente controlado entre os grupos de pesquisa, o que pode levar a modificações epigenéticas inesperadas que influenciam na resposta da célula em exposição ao nanossistema.

1.6 Nanoepigenética e toxicologia

Além das alterações genômicas e não-genômicas, os sistemas nanoestruturados podem induzir modificações epigenéticas em sistemas biológicos. Diversos estudos mostram essas alterações, mas nenhum apresenta relatos de toxicidade no nível epigenético durante exposição transiente de nanopartículas *in vitro*, ou seja, após a cessão do tratamento.

Os estudos sobre a interação de nanossistemas com as marcas epigenéticas são relativamente recentes, pois a nanotecnologia e a epigenética são áreas de fronteira do conhecimento. Choi *et al* (2008) demonstraram que quantum dots de telureto de cádmio (CdTe) promovem a hipoacetilação global da histona H3 em células de câncer de mama em cultivo, além de estresse oxidativo que induziu a morte das células, quando administrados por 24h em concentração de 5µg/mL. Nanopartículas de dióxido de silicone podem inibir a expressão da proteína MBD (Domínio de Ligação à Metilação de DNA, sigla em inglês) e das enzimas DNA metiltransferases DNMT1 e DNMT3A, levando a uma hipometilação global de DNA em queratinócitos humanos em cultivo tratados por 24h com 10µg/mL (Gong *et al*, 2010). Essas nanopartículas também podem induzir aumento da metilação do promotor do gene de reparo de DNA PARP-1, diminuindo sua expressão, no mesmo modelo celular sob mesmas condições de tratamento (Gong *et al*, 2012). Em um ensaio enzimático foram identificados os sítios de ligação da histona desacetilase 8 (HDAC8) com nanopartículas de ouro, sugerindo que estas partículas podem inibir a atividade da HDAC8 (Sule *et al*, 2008). Nanopartículas de ouro (AuNPs) podem também induzir alterações na expressão de miRNAs *in vitro* e *in vivo*. Ng *et al* (2011) identificaram aumento da expressão do mi-155 em fibroblastos fetais humanos em cultivo e diminuição da expressão do gene *PROS1* (que codifica uma proteína envolvida em coagulação sanguínea) quando as células eram tratadas com 1nM de AuNPs por 48h e 72h. Mesmo não tendo encontrado diferenças no padrão de metilação do DNA, os autores correlacionam o aumento de expressão de mi-155 com alterações conformacionais e reorganização da cromatina. Balansky *et al*, 2013 detectaram expressões anormais de 28 miRNAs em pulmões de fetos de camundongos, cujas mães foram expostas a 3.3mgAu/kg, por administração intraperitoneal, nos dias 10, 12, 14 e 17 de gestação. A droga Gefitinib (usada no tratamento de câncer de pulmão) exibiu maior atividade antitumoral em células de carcinomas de pulmão e de pele em cultivo quando nanoencapsulada com PLGA, pois

assim houve indução de histona acetiltransferases p300/CBP, levando a um aumento da acetilação de histonas H3 (Kaur *et al*, 2013). Alguns trabalhos relatam também os efeitos epigenéticos de nanopartículas de causa não intencional (Stoccoro *et al*, 2013) ou nanopartículas carreadoras de moduladores epigenéticos (Chandran, 2014).

Tais estudos sugerem que alterações epigenéticas possam ocorrer em decorrência de tratamento com nanopartículas, independentemente da indução, ou não, de cito ou genotoxicidade. É possível ainda que essas alterações epigenéticas sejam transmitidas por várias gerações, tanto por meio de divisões celulares em sistemas *in vitro* ou até mesmo por meio da prole, no caso de sistemas *in vivo*. Esses efeitos podem ocorrer nas gerações posteriores mesmo na ausência do estímulo induzido pelas nanoestruturas e, como não são detectadas pelos testes de citotoxicidade frequentemente empregados, podem levar a uma falsa ideia de que um nanomaterial não é tóxico. Se ocorrerem, essas modificações epigenéticas herdadas podem ser estáveis ou reversíveis, podendo levar a alterações morfológicas e funcionais nas células ou organismos a longo prazo. Além disso, o padrão de possíveis alterações epigenéticas induzidas por nanomateriais pode diferir entre células normais e cancerosas, o que torna mais complexa a avaliação de toxicidade entre tais tipos celulares.

Até o presente momento não há nenhum estudo sobre uma possível “toxicidade epigenética” causada por nanoestruturas que se propague por sucessivas gerações celulares, após exposição transiente a nanomateriais. O presente trabalho justifica-se pela necessidade de se avaliar o possível efeito epigenético de tratamentos com concentrações não tóxicas de nanopartículas de ferro, que apresentam propriedades particulares, como regulação metabólica alterada em câncer, especialmente em células de câncer de mama. Caso alterações epigenéticas sejam encontradas, será necessário avaliar se essas persistem ao longo das divisões celulares após exposição transiente às nanopartículas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação global de DNA em células epiteliais de câncer de mama (MCF-7) e células epiteliais não tumorais imortalizadas (MCF-10A) em cultivo após exposição transiente de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com cobertura de citrato (NPM-citrato).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese das NPM-citrato

As nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) foram sintetizadas e gentilmente cedidas pela Profa. Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Para prepará-las, foi utilizado o método de coprecipitação de Fe (II) e Fe (III) em solução aquosa pela reação de hidrólise alcalina e posteriormente as nanopartículas foram funcionalizadas pela adição de ácido cítrico, de acordo com Freitas *et al.* (2013). A magnetita foi precipitada pela dissolução de 2,08g de FeCl_2 e 5,22g de FeCl_3 em 380mL de água deionizada e, em seguida, adicionou-se 20mL de 25% NH_3 sob agitação vigorosa. Após a sedimentação do precipitado com um magneto permanente, o sobrenadante foi removido por decantação e 40mL de 2M HNO_3 foram adicionados ao sedimento de cor preta, mantido sob agitação por 5min. A completa oxidação da magnetita em maghemita foi realizada adicionando-se 60mL de 0,35M $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ à mistura sob agitação em sua temperatura de ebulição por 1h. Após a sedimentação e lavagem com 2M HNO_3 , o precipitado avermelhado foi disperso pela adição de água deionizada. Para a funcionalização das nanopartículas de maghemita, o precipitado foi tratado com solução de ácido cítrico à 0,05M sob agitação por 45min em pH 5,0. As nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (NPM-citrato) foram lavadas cinco vezes com acetona para remover o excesso de ácido cítrico e foram secadas em fluxo de gás nitrogênio. As NPM-citrato foram dispersas em água deionizada e mantidas sob agitação por 24h. Depois, foram centrifugadas à 1000 RPM por 2min e dispersas em tampão PBS. O sobrenadante foi ajustado para pH 7,0 para produzir amostras biocompatíveis. O fluido magnético obtido foi armazenado à 4 °C e possuía concentração de 9,5mgFe/mL, que pode ser determinada através de difração de raios-X segundo Freitas *et al* (2008).

3.2 Caracterização Nanoscópica das NPM-citrato

Para as caracterizações das NPM-citrato em Microscopia Eletrônica de Transmissão convencional (MET) e de alta resolução (HRTEM), Microscopia

Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM), o fluido magnético (9,5mgFe/mL) foi diluído em água deionizada na proporção de 1:200 e agitado vigorosamente por 20seg. As análises de MET, HRTEM e MEV foram realizadas no Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO Xerém/RJ) e as análises de AFM foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a caracterização em Microscopia Eletrônica de Transmissão, foram espalhados 4 μ L da solução contendo as NPM-citrato em telinhas de cobre de 300 mesh previamente cobertas com resina Formvar® e deixadas secar overnight dentro de placas de Petri. As análises foram feitas em Microscópio Eletrônico de Transmissão a 80 KV (Tecnai G2 Spirit, FEI). Para a determinação do tamanho médio da população de nanopartículas, 400 imagens de nanopartículas foram avaliadas quanto ao seu maior diâmetro no Software de Análises de Imagens Image ProPlus™. A partir dos dados obtidos, foi produzida uma curva de dispersão entre o diâmetro médio das nanopartículas e a frequência destas. O pico da dispersão gaussiana destes dados foi considerado o tamanho médio das nanopartículas. A avaliação do tamanho médio das NPM foi realizado somente nas imagens de MET pois estas imagens apresentam a menor distorção do objeto avaliado, em comparação com as outras técnicas de análise microscópica.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução – HRTEM

Para a caracterização em Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução, foram espalhados 10 μ L da solução contendo as NPM-citrato em telinhas de cobre de 400 mesh para alta resolução (*ultrathin carbon film supported by a lacey carbon film grid*, Ted Pella, Inc) e deixadas secar overnight dentro de placas de Petri. As análises foram feitas em Microscópio Eletrônico de Transmissão de Alta Resolução a 200 KV (JEOL 2100 F).

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para a caracterização em Microscopia Eletrônica de Varredura, foram espalhados 30 μ L da solução contendo as NPM-citrato sobre suporte metálico de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (stub), previamente limpo e com a superfície polida. Em seguida, o suporte contendo a amostra foi mantido em placa de Petri com sílica ativada, *overnight*, sob temperatura ambiente, para a secagem do material. Após o processo de secagem, as NPM-citrato foram recobertas com 5nm de ouro e então visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura a 5KV (Quanta FEG 450, FEI).

3.2.4 Microscopia de Varredura por Sonda/Força Atômica (AFM)

Para a caracterização em Microscopia de Varredura por Sonda, foram depositadas em mica, coberta ou não com poli-L-lisina, 15 μ L da solução contendo as NPM-citrato e deixada secar *overnight* à temperatura ambiente dentro de uma placa de Petri ou em um dessecador antes da realização das análises. As amostras foram analisadas no Microscópio de Força Atômica Multimode 8 (Bruker Corporation), no modo *tapping* (ponteiras em 3 N/m, a 75 kHz).

3.3 Ensaio de estabilidade das NPM-citrato

A fim de determinar a estabilidade do tamanho e da carga de superfície das NPM-citrato em meio aquoso, foram realizadas medições periódicas do seu diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta. Alíquotas das NPM-citrato (9,5mgFe/mL) foram mantidas à 4 °C, à temperatura ambiente (TA) e à 37 °C em microtubos esterilizados durante 12 meses. Cada uma das amostras foi diluída em água deionizada (1:50) e em tampão PBS (1:50) e as medições do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das NPM-citrato foram realizadas a cada 30 dias durante seis meses após a síntese e mais uma medição 12 meses após a síntese. O diâmetro hidrodinâmico foi determinado por meio de espalhamento dinâmico de luz e o potencial zeta por mobilidade eletroforética no aparelho ZetaSizer (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). As medições foram

realizadas em triplicata e os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico foram realizados em ângulo de medição de 90° e são apresentados por dispersão numérica.

3.4 Cultivo celular

As células MCF-7 (ATCC® HTB-22™) e MCF-10A (ATCC®CRL-10317™) foram gentilmente doadas pela profa. Dra. Maria Mitzi Brentani (Universidade de São Paulo - USP). As células MCF-7 foram cultivadas em meio GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com uma concentração final de 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de solução de antibióticos penicilina/estreptomicina (GIBCO). As células MCF-10A foram cultivadas em meio GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) suplementado com uma concentração final de 5% de soro de cavalo (GIBCO), 20ng/mL de fator de crescimento epidermal (SIGMA), 0,5µg/mL de hidrocortisona (SIGMA), 100ng/mL de toxina colérica (SIGMA), 10µg/mL de insulina humana (SIGMA) e 1% de solução de antibióticos penicilina/estreptomicina (GIBCO). Os cultivos foram mantidos em incubadora com atmosfera umidificada à 37 °C e com 5% de CO₂. Durante os experimentos, as exposições às NPM-citrato foram realizadas em células entre a terceira e a quinta passagem e a confluência dos cultivos variaram entre 60%-95%. Para garantir o número de passagens ao longo período de estudo, alíquotas de células foram produzidas e mantidas em tanque de nitrogênio líquido.

3.5 Perfil citotóxico/citostático das NPM-citrato

A fim de determinar o perfil citotóxico/citostático das NPM-citrato e detectar as concentrações sub-letais IC-10 e IC-20, foram realizados dois ensaios independentes: a exclusão de viabilidade por contagem de células coradas com Azul Tripán e o ensaio de citotoxicidade pela detecção da Lactato Desidrogenase (LDH).

3.5.1 Perfil de viabilidade celular por coloração com Azul Tripán

O corante vital Azul Tripán permite a exclusão de viabilidade celular, pois atravessa e deposita-se apenas no citoplasma de células com membranas plasmáticas

não-íntegras, enquanto não atravessa células com membranas plasmáticas íntegras. Dessa forma, podem-se distinguir células mortas (coradas em azul) de células vivas (não coradas). Foi adotado o protocolo utilizado por Reich-Slotky *et al* (2008), com modificações. Primeiramente, 50.000 células MCF-7 e MCF-10A foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços e mantidas em incubadora à 37 °C e com 5% de CO₂ durante 24h. Depois, as células foram expostas à uma solução de meio de cultivo contendo NPM-citrato por mais 24h, com as seguintes concentrações finais de ferro: 10, 30, 60, 100, 300, 600 e 900µg/mL. Para o controle, que representa 100% de viabilidade, as células foram incubadas com uma solução de meio de cultivo e tampão PBS também por 24h. A razão entre o volume de meio de cultivo em relação ao volume de tratamento foi igual em todas as condições. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado em tubos cônicos de 15mL e as células foram soltas do fundo dos poços mediante solução de tripsina-EDTA (GIBCO) por 5min à 37 °C. As suspensões de células foram adicionadas aos seus respectivos sobrenadantes para inativação da tripsina-EDTA e centrifugadas à 1000 RPM por 3min. Para garantir que todas as células foram coletadas, todas os poços foram visualizados cuidadosamente em microscópio invertido e recoletadas, quando necessário. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultivo. Uma alíquota de 10µL dessa suspensão foi coletada e homogeneizada com 40µL de solução de Azul Tripán à 0,4% (Merck). Dessa solução, 10µL foram aplicados em hematocitômetro (GIBCO) com auxílio de lamínula, permitindo a contagem de células viáveis e não-viáveis. Este experimento foi realizado em dois ensaios independentes em triplicata (N=6).

3.5.1.2 Análise Estatística

Para estimar a quantidade de células por amostra, o número médio de células contadas por quadrante foi multiplicado por 50000. Para cada grupo experimental (controle; tratamento 30µg/mL; tratamento 60µg/mL) a média aritmética das contagens foi obtida e avaliadas em uma dispersão entre a viabilidade celular e a concentração de NPM-citrato. Para a determinação do índice de citotoxicidade (IC10 e IC20), uma regressão não linear entre o percentual de redução da viabilidade celular e a concentração logarítmica das NPM-citrato foi obtida no Software GraphPrism™. A

interpolação da regressão não linear no gráfico permite a obtenção dos valores de IC10 e IC20.

3.5.2 Ensaio de detecção da lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase é uma enzima citosólica estável, que catalisa a interconversão de lactato e piruvato, e só é liberada no meio extracelular mediante lise da membrana plasmática. O ensaio de detecção da atividade de lactato desidrogenase, baseia-se no princípio que esta enzima, quando liberada no sobrenadante do cultivo pelas células mortas, promove a conversão do sal de tetrazólio em cristais de formazan vermelhos, que podem ser detectados por absorvância em espectrofotômetro (Mahmoudi *et al*, 2012). Este ensaio foi escolhido, pois apresentou baixa interferência com as NPM-citrato e, por avaliar a integridade da membrana plasmática após os tratamentos, permitiu confirmar os dados obtidos pela coloração com Azul Tripán e determinar se o efeito das NPM-citrato é citotóxico ou citostático. Para a realização do experimento, foram semeadas 10.000 células MCF-7 e MCF-10A em placas de poliestireno de 96 poços e mantidas em incubadora à 37 °C e com 5% de CO₂ durante 24h. Depois, as células foram expostas à uma solução de meio de cultivo contendo NPM-citrato por mais 24h, nas mesmas concentrações finais de ferro descritas na seção 3.5.1.1. Para os controles negativo (100% de viabilidade) e positivo (0% de viabilidade), as células foram incubadas com uma solução de meio de cultivo e tampão PBS também por 24h. A razão entre o volume de meio de cultivo em relação ao volume de tratamento foi igual em todas as condições. Após a incubação, foi realizado o teste colorimétrico de detecção da lactato desidrogenase (LDH) de acordo com as instruções do fabricante (Cytotox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega). Primeiramente, as placas foram centrifugadas à 250g por 4min e 40µL do sobrenadante dos tratamentos e do controle negativo foram transferidos para outra placa de poliestireno de 96 poços. As células do controle positivo foram lisadas utilizando-se 20µL da solução de lise do kit e incubadas por 1h à 37 °C. A lise completa das células foi verificada em microscópio invertido e 40µL do sobrenadante do controle positivo também foram coletados. Em seguida, 40µL do substrato da LDH foram adicionados aos poços e a reação foi incubada por 30min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Depois, foram adicionados 40µL do tampão de parada e a absorvância do comprimento

de onda de 490nm foi detectada pelo espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA). Para realizar o cálculo da porcentagem de LDH liberado pelas células, a densidade óptica (OD) dos controles e dos tratados foi subtraída dos seus respectivos brancos (NPM-citrato em diferentes concentrações sem a presença de células). A OD dos tratados foi então subtraída da média do controle negativo e depois dividida pela média do controle positivo. Este experimento foi realizado em dois ensaios independentes em triplicata (N=6).

3.6 Desenho experimental - ensaios de avaliação epigenética (seções 3.7-3.11)

A fim de detectar as alterações epigenéticas que ocorrem após a cessão do estímulo promovido pela exposição das células às NPM-citrato, os experimentos descritos nas seções 3.7-3.11 foram realizados conforme ilustrado a seguir (Fig. 3.1). Primeiramente as células foram semeadas e mantidas em incubadora a 37 °C e com 5% de CO₂ durante 24h. Esse processo é apresentado nos gráficos como -48h. Depois, as células foram expostas à uma solução de meio de cultivo contendo PBS (controle) ou NPM-citrato com as concentrações finais de ferro 30 e 60µg/mL por mais 24h. Essas concentrações foram escolhidas, pois são valores próximos aos IC10 e IC20 de MCF-7 e MCF-10A, conforme descrito na seção Resultados. Esse processo é apresentado nos gráficos como -24h. A razão entre o volume de meio de cultivo em relação ao volume de tratamento foi igual em todas as condições. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com tampão PBS duas vezes para remover o excesso de NPM-citrato e foi adicionado novo meio de cultivo. As células foram então analisadas imediatamente (0h) após ou 24, 48, 72 e 96h após a substituição do tratamento pelo meio de cultivo (0, 24, 48, 72 e 96, respectivamente).

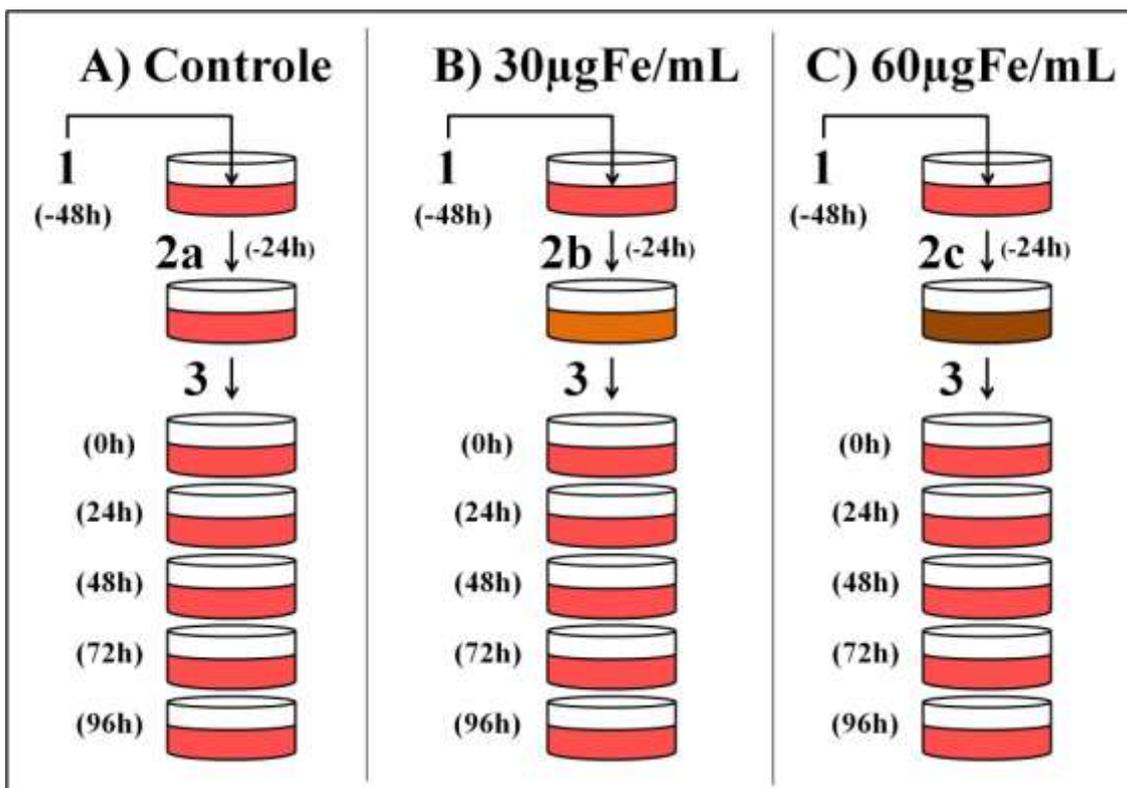


Figura 3.1. Desenho experimental dos ensaios das seções 3.7-3.10. As células foram semeadas (1) e tratadas com meio de cultivo contendo PBS (2a), NPM-citrato 30µgFe/mL (2b) ou NPM-citrato 60µgFe/mL (2c). Os tratamentos foram substituídos por meio de cultivo (3) e as células foram analisadas 0h, 24h, 48h, 72h e 96h após a remoção dos tratamentos (0, 24, 48, 72 e 96).

3.7 Dinâmica de proliferação celular

A detecção automatizada do índice de biomassa celular (índice celular) em tempo real foi realizada por meio de impedância eletrônica no sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA) e a dinâmica de proliferação foi analisada no software RTCA (Roche/ACEA). Aproximadamente 5000 células MCF-7 e MCF-10A foram semeadas em placas E-Plate16 (Roche/ACEA) e mantidas por 30min no fluxo laminar para a decantação das células. Primeiramente, a proliferação celular foi analisada durante 24h sem a exposição às NPM-citrato. Em seguida, o sistema de detecção foi interrompido e as células foram expostas às NPM-citrato (30 e 60µgFe/mL) por 24h. O sistema foi interrompido novamente e a solução de NPM-citrato foi removida, os poços foram lavados com tampão PBS, foi adicionado 200µL de meio de cultivo e a dinâmica de proliferação foi analisada por mais 96h. Os dados de proliferação celular são

apresentados de acordo com o tempo em função do índice celular, que é uma medida arbitrária e indica quantidade e espalhamento de células no fundo dos poços. Também foram realizadas análises de tempo de duplicação celular e IC50 tempo-dependente no software RTCA (Roche/ACEA). Este experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes (N=6).

3.7.1 Análise Estatística

A análise estatística do tempo de duplicação celular foi realizada de duas maneiras: (1) em intervalos de 24h e (2) durante todo o período do experimento. Para (1) foram procedidas análises de variância de dois fatores entre os dados de tempo de duplicação celular obtidos (ANOVA two-way com pós-teste Tukey). Os intervalos de confiança nesta análise foi de 95%, com $p=0,05$. Para (2) foi calculada a área sob a curva, no software GraphPrism™.

3.8 Detecção de ferro intracelular

Para determinar o perfil de interiorização das NPM-citrato nas células e se estas eram identificadas no ambiente intracelular durante todo o experimento, foi realizado o ensaio de detecção de ferro por meio da reação do Azul da Prússia. Aproximadamente 1.000 células MCF-7 e MCF-10A foram semeadas em placas de 6 poços sobre lamínulas autoclavadas e procedeu-se conforme descrito na seção 3.6. As células tratadas e não tratadas foram fixadas em metanol gelado por 3min. O fixador foi então removido e as lamínulas foram deixadas para secar em temperatura ambiente. A solução recém preparada de ferrocianeto de potássio 4% e ácido clorídrico 4% em proporção 1:1 foi adicionada por 15min. As lamínulas foram lavadas duas vezes com água deionizada e o corante de contraste vermelho neutro 0,5% foi adicionado por 2min. As células foram novamente lavadas duas vezes com água deionizada, deixadas secar à temperatura ambiente e as lamínulas foram montadas em lâminas com verniz vitral. Este experimento foi realizado em dois ensaios independentes em duplicata (N=4).

3.9 Análise ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de células MCF-7 tratadas com NPM-citrato

Para confirmar a interiorização das NPM-citrato pelas células MCF-7 e identificar sua sublocalização celular foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (Jeol, JEM-2100) na Universidade Federal do Goiás (UFG). Foram semeadas 10^6 células MCF 7 em garrafas de cultivo de 25cm^2 e submetidas à estratégia descrita em 3.6 (tratamento: $60\mu\text{gFe/mL}$; tempo: 48h). As células foram tripsinizadas, lavadas 2X com PBS aquecido ($37\text{ }^\circ\text{C}$) para retirar o meio de cultivo e fixadas em fixador Karnovski 0,1M por 24h à $4\text{ }^\circ\text{C}$. Depois foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (CaCo) 0,1M 2X por 10min. As células foram pós-fixadas com ferrocianeto de potássio e tetróxido de ósmio (1:1) por 30min ao abrigo da luz. A amostra foi lavada novamente 2X com CaCo e 1X com água destilada. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 2X 100%) por 10min em cada concentração. Posteriormente, foi realizada a infiltração da resina Spurr (Sigma) em concentrações crescentes de resina e decrescentes de acetona (2:1; 1:1; 1:2; 2X resina pura) durante 24h cada uma das trocas. A amostra foi então mantida à $65\text{ }^\circ\text{C}$ por 72h. A amostra, uma vez incluída no bloco de resina, foi cortada (cortes semi-finos e ultra-finos) em ultramicrotomo (Leica EM UC7, Leica Microsystems) e analisada em MET.

3.10 Perfil de metilação global de DNA de células MCF-7 e MCF-10A tratadas com NPM-citrato

A fim de detectar a cinética de metilação global de DNA após a cessão da exposição das células às NPM-citrato, foi realizado o ensaio de quantificação de metilação de DNA por meio do kit MethylFlash™ (Epigentek), segundo as orientações do fabricante. Primeiramente, 50.000 células MCF-7 e MCF-10A foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços e procedeu-se conforme descrito na seção 3.6. O DNA genômico das células foi extraído por meio do reagente DNAzol (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante. Após a incubação, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados $500\mu\text{L}$ de DNAzol diretamente nos poços à temperatura ambiente. Procedeu-se então a homogeneização cuidadosa para lisar as células e para que os sais de guanidina interagissem com o DNA, facilitando sua precipitação. O lisado celular foi coletado em microtubos de $1,5\text{mL}$ e foram adicionados $250\mu\text{L}$ de

etanol 100% gelado. A reação foi homogeneizada por inversão até a visualização do precipitado e incubada por 3min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à 4000g por 2min à 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o pellet de DNA foi lavado duas vezes, através da adição de 1mL de etanol 70% gelado e centrifugação à 4000g por 2min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas para secar por 10min com os microtubos abertos à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 30µL de água deionizada. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria no NanoDrop (Thermo) e uma alíquota de cada amostra foi ajustada para 50ng/µL. Para a detecção de metilação global de DNA, foram aplicados 80µL da solução de ligação e 2µL das amostras, 1µL do controle negativo e 1µL dos controles positivos nos poços da placa de 96 poços com alta afinidade por DNA. Foram utilizados 5 controles positivos (0,5;1,0;2,0;5,0;10,0ng/µL) para a construção da curva padrão. Os poços foram selados com Parafilm M e incubadas à 37 °C por 90min. A solução foi então descartada e os poços foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Foram adicionados 50µL do anticorpo de captura (1:1000), que foi incubado por 1h à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Em seguida, foram adicionados 50µL do anticorpo de detecção (1:2000), que foi incubado por 30min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por quatro vezes. Foram adicionados 50µL da solução de amplificação de sinal (1:5000), que foi incubada por 30min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por cinco vezes. Para detectar o sinal da metilação global de DNA, foram adicionados 100µL da solução de desenvolvimento, que foi incubada por 10min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 100µL de solução de parada e as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços de poliestireno para a leitura da absorbância (450nm) em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA). Este experimento foi realizado em dois ensaios independentes em triplicata (N=6).

3.10.1 Análise Estatística

Para determinar a quantidade de DNA metilado no genoma em porcentagem, primeiramente foi construída uma curva padrão com os valores de densidade óptica (OD) e a concentração definida dos controles positivos. Posteriormente foi determinado a inclinação da curva a partir da regressão linear por meio do software Microsoft Excel. Depois, as ODs das amostras foram subtraídas da média da OD do controle negativo e divididas pelo valor da inclinação da curva multiplicado por 2. Os valores já se encontravam em porcentagem, pois foram adicionados em cada poço 100ng de DNA. Os gráficos relativos à metilação global foram analisados de duas formas: (1) agrupados em função do tempo de observação, onde foram procedidas análises de variância de dois fatores entre os dados de metilação obtidos (ANOVA two-way com pós-teste Tukey); e (2) análises de regressão linear entre as concentrações de NPM utilizadas e a metilação observada, onde foram calculados os dados de correlação de Pearson entre estas duas variáveis (concentração de NPM-citrato e metilação global). Os intervalos de confiança nestas análises foram de 95%, com $p=0,05$.

3.11 Análise do acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de DNA metiltransferases

Após a cessão da exposição das NPM-citrato às células, foram semeadas 200.000 células em placas de poliestireno de 6 poços e procedeu-se conforme descrito na seção 3.6. O RNA total das células foi extraído por meio do kit de extração de RNA Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare), segundo as orientações do fabricante. As células MCF 7 foram coletadas por meio de tripsinização e centrifugadas por 3min à 1000 RPM. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 350 μ L de tampão de lise e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol. As amostras foram homogeneizadas e filtradas em colunas de filtragem, por meio de centrifugação à 11000g por 1min. A solução foi transferida para microtubos de 1,5mL livres de RNase e foram adicionados 350 μ L de etanol 70% gelado e homogeneizado 2 vezes por 5seg. As amostras foram então aplicadas em colunas de sílica e centrifugadas por 30seg a 8000g. O fluido foi descartado e foram adicionados 350 μ L de tampão de dessalinização diretamente nas colunas, que foram centrifugadas à 11000g por 1min. O fluido foi descartado e as amostras foram tratadas com 95 μ L de solução contendo DNase e incubadas por 20min

à temperatura ambiente. Posteriormente, 200µL de tampão de inativação da DNase foram adicionados às colunas, que foram centrifugadas à 11000g por 1min. Depois, as colunas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (600µL + 250µL) e centrifugadas à 11000g por 2min. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5mL livres de RNase e as amostras foram eluídas em 40µL de água deionizada livre de nucleases e armazenadas à -80 °C. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop (Thermo) e suas integridades foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X em condições livres de RNase. Para a obtenção dos cDNAs, as reações de transcrição reversa foram empregadas utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com orientações do fabricante. Para isso, 10µL do 2X RT Master Mix (2,0µL de 10X RT Buffer; 0,8µL de 25X dNTP Mix; 2,0µL 10X RT Random primers; 1,0µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 1,0µL de RNase Inhibitor; 3,2µL de água livre de nuclease) foram adicionados em cada uma das amostras de RNA total (1µg de RNA em 10µL de água). A reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 10min à 25 °C; 120min à 37 °C; 5min à 85 °C. As amostras foram diluídas em proporção 1:4 (20µL de RNA + 60µL de água livre de nuclease) e armazenadas à -20 °C. Os cDNAs resultantes foram utilizados como molde para amplificação dos genes de interesse. A quantificação dos RNAs mensageiros presentes nas diferentes condições de tratamento foi analisada por meio da técnica de PCR em Tempo Real, empregando-se o kit SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Para isso, 2µL dos cDNAs; 5µL do SYBR® Green Master Mix; 0,2µL do primer forward (10µM); 0,2µL do primer reverse (10µM) e 2,6µL de água foram aplicados por poço em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical (Applied Biosystems). As reações de PCR quantitativo foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50 °C por 20seg; 95 °C por 10min; 40 ciclos de 95 °C por 15seg e 60 °C por 1min; 95 °C por 15seg, 60 °C por 1min; 95 °C por 30seg e 60 °C por 15seg. Antes das reações de quantificação da expressão gênica, foi realizada a curva de eficiência dos primers, onde foi identificado que o GAPDH poderia ser usado como controle endógeno, pois seus valores de Ct (Cycle Threshold) não variaram significativamente entre as amostras. Os iniciadores foram obtidos da empresa Eurofins e suas sequências estão ilustradas na tabela 1.

Tabela 1. Sequência e tamanho do *amplicon* dos iniciadores de polimerização para os genes DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e GAPDH (Retirados de Logan *et al*, 2013).

Nome	Direto	Reverso	Amplicon
<i>DNMT1</i>	GGTTCTTCCTCCTGGAGAATGTC	GGGCCACGCCGTACTG	141pb
<i>DNMT3a</i>	CAATGACCTCTCCATCGTCAAC	CATGCAGGAGGCGGTAGAA	89pb
<i>DNMT3b</i>	CCATGAAGGTTGGCGACA A	TGGCATCAATCATCACTGGATT	69pb
<i>GAPDH</i>	AGAAGGCTGGGGCTCATTG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	258pb

3.11.1 Análise Estatística

Para analisar os dados de acúmulo de RNAs mensageiros foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Schmittgen & Livak, 2001). Os valores de quantificação relativa (RQ), quantificação relativa mínima (RQmin) e quantificação relativa máxima (RQmax) de cada uma das amostras dos dois experimentos independentes foi coletado. Foi realizada uma normalização entre as amostras de cada um dos tempos e seus respectivos controles, sendo que dessa forma, cada um dos controles dos diferentes tempos possuem quantificação relativa igual a 1 (RQ=1). O desvio padrão é dado de acordo com os valores de RQ, RQmin e RQmax. Os dados de acúmulo de transcritos foram analisados em função do tempo de observação, onde foram procedidas análises de variância de dois fatores entre os dados de metilação obtidos (ANOVA two-way com pós-teste Tukey). Os intervalos de confiança nestas análises foram de 95%, com $p=0,05$. Foram realizados 2 experimentos independentes cada um em triplicata (n=6).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização nanoscópica das NPM-citrato

Para determinar as características nanoscópicas das NPM-citrato, foram utilizadas as microscopias de transmissão convencional (MET), de transmissão de alta resolução (HRTEM), de varredura (MEV) e de força atômica (AFM). As fotomicrografias mostram que as NPM-citrato apresentaram morfologia esférica com superfície irregular (4.1 A,C e 4.1) e 10nm de diâmetro em média (Fig. 4.1 B). Na figura 4.3 pode-se observar a estrutura cristalina das NPM, evidenciando os planos paralelos de organização dos óxidos de ferro nas nanoestruturas. A estabilidade das NPM-citrato em fluidos em função do tempo e da temperatura foi realizada por meio de análises de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão em meio aquoso (água e PBS). Esses estudos foram realizados durante 12 meses e alíquotas de NPM-citrato foram mantidas a 4 °C, à temperatura ambiente (TA) e a 37 °C. Não foi possível avaliar os parâmetros de tamanho, carga e homogeneidade da amostra mantida a 37 °C 360 dias após a síntese, pois seu conteúdo aquoso havia evaporado. Quanto ao tamanho, as NPM-citrato apresentaram diâmetro hidrodinâmico entre $\approx 30\text{nm}$ e $\approx 60\text{nm}$ tanto em água quanto em PBS, com variação mínima quando mantidas a 4 °C e dispersas em PBS (16,225nm) e variação máxima quando mantidas a 37 °C e dispersas em água (31,91nm), conforme mostra a figura 4.4 (A e B). Quanto ao potencial zeta, as NPM-citrato apresentaram potencial zeta de $\approx -40\text{mV}$ em água e $\approx -25\text{mV}$ em PBS, com variação mínima quando mantidas a 37 °C e dispersas em PBS ($|1,83|\text{mV}$) e variação máxima quando mantidas à temperatura ambiente e dispersas em água ($|12,66|\text{mV}$), conforme mostra a figura 4.4 (C e D). Quanto à homogeneidade do fluido magnético, as NPM-citrato apresentaram índice de polidispersão $\leq 0,3$ tanto em água quanto em PBS, com variação mínima quando mantidas a 37 °C e dispersas em PBS (0,009) e variação máxima quando mantidas a 37 °C e dispersas em água (0,029), conforme mostra a figura 4.4 (E e F).

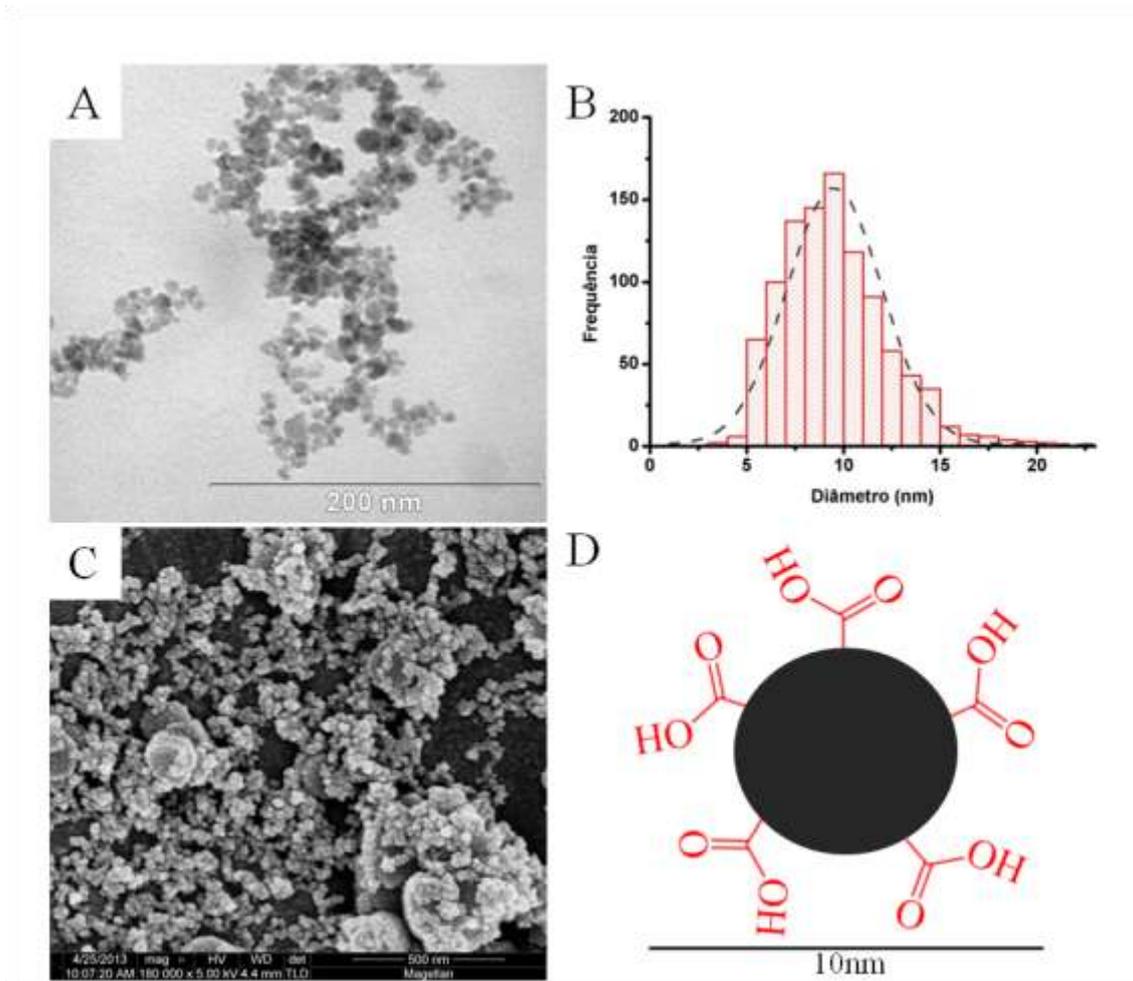


Figura 4.1. Caracterização das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. A. Eletromicrografia de Transmissão. Barra de escala: 200nm. B. Histograma do diâmetro de 1000 nanopartículas contadas, com média de 10nm. C. Eletromicrografia de Varredura. Barra de escala: 500nm. D. Modelo da organização da cobertura de citrato na superfície das nanopartículas de maghemita, evidenciando os grupamentos carboxila, de acordo com (Cheraghipour *et al*, 2012).



Figura 4.2. Fotomicrografia obtida por microscópio de força atômica das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. A superfície das NPM-citrato apresenta morfologia esférica com irregularidades. Barra de escala: 307,6nm.

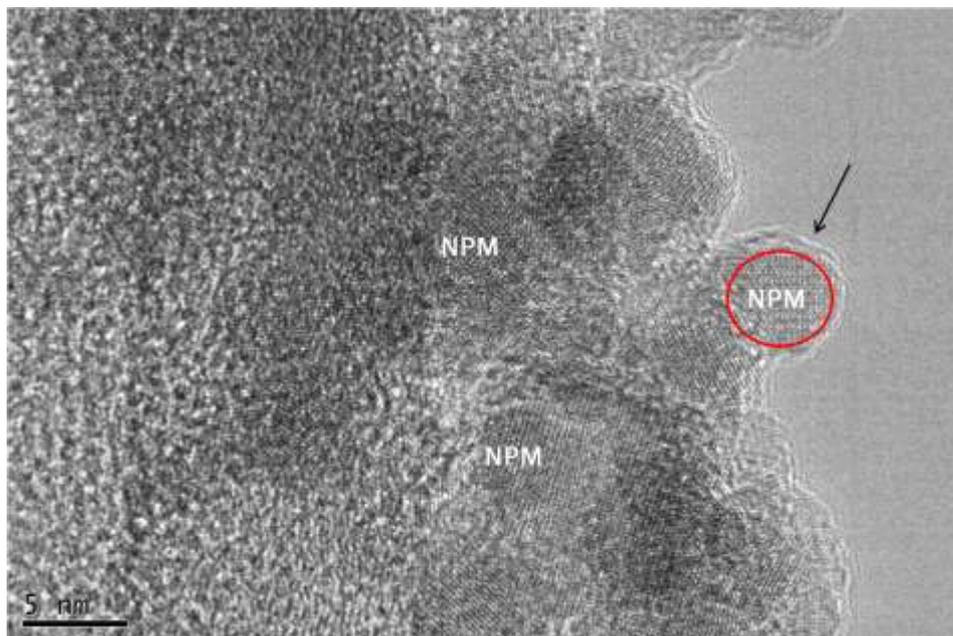


Figura 4.3. Eletromicrografia de Transmissão de Alta Resolução das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato. O círculo vermelho evidencia o núcleo de uma nanopartícula de maghemita. É possível visualizar a estrutura cristalina característica de óxidos de ferro. A seta indica a cobertura de citrato. Barra de escala: 5nm.

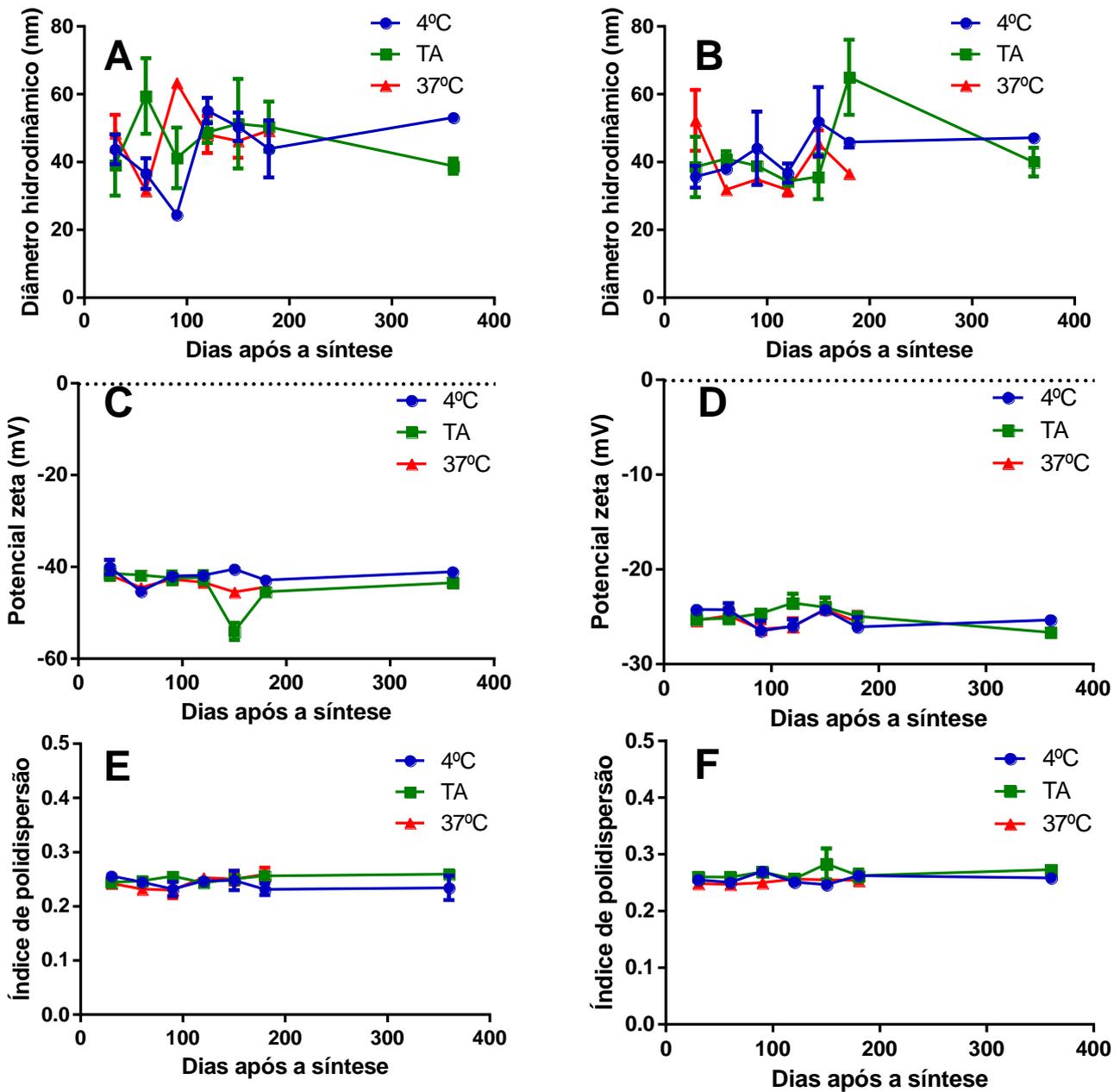


Figura 4.4. Análise de estabilidade das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato ao longo de 360 dias após a síntese. As amostras foram mantidas em 4 °C, temperatura ambiente ou 37 °C e foram realizadas as medições de diâmetro hidrodinâmico em água (A) e em PBS (B), potencial zeta em água (C) e em PBS (D) e índice de polidispersão em água (E) e em PBS (F).

4.2 Perfil citotóxico/citostático das NPM-citrato

Para determinar as concentrações de NPM-citrato que causavam redução na viabilidade celular e/ou inibição da proliferação das células MCF-7 e MCF-10A em 10% e 20% (IC10 e IC20), foi realizado o ensaio de exclusão de viabilidade por meio de contagem de células coradas com Azul Tripán. As células expostas a diferentes concentrações de NPM-citrato foram avaliadas e assim foi possível construir a curva de viabilidade celular.

A Figura 4.5 mostra que o número absoluto de células MCF-7 e MCF-10A vivas após 24h de exposição às NPM-citrato reduziu conforme se aumentava a concentração de NPM-citrato no meio de cultivo (10-600 μ gFe/mL). Esses dados permitiram construir uma curva de viabilidade (Fig. 4.6) e assim foram determinadas as IC10 de MCF-7 (27,85 μ gFe/mL) e de MCF-10A (20,44 μ gFe/mL) e as IC20 de MCF-7 (56,88 μ gFe/mL) e de MCF-10A (58,73 μ gFe/mL). Essas concentrações sub-letais foram escolhidas para análise, pois sabe-se que altas concentrações de ferro induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que por sua vez induzem hipometilação global (Franco *et al*, 2008). Para evitar que o efeito induzido pelas ERO mascarasse o efeito induzido pelas NPMs, foram escolhidas as concentrações IC10 e IC20. As células MCF-7 e MCF-10A mortas também foram contadas, porém não foi detectado aumento em seu número de forma concentração-dependente, como o esperado com base na contagem de células vivas, por se tratar de um sistema fechado (Fig. 4.5). Este fato poderia indicar um dos fenômenos biológicos descritos a seguir: as NPM-citrato induziam a morte celular imediata, mas as células mortas não poderiam ser identificadas ao microscópio, pois as membranas plasmáticas foram rompidas ou as NPM-citrato induziam um retardo no ciclo celular durante as 24h de sua exposição, o que explicaria a diminuição na curva de viabilidade de forma concentração-dependente e o baixo e constante número de células mortas detectada no ensaio. Por isso, foi adotado o método de avaliação de morte celular por rompimento da membrana plasmática, por meio da detecção da atividade da lactato desidrogenase presente no meio extracelular. A figura 4.7 mostra que as NPM-citrato não induziram morte celular em proporções significativas em nenhuma das concentrações testadas, tanto em MCF-7 quanto em MCF-10A. Esses resultados sugerem um efeito citostático em MCF-7 e MCF-10A das NPM-citrato em 24h de exposição.

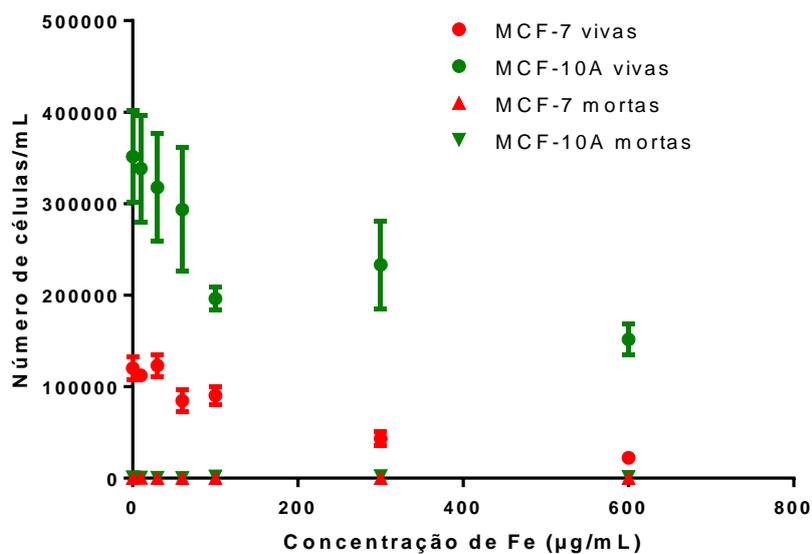


Figura 4.5. Contagem de células com auxílio do corante azul Tripán. As células foram tratadas com NPM-citrato (10-600µgFe/mL) por 24h e as células vivas e mortas foram contadas em hematocitômetro. Há uma diminuição no número de células vivas (MCF-7 e MCF-10A) de maneira concentração-dependente, mas não foi observado aumento significativo do número de células mortas em nenhum dos tipos celulares analisados.

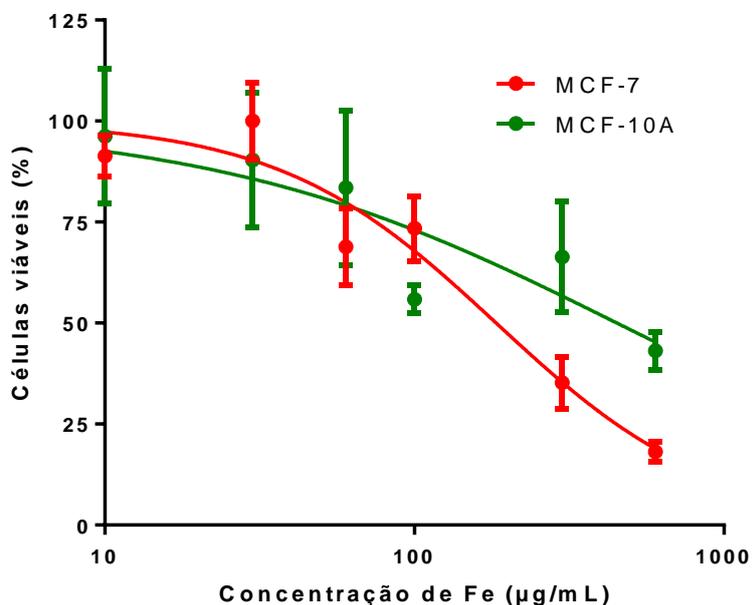


Figura 4.6. Curva de viabilidade celular após tratamento com NPM-citrato (10-600µgFe/mL) por 24h. Foi realizada a transformação logarítmica após a normalização dos dados da figura 4.5 para obtenção das IC10 e IC20 em MCF-7 e MCF-10A.

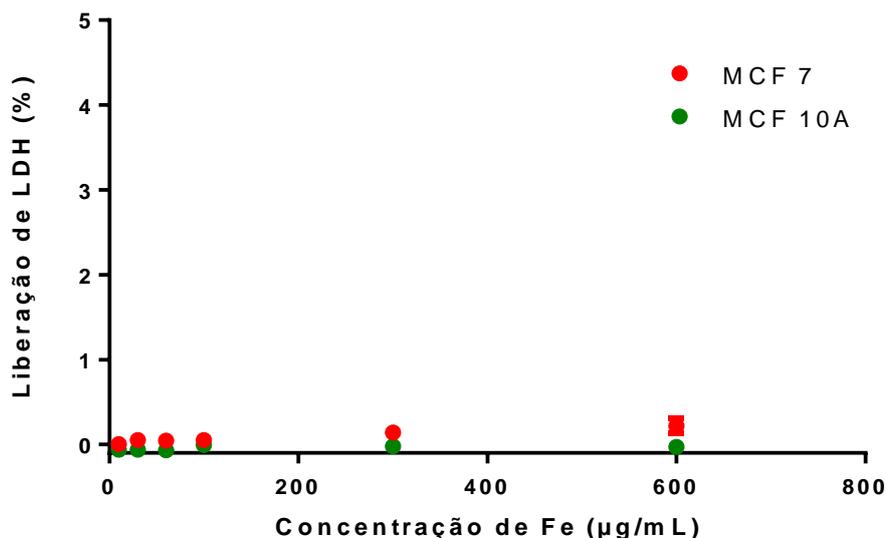


Figura 4.7. Ensaio de citotoxicidade por detecção da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). As células MCF-7 e MCF-10A foram expostas às NPM-citrato (10-600µgFe/mL) durante 24h e a enzima LDH do sobrenadante das células foi quantificada por ensaio colorimétrico. Não foi observada citotoxicidade por rompimento da membrana plasmática em nenhuma das concentrações testadas.

4.3 Perfil de proliferação das células MCF-7 e MCF-10A

Antes dos ensaios de investigação epigenética foi realizado um estudo da dinâmica de proliferação celular durante as três fases da estratégia experimental: antes da exposição às NPM-citrato, durante a exposição e após a cessão da exposição. Esse estudo foi realizado para identificar se as NPM-citrato interferem no proliferação celular mesmo após sua remoção. Com base nas IC10 e IC20 das células MCF-7 e MCF-10A, descritas na seção anterior, expôs-se as células a 30µgFe/mL e 60µgFe/mL e essas concentrações também foram adotadas para os próximos experimentos. A Figura 4.8 mostra que os perfis de proliferação celular de MCF-7 e MCF-10A em função do tempo. Durante o período de adaptação celular (-48h a -24h; Fig. 3.1), durante o qual não houve exposição de NPM-citrato, as células MCF-7 e MCF-10A apresentaram dinâmica de crescimento celular semelhante. Durante o período de tratamento (-24h a 0h; Fig. 3.1), as NPM-citrato inibiram a proliferação celular, tanto das MCF-7 quanto das MCF-10A, corroborando os dados obtidos nos experimentos descritos na seção 4.2. Após o período de tratamento, a solução de meio de cultivo contendo NPM-citrato foi cuidadosamente substituída por meio de cultivo, mas ainda assim esse processo refletiu em uma perda de células, evidenciado pela perturbação no índice celular no tempo 0h

(Fig. 4.8). Após a cessão da exposição das NPM-citrato, as células apresentaram diferentes perfis de proliferação. A taxa de proliferação das células MCF-7 foi crescente e constante, tanto no controle quanto nos tratados e a taxa de proliferação das células MCF-10A foi crescente até 24h no controle e no tratado com 30 μ gFe/mL e até 48h no tratado com 60 μ gFe/mL. Depois desses tempos, a taxa de proliferação das células MCF-10A decresceu, indicando morte celular. Além disso, pode-se verificar que as células MCF-7 expostas às NPM-citrato, mesmo após a substituição da solução de tratamento por meio de cultivo, apresentaram aumento na proliferação em relação ao controle, de forma concentração-dependente. A fim de confirmar esse fenômeno, foi analisado o tempo de duplicação celular por meio do software Real Time Cell Analyzer - RTCA (Roche). Posteriormente foi realizada uma análise do IC50 tempo-dependente após a cessão da exposição de NPM-citrato, que sugere que as células MCF-7 se tornaram mais resistentes após a retirada do tratamento. A figura 4.10 mostra que o IC50 tempo-dependente obteve seu máximo ponto aproximadamente 72h após a retirada do tratamento (72h). O IC50 é definido como a concentração de uma substância que inibe a proliferação celular *in vitro* em 50%. O aumento do IC50 em 72h indica que são necessárias mais NPM-citrato para inibir o crescimento celular. Não foi possível realizar as análises de tempo de duplicação e de IC50 tempo-dependente em células MCF 10A, devido ao perfil de proliferação dessas células.

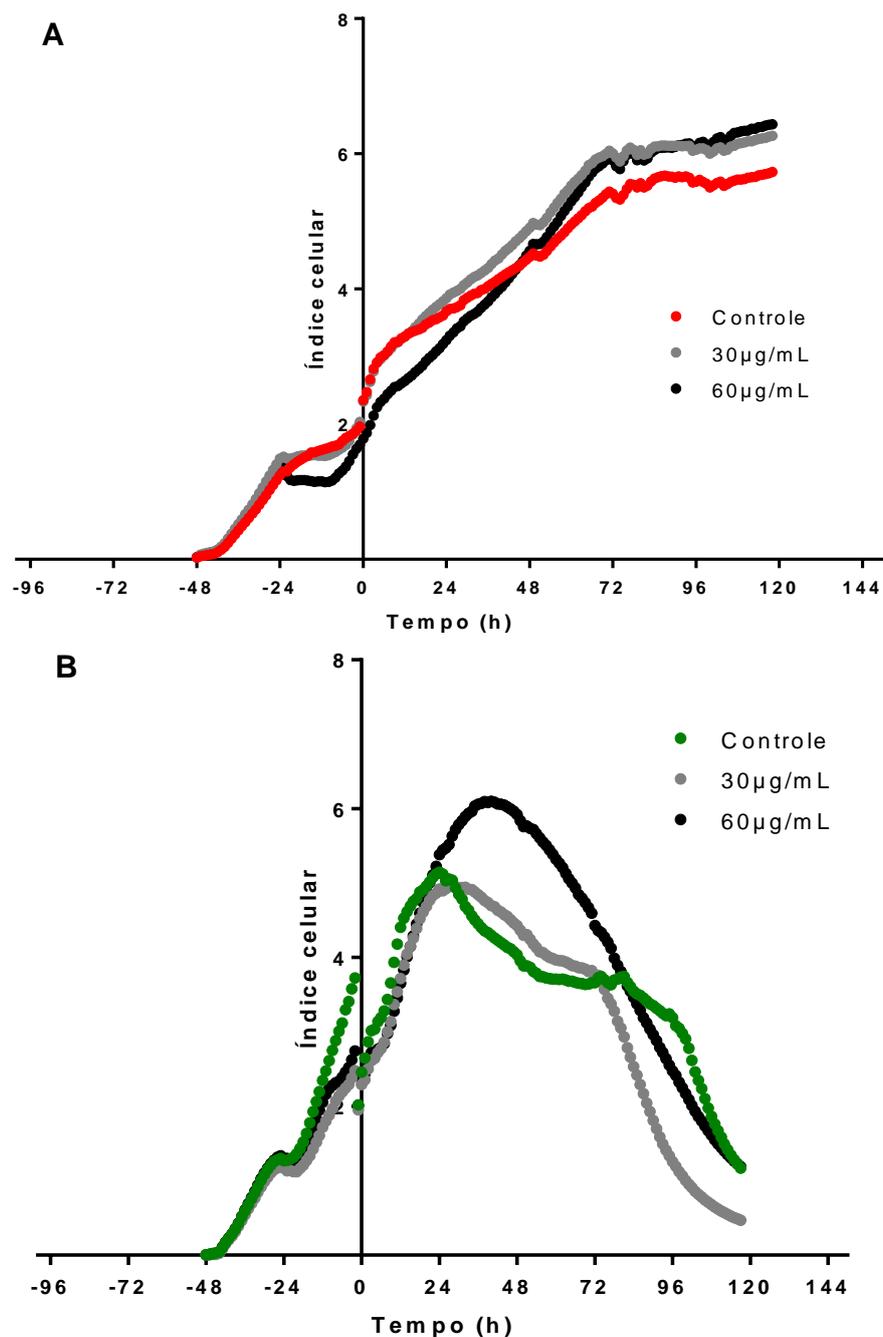


Figura 4.8. Análise da dinâmica de proliferação de células MCF-7 (A) e MCF-10A (B) segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Entre -48h e -24h o perfil de proliferação das células MCF-7 e MCF-10A é semelhante. Entre -24h e 0h percebe-se que as NPM-citrato inibem o crescimento das células MCF-7 e MCF-10A. Após 0h as células MCF-7 tratadas exibem taxa de proliferação maior que as células não tratadas (controle), enquanto as MCF-10A entram em processo de morte celular.

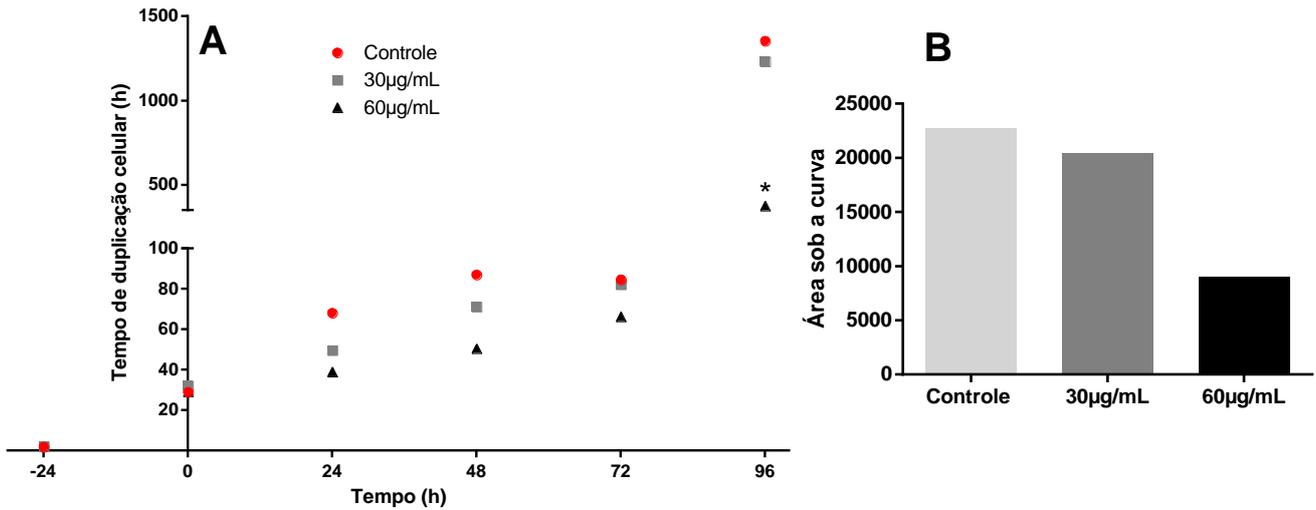


Figura 4.9. Tempo de duplicação de células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. (A) Comparação do tempo de duplicação celular entre os tratados e o controle em intervalos de 24h. A diferença estatística foi detectada por ANOVA two-way com pós teste Tukey. (B) Análise da área sob a curva da duplicação celular durante todo o período em estudo. As NPM-citrato induzem diminuição no tempo de duplicação celular de forma concentração-dependente, com conseqüente aumento na taxa de duplicação celular.

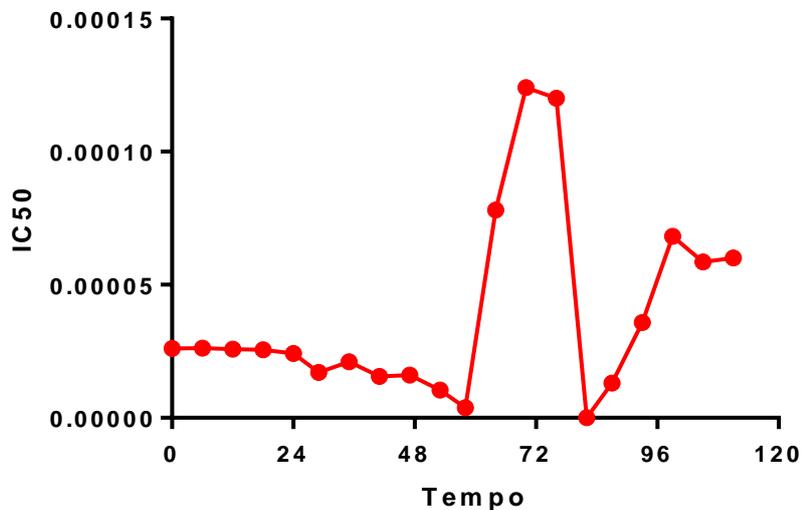


Figura 4.10. Análise do IC50 tempo-dependente em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. O IC50 das células tratadas apresenta um aumento em 72h, sugerindo um aumento da resistência das células ao tratamento com NPM-citrato.

4.4 Presença de ferro intracelular

O fator ambiental em análise nesse estudo é a presença das NPM-citrato. Para identificar se as NPM-citrato permaneciam no ambiente intracelular mesmo após a cessão de sua exposição e após as divisões celulares durante o período de análise (0h a 96h), foi realizado o ensaio de detecção de ferro pela reação do Azul da Prússia. Essa permitiu avaliar se a possível perturbação no perfil epigenético das células ocorreria em resposta apenas à presença das NPM-citrato no ambiente intracelular ou se apenas o fornecimento de NPM-citrato no meio extracelular durante o tratamento também exerceria alguma influência. As NPM-citrato foram identificadas durante todo o período em análise nos dois tipos celulares, porém se encontravam em menor quantidade em células MCF-7 (Fig. 4.11) em relação às células MCF-10A (Fig. 4.12). A quantidade de NPM-citrato identificadas em MCF-7 era pequena após a retirada do tratamento, devido a uma rápida metabolização das NPM-citrato após a interiorização ou ao fato de as NPM-citrato terem sido pouco interiorizadas durante o período de tratamento. A fim de investigar este fenômeno, foi realizada a reação do Azul da Prússia durante o período de tratamento. A figura 4.13 mostra que as NPM-citrato foram interiorizadas em grande quantidade após 10h de tratamento (Fig. 3.1), sugerindo que as NPM-citrato foram rapidamente metabolizadas pelas células MCF-7.

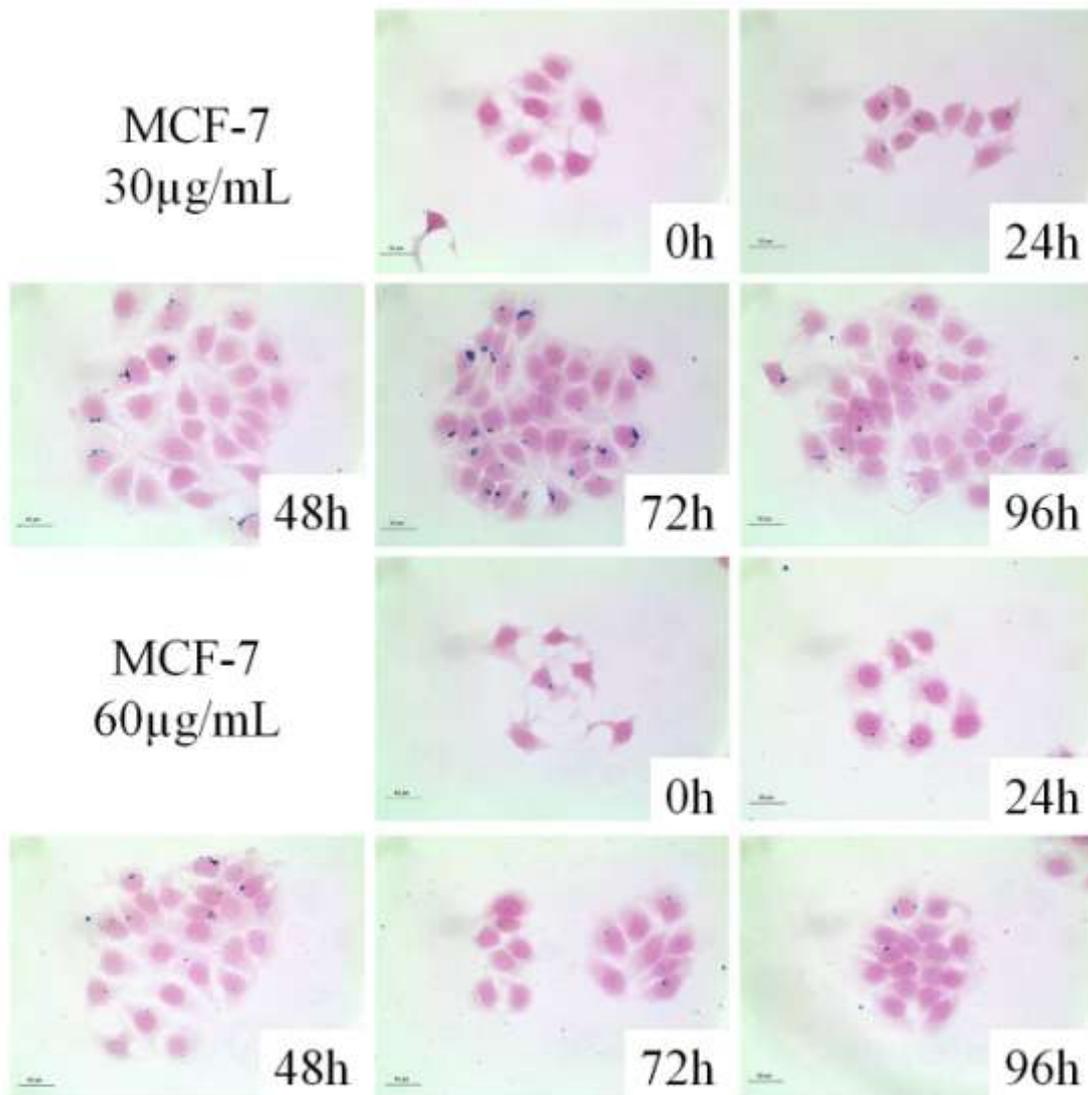


Figura 4.11. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Agregados de NPM-citrato podem ser identificados durante todo o período de estudo. Barra de escala 30µm.

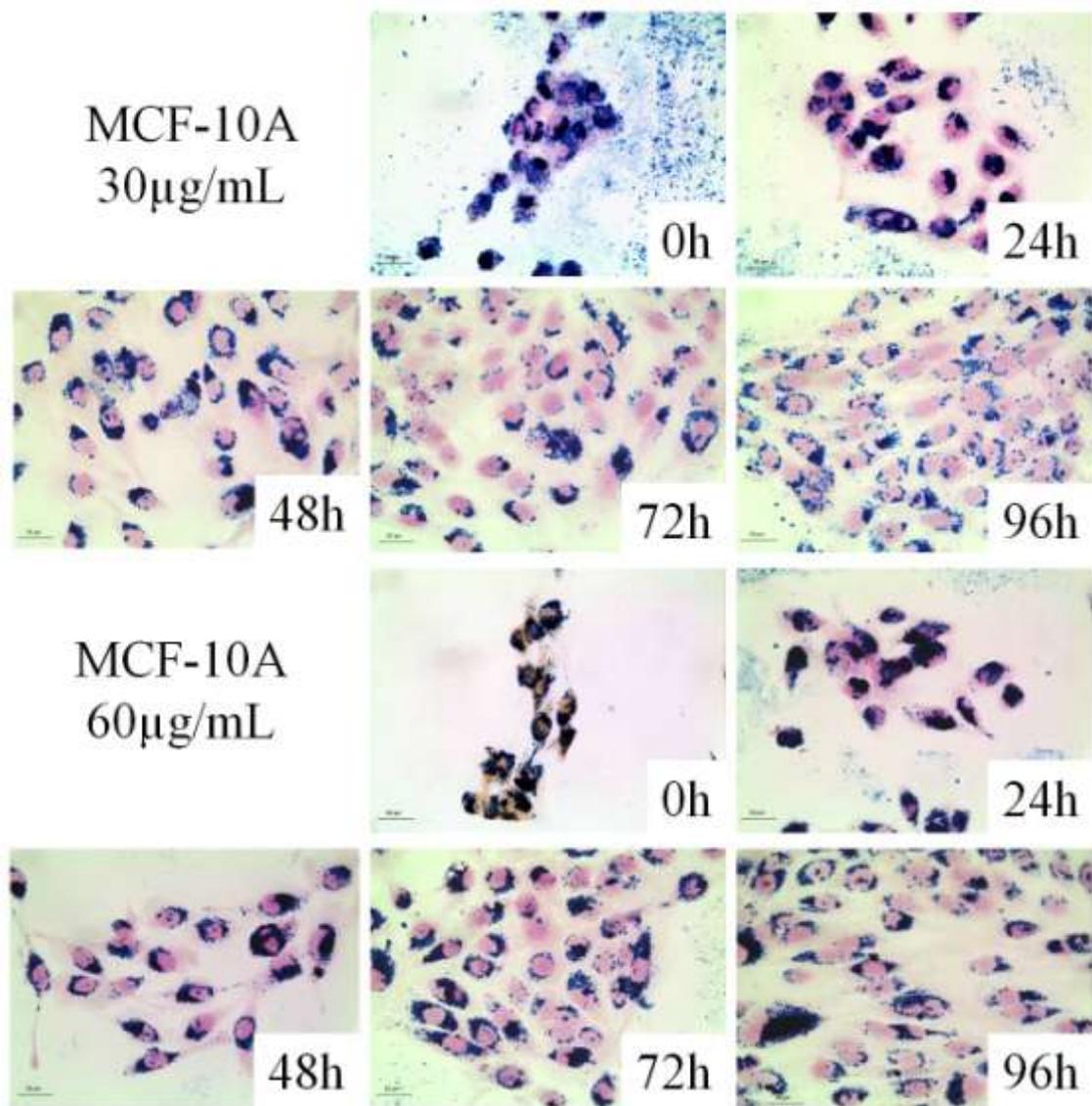


Figura 4.12. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-10A segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Agregados de NPM-citrato podem ser identificados durante todo o período de estudo. Barra de escala 30µm.

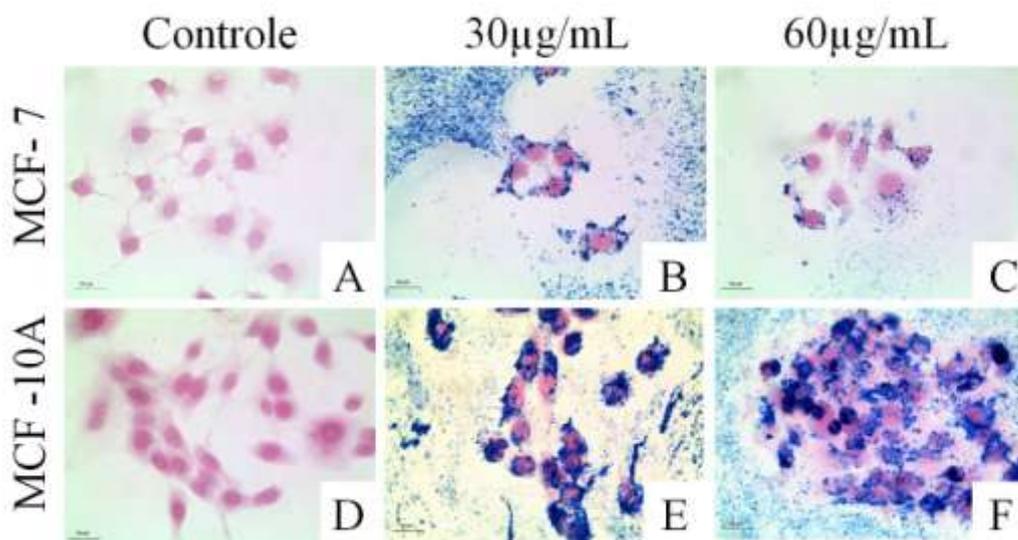


Figura 4.13. Detecção de ferro intracelular por meio da reação do Azul da Prússia em células MCF-7 e MCF-10A durante 10h de tratamento. As células MCF-7 e MCF-10A interiorizam uma grande quantidade de NPM-citrato. Barra de escala 30µm.

4.5 Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para confirmar a interiorização das NPM-citrato pelas células MCF-7 e determinar sua localização no ambiente intracelular foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET) das células segundo a estratégia experimental descrita em 3.6 (tratamento: 60µgFe/mL; tempos: 0h e 96h). A figura 4.14 mostra que as NPM-citrato se encontram no interior das células em agregados no citoplasma tanto em 0h (A) quanto em 96h (B), mas esses agregados foram identificados no núcleo apenas em 96h (B). Também foi possível visualizar NPM-citrato isoladas (imagem ampliada no canto superior esquerdo), conforme indica a análise de EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios-X). Essa análise permite identificar o núcleo das NPM-citrato e os planos paralelos da estrutura cristalina característica de óxidos de ferro.

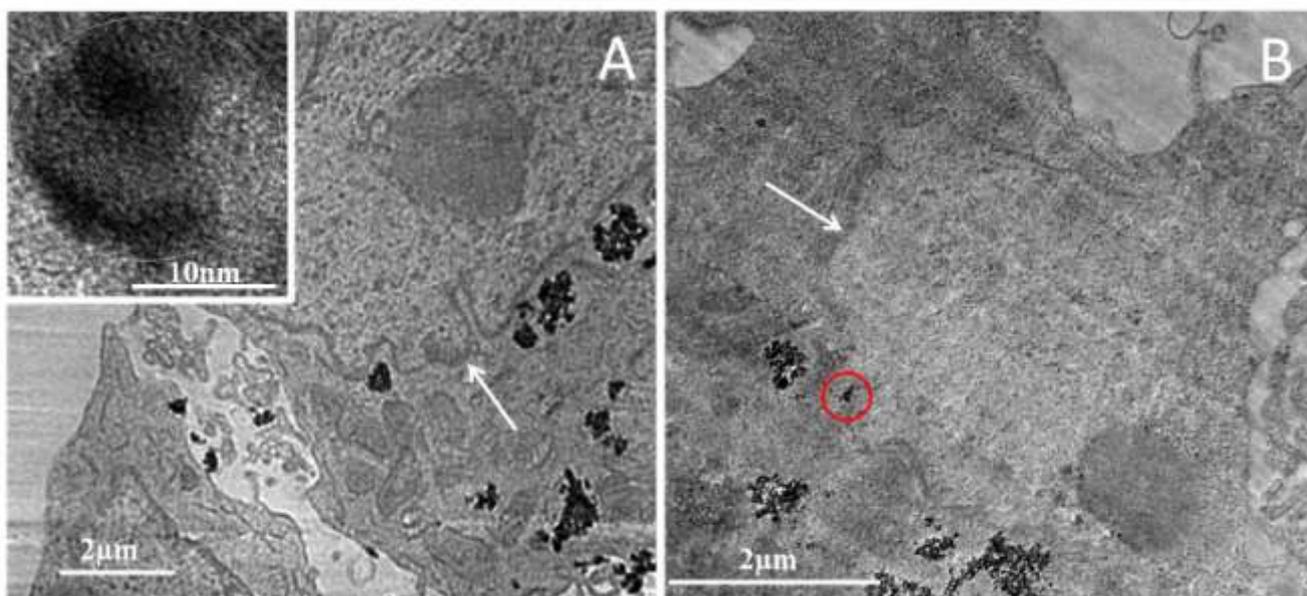


Figura 4.14. Microscopia Eletrônica de Transmissão de células MCF-7 tratadas com 60µgFe/mL nos tempos 0h (A) e 96h (B). As NPM-citrato organizam-se em agregados no citoplasma das células, mas também se encontram individualizadas (quadrante superior esquerdo). Apenas células em 96h apresentaram NPMs no núcleo (círculo vermelho). As setas indicam a membrana nuclear. Barra de escala: 2µm (célula) e 10nm (NPM-citrato).

4.6 Perfil de metilação global do DNA

A metilação de DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais bem caracterizados atualmente, cuja importância biológica deve-se a seu potencial em promover alterações herdáveis na expressão gênica independentes da sequência de nucleotídeos. A fim de identificar possíveis perturbações epigenéticas após a cessão da exposição das NPM-citrato às células MCF-7 e MCF-10A, foi realizado o ensaio de detecção colorimétrica da metilação global de DNA. Este ensaio não permite a identificação de regiões do DNA diferencialmente metiladas, mas informa se existem diferenças no perfil de metilação do genoma como um todo. As figuras 4.15 e 4.16 mostram a quantificação absoluta de DNA genômico metilado em células MCF-7 e MCF-10A de acordo com o desenho experimental descrito na seção 3.6. Verifica-se que a fração de DNA metilado corresponde a aproximadamente 1% do genoma das células MCF-7 (Fig. 4.15) e 3% do genoma das células MCF-10A (Fig. 4.16). Identificou-se redução na metilação global imediatamente após a cessão da exposição de 60µgFe/mL das NPM-citrato (0h) às células MCF-7 em relação ao controle (Fig. 4.15), sendo esta

diferença significativa pela análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way) com pós-teste Tukey. Quanto às células MCF-10A, não foram identificadas alterações significativas no perfil de metilação global após o tratamento com as NPM-citrato quando submetidas a esse mesmo teste estatístico em nenhum dos tempos em estudo (Fig. 4.16). Analisando-se o perfil de metilação global de DNA ao longo do tempo em células MCF-7, observou-se que a redução da metilação em 0h tratava-se de uma perturbação transitória, pois o perfil de metilação de DNA foi restaurado 72h após a cessão da exposição de 60 μ gFe/mL (Fig. 4.15). A fim de investigar se havia um efeito da concentração de NPM-citrato sobre a metilação de DNA nos dois tipos celulares, foi realizada a análise de correlação de Pearson (Fig. 4.17). Essa análise mostra que no tempo 48h há uma correlação positiva entre a concentração de NPM-citrato e a metilação de DNA, enquanto nos outros tempos essa correlação é negativa. Esses resultados mostram que as NPM-citrato induzem alterações no perfil de metilação de DNA em células MCF-7, causando uma hipometilação de DNA e que esse perfil é posteriormente restaurado.

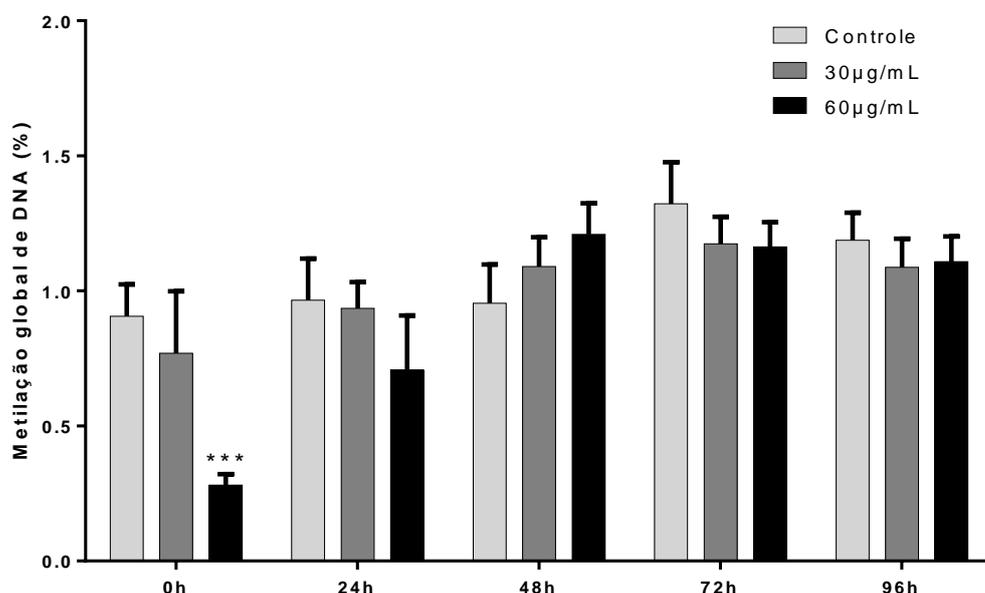


Figura 4.15. Perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Observa-se a hipometilação de DNA em células expostas à 60 μ gFe/mL imediatamente após a remoção do tratamento (0h). Após o período 24h ocorre a restauração gradual do perfil de metilação. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA two-way com pós-teste Tukey.

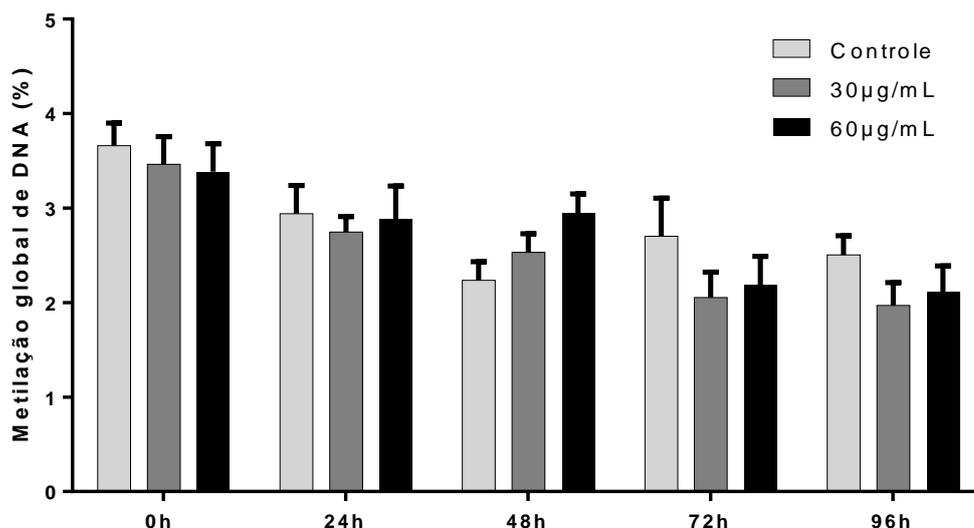


Figura 4.16. Perfil de metilação global de DNA em células MCF-10A segundo a estratégia descrita na seção 3.6. Não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos grupos pelo método ANOVA two-way com pós-teste Tukey.

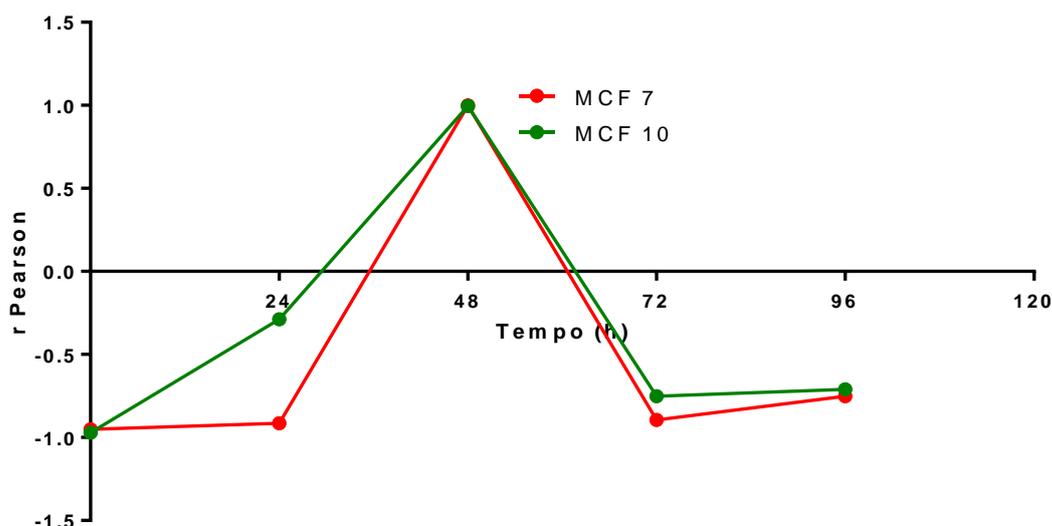


Figura 4.17. Análise de correlação de Pearson entre as concentrações utilizadas nos tratamentos e o tempo após a remoção das NPM-citrato. Observa-se uma correlação positiva em 48h e correlação negativa nos outros tempos analisados.

4.7 Análise do acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de DNMTs

De modo a esclarecer as bases moleculares das alterações de metilação observadas nas células tratadas com NPM-citrato, foi analisado o acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) em células MCF-7 segundo a estratégia experimental descrita na seção 3.6. Para isso, o RNA total das células foi extraído e por eletroforese em gel de agarose foi possível

determinar sua integridade. É possível notar que os RNAs extraídos estavam íntegros e livres de contaminação com DNA (Fig. 4.18). Estas amostras foram utilizadas para a síntese de moléculas de cDNA e posterior quantificação relativa de transcritos *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em relação ao controle endógeno *GAPDH*, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Esse estudo não foi realizado com células MCF-10A, visto que estas não apresentaram diferenças significativas no perfil de metilação após a exposição de NPM-citrato. Logo após a remoção do tratamento (0h), verificou-se diminuição do acúmulo de transcrito *DNMT1*, nas duas concentrações testadas (30 e 60µgFe/mL). Esse padrão é mantido até 24h e depois se inverte, com o aumento no acúmulo de transcritos em 48h, apenas em células tratadas com 30µg/ml. Em 72h observa-se novamente diminuição, mas apenas em células tratadas com 60µgFe/ml. Nenhuma diferença foi observada entre o controle e a amostra 96h após a cessão da exposição de NPM-citrato (Fig 4.19). Quanto aos transcritos correspondentes às metiltransferases *de novo*: *DNMT3A* apresentou aumento de acúmulo no tempo 48h nas células expostas a 30µgFe/mL (Fig. 4.20), enquanto para *DNMT3B*, esse aumento foi verificado em 24h e em 72h nas células tratadas com 60µgFe/mL (Fig. 4.21). É importante notar que o efeito da concentração 30µgFe/mL induziu aumento apenas da expressão da *DNMT3A*, enquanto a concentração 60µgFe/mL induziu aumento apenas na expressão da *DNMT3B*. Todas essas alterações foram verificadas por meio da análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way) com pós-teste Tukey. Esses estudos sugerem os possíveis mecanismos que levam às mudanças no perfil de metilação de DNA após a exposição de células MCF-7 às NPM-citrato.

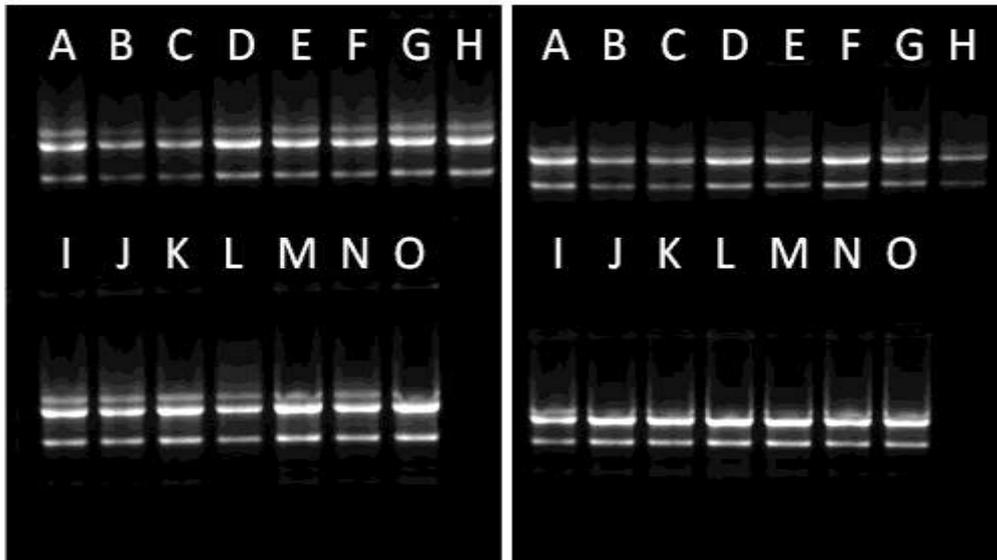


Figura 4.18. Análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL das amostras de RNA total de células MCF-7. Os RNAs utilizados na PCR em tempo real estavam íntegros e livres de contaminação com DNA. Cada fotografia refere-se a uma réplica biológica independente. (A) Controle 0h; (B) 30µgFe/mL 0h; (C) 60µgFe/mL 0h; (D) Controle 24h; (E) 30µgFe/mL 24h; (F) 60µgFe/mL 24h; (G) Controle 48h; (H) 30µgFe/mL 48h; (I) 60µgFe/mL 48h; (J) Controle 72h; (K) 30µgFe/mL 72h; (L) 60µgFe/mL 72h; (M) Controle 96h; (N) 30µgFe/mL 96h; (O) 60µgFe/mL 96h.

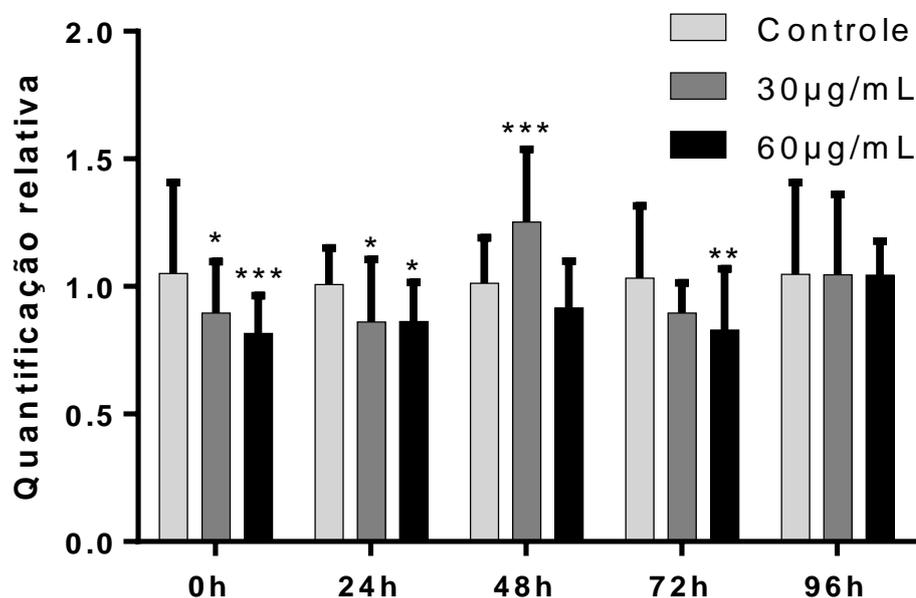


Figura 4.19. Quantificação dos transcritos *DNMT1* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. As diferenças estatísticas foram detectadas por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).

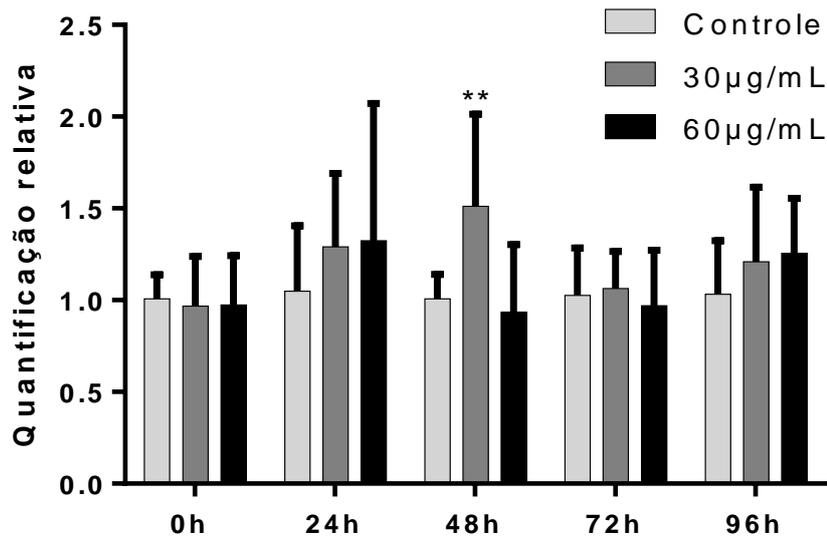


Figura 4.20. Quantificação dos transcritos *DNMT3A* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. A diferença estatística em relação ao controle foi detectada por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).

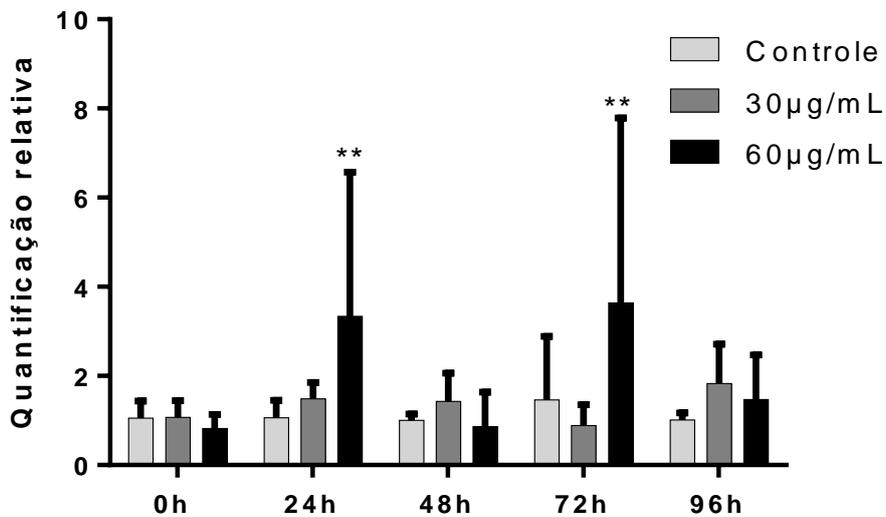


Figura 4.21. Quantificação dos transcritos *DNMT3B* em relação ao controle endógeno *GAPDH* em células MCF-7 tratadas com NPM-citrato. Diferença estatística detectada por ANOVA two-way (pós-teste Tukey).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Uma possível associação entre a nanotecnologia e a epigenética ainda é pouco estudada, pois se tratam de áreas de fronteira do conhecimento. Os nanomateriais possuem um risco intrínseco em aplicações biológicas, mesmo quando administrados em concentrações consideradas não-tóxicas e avaliados por meio de técnicas convencionais. Isso porque seus efeitos em sistemas biológicos podem se estender a múltiplas gerações, mesmo durante exposição transiente. Esse fenômeno pode ser a chave para a eficácia terapêutica ou pode desencadear efeitos adversos, conforme será discutido.

O presente trabalho mostra que nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (NPM-citrato) causaram efeito citostático em células MCF-7 e MCF-10A, quando administradas nas concentrações 30 e 60 μ gFe/mL durante as primeiras 24h de crescimento. Porém, após a cessão da exposição das NPM-citrato, verificou-se que a proliferação das células MCF-7 tratadas foi maior que das células não tratadas, o que não ocorreu para as MCF-10A. Além disso, foi constatado que as NPM-citrato encontravam-se no interior das MCF-7 e MCF-10A durante todo o experimento e que em células MCF-7 houve uma alteração dinâmica de metilação de DNA, mesmo em exposição transiente das NPM-citrato. Demonstramos ainda que é provável que esta dinâmica esteja associada com alterações no acúmulo de mRNA correspondentes às DNA metiltransferases.

Na literatura científica é relatado que os diversos parâmetros físico-químicos e morfológicos das nanopartículas como tamanho, forma, carga e agregação em solventes orgânicos ou inorgânicos podem influenciar na resposta biológica (Chaudhuri & Paria, 2012). Por isso, a busca de explicações para a modulação destes eventos ainda é fonte de grande atenção por parte da comunidade científica. É necessário, portanto, um grande rigor quanto ao controle de qualidade das amostras nanoestruturadas, a fim de obter resultados precisos e confiáveis.

Quanto às propriedades físico-químicas das NPM-citrato utilizadas no presente estudo, é possível afirmar que elas estão em conformidade com outros relatos na literatura científica. Segundo Kotsmar *et al* (2010), nanopartículas metálicas preparadas por coprecipitação de sais de ferro em meio alcalino geralmente possuem entre 3 e 10nm de diâmetro. O agente que confere estabilidade ao nanossistema, o citrato, mostrou-se bastante eficaz para a estabilização coloidal, assim como observado por Liu

et al (2009). Por ser um ânion pequeno ($[C_6H_5O_7]^{3-}$) em relação a outros ligantes de superfície de nanopartículas, o citrato adsorve no núcleo dos óxidos de ferro formando uma fina camada estabilizante, cuja carga é suficiente para manter as unidades de nanopartículas afastadas uma das outras por repulsão eletrostática, mesmo sob ação de força magnética entre os núcleos de óxido de ferro. Por possuírem morfologia irregular, como observado nas análises de microscopia, as NPM aumentam ainda mais sua área de superfície em relação ao volume, possivelmente permitindo a ligação de muitas moléculas de citrato com pouca influência sobre o tamanho, potencializando a formação do efeito de repulsão e estabilização eletrostático.

O fluido magnético utilizado no estudo mostrou-se bastante estável ao longo de todo o período de análise (360 dias) mesmo mantido sob diferentes temperaturas (4 °C, temperatura ambiente e 37 °C). O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das NPM-citrato foram semelhantes aos descritos por Andreas *et al* (2012). A observação de agregados nas imagens de microscopia é comum nas preparações de NPM. A observação desse tipo de imagem é um artefato de técnica, reflexo do processo de secagem das NPM para a sua observação nos equipamentos de microscopia. A remoção dos solventes de uma suspensão de nanoestruturas rompe com o equilíbrio soluto-solvente, gerando pequenos agregados que contribuem para uma desestabilização das amostras (Woehl *et al*, 2013).

Outros trabalhos também avaliaram esses parâmetros em diferentes formulações de nanopartículas em função do tempo (Morris *et al*, 2011; Wang *et al*, 2012), ressaltando a importância de realizar essas análises, que funcionam como um controle de qualidade para os testes biológicos. No entanto, não há relatos na literatura de um estudo sistemático da estabilidade de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato em diferentes condições de temperatura ao longo do tempo, o que justifica esses ensaios.

As características físico-químicas das NPM-citrato podem influenciar na interiorização e na biocompatibilidade em células MCF-7 e MCF-10A. Zhang *et al* (2008) atribuíram as diferenças na taxa de incorporação de nanopartículas de óxido de ferro aniônicas às cargas de superfície das células MCF-7 e MCF-10A. Durante o tratamento, as nanopartículas entram em contato com as proteínas e íons presentes no meio de cultivo e estabelecem interações que podem torná-las mais positivas. Esse fenômeno foi observado por Safi *et al* (2011), que demonstraram que as NPM-citrato aumentaram significativamente seu diâmetro hidrodinâmico (até 3µm) em 2h de

incubação com o meio de cultivo. É provável, em nossos resultados, que as NPM-citrato tenham se agregado antes da interiorização celular por mecanismos semelhantes aos citados acima (dados não publicados de nosso grupo de pesquisa). Porém, mesmo com a formação de agregados maiores no interior das células, NPM-citrato isoladas (Figura 4.14) na escala nanométrica foram observadas no citoplasma das células MCF-7. É possível que o ambiente citoplasmático possua um equilíbrio iônico diferente do meio de cultura, o que facilitaria a solubilização dos agregados de NPM-citrato, formando dispersões menores. Esse resultado é interessante, pois indica que nos ambientes intracelulares, as NPM-citrato podem retornar ao seu estado de organização nanométrico original.

No presente trabalho, foram identificadas mais NPM-citrato no interior de células MCF-10A em relação às MCF-7. Segundo Zhang *et al* (2008), as membranas de células MCF-10A (-30mV) são mais negativas que as membranas de MCF-7 (-20mV). Por meio de atração eletrostática, as NPMs depositam-se mais rápido na membrana plasmática das MCF-10A, o que explica a rápida interiorização de NPMs por meio de endocitose. Esse mecanismo de interiorização foi também observado por Wilhelm *et al* (2003). Apesar disso, após 24h de exposição Zhang *et al* (2008) identificaram mais NPMs nas MCF-7, mesmo com a interiorização mais lenta.

Outro fato interessante é que as NPM-citrato não foram encontradas no núcleo em 0h, mas foram encontradas em 96h, de acordo com as análises de microscopia eletrônica de transmissão (figura 4.14). Não se pode, entretanto, afirmar se a presença das NPM-citrato é fruto da passagem destas pela membrana nuclear, ou se estas foram acumuladas na região durante alguma etapa da mitose, quando teriam interagido com o DNA após o rompimento da carioteca na prófase, mantendo-se posteriormente no núcleo após a telófase.

Muitos estudos têm investigado as alterações no metabolismo do ferro em células de câncer de mama (Torti & Torti, 2013; Bystrom *et al*, 2014). As alterações mais comuns são a alta expressão do receptor de transferrina 1 (TFR1) e baixa expressão de ferroportina em modelos *in vitro* e *in vivo*, indicando que as células cancerosas demandam altos níveis de ferro para sua sobrevivência. Além disso, um estudo mais amplo identificou um conjunto de 61 genes relacionados ao metabolismo do ferro que são alterados nessa patologia e um subconjunto de 16 genes que podem ser usados para identificar o prognóstico das pacientes (Miller *et al*, 2011). Portanto, os níveis de ferro intracelular devem ser bem regulados para a manutenção da homeostase,

pois uma desregulação no metabolismo do ferro pode induzir a transformação maligna de células de epitélio mamário, assim como de outros tipos teciduais. Sabe-se que o ferro, em concentrações ideais, participa de diversas reações fundamentais para a viabilidade celular, como a síntese de DNA e a respiração celular. No entanto, altas concentrações de ferro podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da reação de Fenton. As EROs, quando em baixas concentrações, podem funcionar como moléculas de sinalização e desencadear diferenciação ou morte celular, assim como respostas contra parasitas, dependendo da necessidade da célula. Porém, altas concentrações de EROs podem levar ao estresse oxidativo, causando danos às membranas celulares e às moléculas de DNA. O estresse oxidativo crônico é um dos mecanismos responsáveis pela transformação maligna de células, levando ao câncer. Por sua vez, a indução de níveis agudos de estresse oxidativo no tecido tumoral tem o potencial de parar o crescimento das células cancerosas ou até mesmo destruí-las (Foy & Labhasetwar, 2011; Bystrom *et al*, 2014).

A disponibilidade de ferro nas células durante sua aplicação na clínica deve então ser cautelosamente estudada. Nanopartículas de óxido de ferro podem levar a efeitos citotóxicos/citostáticos em células de câncer de mama ou até mesmo estimular seu crescimento, dependendo da dose. Nesse estudo, as NPM-citrato, quando administradas em 30 e 60 μ gFe/mL em células MCF-7 e MCF-10A apresentaram uma dinâmica regulada, dependente da concentração e do período de exposição. Durante o período de 24h, as células sofreram uma diminuição na taxa de proliferação celular sem terem sido levadas à morte (efeito citostático). Outros estudos com NPM-citrato também discutem sua excelente biocompatibilidade em células-tronco embrionárias humanas e em células de melanoma em cultivo (Freitas *et al*, 2013; Freitas *et al*, 2008). Após a cessão da exposição de NPM-citrato, a proliferação das células MCF-7 aumentou em relação às células não tratadas. Esse aumento da viabilidade celular em MCF-7 após tratamento com NPM-citrato também foi verificado por Klein *et al* (2012) em até 72h de exposição com 100 μ gFe/mL. O mecanismo que leva a esse aumento pode estar relacionado à disponibilidade de ferro anteriormente discutida.

Diferentes respostas a nanopartículas magnéticas já foram reportadas em modelos biológicos *in vitro* (citotoxicidade, genotoxicidade, rotas metabólicas e interferência na proliferação celular) e *in vivo* (biodistribuição e biocompatibilidade), porém pouco se sabe a respeito de potenciais efeitos epigenéticos desses nanosistemas (Mahmoudi *et al*, 2012).

A Epigenética é o estudo dos fatores ou processos moleculares herdáveis por mitose ou por meiose e potencialmente reversíveis que regulam a atividade genômica de forma independente da sequência de DNA (Skinner, 2011). Essa regulação pode sofrer alterações desencadeadas por fatores ambientais externos e afetar mais de uma geração de organismos, mesmo após a ocorrência das alterações ambientais. Neste trabalho, as NPM-citrato representaram o fator ambiental que induziu modificações epigenéticas (metilação global de DNA) em células de câncer de mama, mas não em epitélio mamário de origem não-tumoral *in vitro*, mesmo após a cessão de sua exposição. A avaliação do perfil de metilação global de DNA e de acúmulo de mRNAs codificadores de DNA metiltransferases demonstraram que até mesmo concentrações consideradas não-tóxicas por técnicas laboratoriais de rotina podem induzir uma remodelação no perfil epigenético, dependente do tempo e da concentração de nanopartículas utilizadas no tratamento. Esse perfil pode ser alterado de modo permanente ou reversível, por isso destaca-se a necessidade de padronizar estudos de toxicidade de nanomateriais a longo prazo, tanto nos níveis tradicionais (genético e metabólico, por exemplo) como no nível epigenético. Não é possível, porém, de acordo com os resultados obtidos, determinar se: (1) as células voltam ao estado epigenético/metabólico anterior ao tratamento; se (2) sofrem alterações permanentes em seu estado epigenético/metabólico; ou se (3) sofrem alterações reversíveis em seu estado epigenético/metabólico. Ainda, dentro dos possíveis fenótipos alterados, as células podem, por exemplo, se tornar mais sensíveis ou mais resistentes a quimioterápicos, devido ao seu grau de tumorigenicidade modificado. É provável também que as três possibilidades ocorram simultaneamente no epigenoma, dependendo do *locus* analisado. Assim, alguns *loci* podem voltar ao seu perfil epigenético original, enquanto outros permaneceriam alterados (de forma permanente ou reversível).

Mesmo não tendo sido analisados os sítios que foram alterados no epigenoma, são possíveis fazer algumas suposições. Infere-se que, antes da exposição de NPM-citrato e durante as divisões celulares, as células apenas replicavam seu epigenoma a fim de mantê-lo nas células-filhas, regulando os mesmos genes essenciais para sua sobrevivência. Após a exposição transiente de NPM-citrato, as células MCF-7 sofrem em um primeiro momento uma hipometilação global de DNA e em seguida vão, aparentemente, recuperando seu estado de metilação (figura 4.15). No entanto, os ensaios de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) dos transcritos de DNA metiltransferases sugerem que ocorra a metilação de sítios anteriormente não metilados

no DNA das células MCF-7, possivelmente em resposta à presença das NPM-citrato. Índícios da ocorrência desse evento podem ser verificados nas figuras 4.19, 4.20 e 4.21, nos quais o acúmulo de transcritos de *DNMT1* (DNA metiltransferase de manutenção) diminui em 0h, 24h e 72h, enquanto os de *DNMT3A* e *DNMT3B* (DNA metiltransferases *de novo*) aumentam em diferentes tempos. Mesmo sabendo que as *DNMT3A* e *DNMT3B* podem apresentar atividade de metilação de manutenção (Jones & Liang, 2009), sabe-se que a regulação dessas enzimas em câncer é defeituosa (Bergman & Cedar, 2013), o que levanta a possibilidade de que novos sítios possam ter sido metilados.

Sugere-se ainda, pelas análises de IC50 tempo-dependente e de tempo de duplicação, que as células MCF-7 tenham se tornado mais resistentes à presença das nanopartículas (em 72h) e que não apresentaram inibição da proliferação celular por contato (em 96h). Tais dados indicam que genes relacionados com o ciclo celular possam estar diferencialmente expressos em relação ao controle. Nos experimentos realizados, as células MCF-10A não sofreram alterações significativas em seu estado epigenético global, o que não descarta a possibilidade de modificações loci-específicas sem manifestação fenotípica.

Este é o primeiro trabalho realizado a respeito da exposição transiente de nanopartículas e sua relação com modificações epigenéticas. A identificação dos mecanismos responsáveis por essa interação torna-se fundamental para o direcionamento das aplicações biológicas de nanossistemas, com mínimos efeitos adversos. A exposição transiente de um fármaco, por exemplo, pode levar tanto à indução quanto à inibição da tumorigenicidade.

Tsai *et al* (2012) demonstraram que a exposição de concentrações não-tóxicas de agentes de desmetilação do DNA (Decitabina e 5-Azacidina) durante 3 dias, seguida de remoção da droga, diminuiu a tumorigenicidade a longo prazo em diversos tipos de células de leucemia (Kasumi-1 e KG-1) e câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e T-47D) em cultivo em monocamada, cultivo 3D e em xenotransplantes em modelos *in vivo*. Esse mesmo efeito foi observado também em células de cultivo primário derivadas de pacientes com leucemia mielóide aguda, mas não em células normais de medula óssea. Esses autores detectaram uma diminuição na expressão de *DNMT1* nas células imortalizadas e uma posterior recuperação após a remoção do tratamento. Verificaram também a desmetilação de promotores de diversos genes e um aumento da expressão gênica, inclusive para genes supressores de tumor, o que explicaria os efeitos

antitumorais a longo prazo. No entanto, Raggi *et al* (2014) demonstraram que a exposição de zebularina, um inibidor de DNMT1, durante 3 dias, seguido de remoção da droga em células de hepatocarcinoma celular em cultivo levou a diferenças na tumorigenicidade das células-filhas (de uma a cinco gerações, em cultivo 3D) de forma dependente da densidade celular. Assim, células crescidas em baixa densidade produziram células-filhas com maior tumorigenicidade e vice-versa, mesmo após a recuperação da expressão de *DNMT1*. Tal estudo mostra que outros fatores além da concentração da droga são importantes para direcionar o tratamento a longo prazo. Nossos resultados indicam que NPM-citrato podem atuar como moduladores da expressão de genes relacionados à metilação do DNA, e conseqüentemente, da plasticidade fenotípica sem a necessidade de mutações de sequencia de bases.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As nanopartículas de maghemita funcionalizadas com cobertura de citrato (NPM-citrato) promovem alterações significativas no perfil de metilação global de DNA em células humanas de câncer de mama (MCF-7) e não promovem alterações significativas em células de epitélio mamário de origem não-tumoral (MCF-10A) em cultivo, mesmo em exposição transiente em concentrações não-tóxicas. Os experimentos realizados sugerem que as alterações em MCF-7 podem estar relacionadas com a tumorigenicidade dessas células. As NPM-citrato mostraram-se bastante estáveis durante todo o período de estudo sob diferentes concentrações de temperatura, indicando uma boa qualidade do material utilizado, que contribuiu para a reprodutibilidade dos ensaios.

É necessário então, tornar a avaliação de toxicidade em nível epigenético como padrão, além dos outros testes toxicológicos. A investigação dos mecanismos epigenéticos em resposta as diferentes aplicações biológicas de nanomateriais pode revelar uma toxicidade antes não observada e levar também ao melhoramento das estratégias utilizadas durante as aplicações, podendo inclusive diminuir os efeitos adversos frequentemente observados. Ainda, os efeitos de herança transgeracional em modelos animais devem ser avaliados, a fim de estabelecer níveis seguros da exposição dos nanomateriais em mais de uma geração de organismos, mesmo não expostos diretamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C. P.; SHEN, M.; EISENSTEIN, R. S.; LEIBOLD, E. A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1468-1483, 2012.

ANDREAS, K.; GEORGIEVA, R.; LADWIG, M.; MUELLER, S.; NOTTER, M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. **Biomaterials**, v. 33, n. 18, p. 4515-4525, 2012.

ARAND, J.; SPIELER, D.; KARIUS, T.; BRANCO, M. R.; MEILINGER, D.; MEISSNER, A.; JENUWEIN, T.; XU, G.; LEONHARDT, H.; WOLF, V.; WALTER, J. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2012.

BALANSKY, R.; LONGOBARDI, M.; GANCHEV, G.; ILTCHEVA, M.; NEDYALKOV, N.; ATANASOV, P.; TOSHKOVA, R.; FLORA, S.; IZZOTTI, A. Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 751-752, p. 42-48, 2013.

BARLOW, D. P. Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 379-403, 2013.

BERGMAN, Y.; CEDAR, H. DNA methylation dynamics in health and disease. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 3, 2013.

BOLLATI, V.; BACCARELLI, A. Environmental epigenetics. **Heredity**, v. 105, p. 105-112, 2010.

BYSTROM, L. M.; GUZMAN, M. L.; RIVELLA, S. Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells? **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 20(12), p. 1917-1924, 2014.

CHANDRAN, P.; KAVALAKATT, A.; MALARVIZHI, G. L.; VASANTHAKUMARI, D. R. V. N.; RETNAKUMARI, A. P.; SIDHARTHAN, N.; PAVITHRAN, K.; NAIR, S.; KOYAKUTTY, M. Epigenetics targeted protein-tyrosine kinase inhibitor nanomedicine inducing apoptosis in heterogeneous population of primary acute myeloid leukemia cells including refractory and relapsed cases. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 721-732, 2014.

CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2373-2433, 2012.

CHEN, Z.; RIGGS, A. D.; DNA Methylation and Demethylation in Mammals. **The journal of biological chemistry**, v. 286, n. 21, p. 18347-18353, 2011.

- CHERAGHIPOUR, E.; JAVADPOUR, S.; MEHDIZADEH, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 5, p. 715-719, 2012.
- CHOI, A. O.; BROWN, S. E.; SZYF, M.; MAYSINGER, D. Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 291-302, 2008.
- FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 97-109, 2012.
- FOY, S. P.; LABHASETWAR, V. Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure? **Biomaterials**, v. 32, p. 9155-9158, 2011.
- FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 6-11, 2008.
- FREITAS, E. R. L.; SOARES, P. R.; SANTOS, R. P.; SANTOS, R. L.; DA SILVA, J. R.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; DE OLIVEIRA LIMA, E. C.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. In vitro biological activities of anionic γ -Fe₂O₃ nanoparticles on human melanoma cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2385-2391, 2008.
- FREITAS, E. R. L.; SANTOS, R. L.; DE OLIVEIRA LIMA, E. C.; GUILLO, L. A. Feeder-free culture of human embryonic stem cell line BG01V/hOG using magnetic field-magnetic nanoparticles system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 1, p. 17-21, 2013.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1733-1736, 2004.
- GONG, C.; TAO, G.; YANG, L.; LIU, J.; LIU, Q.; ZHUANG, Z. SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 397, n. 3, p. 397-400, 2010.
- GONG, C.; TAO, G.; YANG, L.; LIU, J.; LIU, Q.; LI, W.; ZHUANG, Z. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO₂-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. **Toxicology Letters**, v. 209, n. 3, p. 264-269, 2012.
- GROSSNIKLAUS, U.; KELLY, W. G.; FERGUSON-SMITH, A. C.; PEMBREY, M.; LINDQUIST, S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 228-235, 2013.
- HALLEY-STOTT, R. P.; GURDON, J. B. Epigenetic memory in the context of nuclear reprogramming and cancer. **Briefings in functional genomics**, v. 12, n. 3, p. 164-173, 2013.

HASHIMOTO, H.; HORTON, J. R.; ZHANG, X.; CHENG, X. UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. **Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 8-14, 2009.

HEARD, E.; MARTIENSSEN, R. A. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 95-109, 2014.

HODGKINSON, A.; EYRE-WALKER, A. Variation in the mutation rate across mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 756-766, 2011.

HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development. **Science**, v. 187, n. 4173, p. 226-232, 1975.

HUANG, S. Genetic and non-genetic instability in tumor progression: link between the fitness landscape and the epigenetic landscape of cancer cells. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 423-448, 2013.

ICARD, P.; POULAIN, L.; LINCET, H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1825, n. 1, p. 111-116, 2012.

JABLONKA, E.; LAMB, M. J. The changing concept of epigenetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 981, n. 1, p. 82-96, 2002.

JIA, D.; JURKOWSKA, R. Z.; ZHANG, X.; JELTSCH, A.; CHENG, X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, v. 449, p. 248-253, 2007.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 438-456, 2009.

JONES, P. A.; LIANG, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 805-811, 2009.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 484-492, 2012.

KAUR, J.; TIKOO, K. p300/CBP dependent hyperacetylation of histone potentiates anticancer activity of gefitinib nanoparticles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 5, p. 1028-1040, 2013.

KLEIN, S.; SOMMER, A.; DISTEL, L. V. R.; NEUHUBER, W.; KRYSCHI, C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 2, p. 393-397, 2012.

KOTSMAR, C.; YOON, K. Y.; YU, H.; RYOO, S. Y.; BARTH, J.; SHAO, S.; PRODANOVIC, M.; MILNER, T. E.; BRYANT, S. L.; HUH, C.; JOHNSTON, K. P. Stable Citrate-Coated Iron Oxide Superparamagnetic Nanoclusters at High Salinity. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 24, p. 12435-12443, 2010.

KOVALEV, A. Trends of the Nanomaterial Market. **Mediterranean Journal of Social Sciences**, v. 4, n. 9, p. 655-659, 2013.

KUCHERYAVY, P.; HE, J.; JOHN, V. T.; MAHARJAN, P.; SPINU, L.; GOLOVERDA, G. Z.; KOLESNICHENKO, V. L. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents. **Langmuir**, v. 29, n. 2, p. 710-716, 2013.

LAURENT, L.; WONG, E.; LI, G.; HUYNH, T.; TSIRIGOS, A.; ONG, C. T.; LOW, H. M.; SUNG, K. W. K.; RIGOUTSOS, I.; LORING, J.; WEI, C. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Research**, v. 20, p. 320-331, 2010.

LEUSCHNER, C.; KUMAR, C. S. S. R.; HANSEL, W.; SOBOYEJO, W.; ZHOU, J.; HORMES, J. LHRH-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for detection of breast cancer metastases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 99, p. 163-176, 2006.

LING, D.; HYEON, T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1450-1466, 2013.

LISTER, R.; PELIZZOLA, P.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315-322, 2009.

LIU, J.; SUN, Z.; DENG, Y.; ZOU, Y.; LI, C.; GUO, X.; XIONG, L.; GAO, Y.; LI, F.; ZHAO, D. Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups. **Angewandte Chemie**, v. 48, n. 32, p. 5875-5879, 2009.

LIU, G.; GAO, J.; AI, H.; CHEN, X. Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1533-1545, 2013.

PETRONIS, A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 721-727, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

LOGAN, P. C.; PONNAMPALAM, A. P.; STEINER, M.; MITCHELL, M. D. Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 5, p. 302-312, 2013.

MAHMOUDI, M.; HOFMANN, H.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; PETRI-FINK, A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2323-2338, 2012.

- MILLER, L. D.; COFFMAN, L. G.; CHOU, J. W. An Iron Regulatory Gene Signature Predicts Outcome in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 21, p. 6728-6737, 2011.
- MORRIS, G. A.; CASTILE, J.; SMITH, A.; ADAMS, G. G.; HARDING, S. E. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n.4, p. 1430-1434, 2011.
- NG, C.; DHEEN, S. T.; YIP, W. G.; ONG, C. N.; BAY, B.; YUNG, L. Y. L. The induction of epigenetic regulation of PROS1 gene in lung fibroblasts by gold nanoparticles and implications for potential lung injury. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7609-7615, 2011.
- NIGAM, S.; BARICK, K. C.; BAHADUR, D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 323, n. 2, p. 237-243, 2011.
- RAGGI, C.; FACTOR, V. M.; SEO, D.; HOLCZBAUER, A.; GILLEN, M. C.; MARQUARDT, J. U.; ANDERSEN, J. B.; DURKIN, M.; THORGEIRSSON, S. S. Epigenetic Reprogramming Modulates Malignant Properties of Human Liver Cancer. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2251-2262, 2014.
- REICH-SLOTKY, R.; COLOVAI, A. I.; SEMIDEI-POMALES, M.; PATEL, N.; CAIRO, M.; JHANG, J.; SCHWARTZ, J. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. **Vox Sanguinis**, v. 94, n. 4, p. 351-357, 2008.
- RIGGS, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 14, n. 1, p. 9-25, 1975.
- SAFI, M.; COURTOIS, J.; SEIGNEURET, M.; CONJEAUD, H.; BERRET, J. F. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 35, p. 9353-9363, 2011.
- SANDOVICI, I.; HOELLE, K.; ANGIOLINI, E.; CONSTÂNCIA, M. Placental adaptations to the maternal–fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. **Reproductive biomedicine online**, v. 25, n. 1, p. 68-89, 2012.
- SARKIES, P.; SALE, J. E. Cellular epigenetic stability and cancer. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 3, p. 118-127, 2012.
- SCHRAND, A. M.; RAHMAN, M. F.; HUSSAIN, S. M.; SCHLAGER, J. J.; SMITH, D. A.; SYED, A. F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 544-568, 2010.

SINGH, N.; JENKINS, G. J.; ASADI, R.; DOAK, S. H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano reviews**, v. 1, 2010.

SKINNER, M. K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 214-222, 2010.

SKINNER, M. K. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 51-55, 2011a.

SKINNER, M. K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 838-842, 2011b.

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. *De novo* DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 33-42, 2012.

STOCCORO, A.; KARLSSON, H. L.; COPPEDÈ, F.; MIGLIORE, L. Epigenetic effects of nano-sized materials. **Toxicology**, v. 313, n. 1, p. 3-14, 2013.

SULE, N.; SINGH, R.; SRIVASTAVA, D. K. Alternative Modes of Binding of Recombinant Human Histone Deacetylase 8 to Colloidal Gold Nanoparticles. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 463, 2008.

TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 342-355, 2013.

TSAI, H. C.; LI, H.; VAN NESTE, L.; CAI, Y.; ROBERT, C.; RASSOOL, F. V.; ZAHNOW, C. A. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 430-446, 2012.

WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563-565, 1942.

WANG, Y.; ZHU, L.; DONG, Z.; XIE, S.; CHEN, X.; LU, M.; ZHOU, W. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 105-111, 2012.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1001-1011, 2003.

WOEHL, T. J.; JUNGJOHANN, K. L.; EVANS, J. E.; ARSLAN, I.; RISTENPART, W. D.; BROWNING, N. D. Experimental procedures to mitigate electron beam induced artifacts during in situ fluid imaging of nanomaterials. **Ultramicroscopy**, v. 127, p. 53-63, 2013.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?. **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2012.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153-154, 2001.

ZHANG, Y.; YANG, M.; PORTNEY, N. G.; CUI, D.; BUDAK, G.; OZBAY, E.; OZKAN, C. S. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. **Biomedical microdevices**, v. 10, n. 2, p. 321-328, 2008.