

A METILAÇÃO DO DNA COMO FATOR DE PROGNÓSTICO EM CÂNCERES: O POTENCIAL DA EPIGENÉTICA

Davi Bonella Lopes¹, Brunella Curto Cristianes Lacerda¹, Juliana Carvalho Passos¹, Júlia Toneto Neves¹, Caio Effigen Bortolini¹, Adriana Madeira Álvares da Silva¹, Suzanny Oliveira Mendes¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29047-105 - Vitória-ES, Brasil, davibonella@gmail.com, brunellacclacerda@gmail.com, juliana.c.passos@edu.ufes.br, juliatoneto16@gmail.com, caioebortolini@gmail.com, adriana.biomol@gmail.com, suzannymendes@gmail.com

Resumo

A epigenética como uma área de estudos, além de ser um campo recente e ainda inédito, trouxe uma nova forma de analisar a genética, com isso, esse corrente método pôde adentrar outras áreas de estudos, trazendo, assim, muitas novidades e a capacidade de descobrimento de fatores nunca antes estudados. Dessa forma, é possível depreender que na área da oncologia, uma esfera a qual possui grandes bases genéticas, a epigenética auxilia bastante na compreensão acerca dessa enfermidade, suas modificações no organismo e como interpretá-las de uma forma que leve a uma possível melhora no tratamento e terapêutica em resposta a tal. Através da revisão bibliográfica de 6 artigos estritamente selecionados, o mecanismo epigenético escolhido para a análise foi a metilação do DNA e a sua competência de determinar o prognóstico em diversos tumores. Ainda devido à ampla abrangência da definição de prognóstico, os principais selecionados foram: prognóstico geral, promoção de metástase, resistência a medicamentos, progressão tumoral e sobrevida global. Através dessa análise, foram identificados marcadores essenciais que merecem atenção destacada.

Palavras-chave: Mecanismos Epigenéticos. Oncologia. Prognóstico do Câncer. Alterações na Metilação do DNA. Microambiente Tumoral.

Área do Conhecimento: Biologia Molecular
Introdução

A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) configura-se como um processo bioquímico no qual uma entidade metil é adicionada em uma citosina ou adenina, precisamente na demarcação do carbono 5'. Por conseguinte, a citosina sofre uma conversão, transformando-se em metilcitosina (Nebbioso *et al.*, 2018). Em âmbito global, é pertinente notar que a metilação é mais comum em citosinas que estão imediatamente seguidas por uma guanina, formando um dinucleotídeo CpG e sequências abundantes em dinucleotídeos CpG são designadas como Ilhas CpG. Ainda, é relevante mencionar que aproximadamente 60% dos promotores gênicos estão situados em regiões de ilhas CpG, ou seja, áreas suscetíveis à ocorrência de metilação (Zob *et al.*, 2022).

Assim sendo, a metilação do DNA é uma das alterações epigenéticas mais profundamente compreendidas, desempenhando um papel essencial na regulação da atividade dos genes. Com isso, as alterações nos níveis de metilação do DNA demonstraram estar intimamente associadas à carcinogênese. Especificamente, nos diversos tipos de câncer, é comum observar tanto a hipometilação generalizada em todo o genoma quanto a não metilação em promotores de genes que atuam como supressores de tumores. Tais irregularidades na metilação apresentam-se como biomarcadores em potencial e, igualmente, constituem alvos de interesse para abordagens terapêuticas (Nebbioso *et al.*, 2018).

O estudo da epigenética como um fator de prognóstico para tumores mostra-se importante, uma vez que, quando devidamente interligados, têm o potencial de aprimorar substancialmente as estratégias de tratamento, permitindo uma avaliação mais precisa da evolução da doença e, por conseguinte, o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes (Pan *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, levando em consideração sua presença nos estudos analisados, este artigo traz uma revisão de literatura sobre a epigenética atuando como um possível fator de prognóstico de tumores, dando um enfoque no mecanismo da metilação do DNA e suas nuances.

Metodologia

Para a pesquisa de artigos, foi utilizada a plataforma The Nacional for Biotechnology Information (NCBI; em português: Centro Nacional de Informação Biotecnológica), utilizando a base de dados do PubMed, foram pesquisados os termos e palavras chaves “Prognosis”, “Epigenetics”, “Oncology”, “Carcinoma”, “Tumor microenvironment”, assim, após ter encontrado artigos que exploram tais assuntos. Os critérios de inclusão compunham-se na análise da metilação do DNA como um biomarcador de prognósticos em tumores e como se desenvolvia sua atuação em tal. Com esses estudos à disposição, foram afinados e escolhidos aqueles que correspondiam à faixa temporal de publicação de 2017 até o momento atual. Além disso, era necessário também, para adentrar ao escopo daqueles que seriam revisados, serem publicados em revistas as quais possuem um fator de impacto acima de 3.

Resultados

No âmbito desta revisão bibliográfica, foram identificados 6 estudos científicos relevantes, que foram empregados neste contexto. No quadro subsequente, apresentam-se todos estes trabalhos, acompanhados de breves resumos que abordam os respectivos enfoques relacionados ao tema predefinido.

Tabela 1 - Materiais selecionados para a revisão

Artigo	Conteúdo	Fator de Prognóstico abordado
CZARNECKA-CHREBELSKA, Karolina. H. <i>et al.</i> Biological and Genetic Mechanisms of COPD, Its Diagnosis, Treatment, and Relationship with Lung Cancer. <i>Biomedicines</i> , v. 11, n. 2, p. 448, 2023.	Aborda sobre a doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD em inglês) e sua relação com o câncer de pulmão (CP). Dentro disso, discorre sobre a epigenética (incluindo nesta a metilação do DNA) desse câncer, dissertando, em certa parte, acerca de certos biomarcadores epigenéticos que podem atuar como fatores de prognóstico para tal tumorigênese.	Prognóstico geral.
MONTALVO-JAVÉ, Eduardo. E. <i>et al.</i> Pancreatic Cancer: Genetic Conditions and Epigenetic Alterations. <i>Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract</i> , v. 27, n. 5, p. 1001-1010, 2023.	Aborda sobre o câncer pancreático, com um enfoque nas condições genéticas e epigenéticas. Em relação à última, empenha uma extensa parcela de tempo expondo sobre os aspectos epigenéticos deste câncer, destacando igualmente sua potencialidade como um indicador prognóstico dando um enfoque nas enzimas metiladoras de DNA.	Progressão tumoral, promoção de metástase, sobrevida global.
NEBBIOSO, Angela. <i>et al.</i> Cancer epigenetics: Moving forward. <i>PLOS Genetics</i> , v. 14, n. 6, p. e1007362, 2018.	De maneira abrangente, o autor explora minuciosamente as nuances do câncer, apresentando suas conceituações no âmbito da epigenética. O foco é extensivamente direcionado para a constatação contemporânea da viabilidade de investigar alterações epigenéticas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.	Prognóstico geral e sobrevida global.
OURA, Kyoko. <i>et al.</i> The Roles of Epigenetic Regulation and the Tumor Microenvironment in the Mechanism of Resistance to Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , v. 24, n. 3, p. 2805, 2023.	Assim como nos artigos supramencionados, aborda um carcinoma em específico, o Carcinoma Hepatocelular (CHC) e realiza um enfoque em suas regulações epigenéticas.	Prognóstico geral, promoção de metástase, resistência a medicamentos.
PAN, Yunbao. <i>et al.</i> DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. <i>Clinical and Experimental Medicine</i> , v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.	Explora de maneira mais detalhada a metilação do DNA, concentrando-se em suas potenciais aplicações diagnósticas e prognósticas em diversos tipos de tumores.	Prognóstico geral e progressão tumoral.
ZOB, D. <i>et al.</i> Genomics and Epigenomics in the Molecular Biology of Melanoma—A Prerequisite for Biomarkers Studies. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , v. 24, n. 1, p. 716–716, 2022.	Aborda as nuances genéticas e epigenéticas do melanoma. Dentro do contexto da epigenética, o autor realiza uma síntese abrangente dos mecanismos epigenéticos, com particular ênfase em determinadas moléculas vinculadas ao melanoma e suas capacidades prognósticas.	Progressão tumoral e sobrevida geral.

Tabela 1 - Materiais selecionados para a revisão

Discussão

Prognóstico geral: Os achados principais encontrados nos artigos avaliados que possuem valor de marcadores prognósticos em sua generalidade, sem especificações acerca de seu resultado, são os seguintes: Em pacientes que desenvolveram Carcinoma Hepatocelular (CHC), as evidências indicaram que a análise de sequenciamento do genoma revelou uma hipometilação recorrente em todo o genoma do intensificador da proteína CCAAT/enhancer-binding beta (C/EBP β), um fator de transcrição frequentemente superexpresso nesse tipo de tumor. Essa hipometilação mostrou uma correlação direta com a superexpressão de C/EBP β . Isto é, a redução na metilação deste intensificador resulta em uma amplificação na taxa de produção de C/EBP β , o que, como anteriormente mencionado, encontra-se proeminente em pacientes portadores dessa neoplasia e traduz-se em um consequente prognóstico desfavorável para os pacientes (Oura *et al.*, 2023).

Da mesma forma, este mesmo estudo examinou os níveis de metilação do DNA em tecidos normais e 34 tipos de tecidos cancerosos, mostrando que a expressão de mRNA de PGK1 (fosfoglicerato cinase 1) diminui após a hipermetilação de sua região promotora, condição associada a um pior prognóstico geral em vários tipos de câncer, incluindo CHC. Isso se explica pelo fato de tal enzima desempenhar um papel vital no processo metabólico essencial de geração de energia denominado glicólise (Oura *et al.*, 2023).

Também se observou que uma expressão aumentada de enzimas como a DNMT (DNA metiltransferase) desencadeia modificações na metilação do DNA. Esse estudo demonstrou que a DNMT1 apresenta uma superexpressão relativa em linhagens celulares e tecidos de Carcinoma Hepatocelular (CHC), estando correlacionada com um prognóstico desfavorável justamente pelo fato de ocasionar alterações nos níveis de metilação do DNA, desregulando sua expressão (Pan *et al.*, 2017)

Já consoante ao estudo acerca do câncer de pulmão (CP), foi constatado que elementos longos intercalados (LINEs), esses sendo elementos retrotransponíveis endógenos, os quais contêm genes funcionalmente ativos para transcrição reversa e integração no genoma, que abrangem aproximadamente 17% do genoma humano, manifestam atividade transcricional em diversos tipos de câncer, enquanto que em tecidos normais, são estritamente silenciados, para preservar a integridade genômica (Czarnecka-chrebelska *et al.*, 2023).

A redução da metilação na região LINE-1 em tecidos afetados pelo câncer leva à mobilização desse mesmo elemento e, conseqüentemente, contribuindo para a ocorrência de mudanças cromossômicas. Sua hipometilação em estágios iniciais foi identificada como um fator relacionado a um prognóstico geral menos favorável, isso se deve ao fato dos LINE-1 serem transposons que abarcam cerca de 17% do genoma humano. Estes, quando ativos, possuem a capacidade de perturbar o genoma mediante inserções, deleções, reorganizações e variações na quantidade de cópias. Como mencionado anteriormente, a desmetilação do LINE-1 pode sugerir que os pacientes precisam de terapia adjuvante pós-cirúrgica, enquanto a hipermetilação do LINE-1 foi considerada um bom fator prognóstico para pacientes com CP (Czarnecka-chrebelska *et al.*, 2023).

Continuando sob essa ótica, o estado de metilação do DNA do gene responsável pela homeodominância 2 pareado (*PITX2*), uma proteína que atua como um fator de transcrição e regula a expressão do gene do procolágeno lisil hidroxilase, sendo essa, por sua vez, é uma proteína que está envolvida no desenvolvimento dos olhos, dentes e órgãos abdominais, tem sido considerado um biomarcador importante em carcinomas de mama, próstata e pulmão. A metilação do *PITX2* também se correlacionou com um pior prognóstico, como também como um risco aumentado de recorrência após a cirurgia em pacientes com tais cânceres. Curiosamente, diferente do câncer de próstata e de mama, a metilação elevada do *PITX2* foi correlacionada com uma melhor sobrevivência em pacientes que sofrem de câncer de pulmão (CP) e precisa-se, portanto, de mais estudos acerca disso (Pan *et al.*, 2017).

Promoção de metástase: Iniciando esta outra seção, voltaremos os olhos acerca do carcinoma hepatocelular, no qual, sobre isso, diversos relatos discorrem sobre o metiloma, que são genes descritos por terem regiões diferencialmente metiladas, instigando modificações, mediadas pela enzima DNMT, que se entrelaçam com a regulação da metástase do CHC. Quanto ao papel específico de DNMT1, a redução da osteopontina, uma proteína extracelular não colágena, nas células do CHC

portadoras de características de células-tronco cancerígenas, atenua a expressão de DNMT1 e, por conseguinte, potencializa a disseminação metastática do CHC (Oura *et al.*, 2023).

De tal forma, algumas proteínas de ligação à sequência rica em AT 1 (SATB1), que é uma região que desempenha um papel fundamental na estruturação da organização espacial do genoma, controlam a metilação de certos genes que, quando expressos, possuem a função de regulação do ciclo celular, o que confere maior agressividade aos tumores e um pior prognóstico se metilados. Por sua vez, a regulação destes genes pode ajudar a estratificar pacientes para cirurgia com base no risco de metástases à distância. (Montalvo-javé *At al.*, 2023)

Resistência a medicamentos: Recentemente, a descoberta da influência da metilação do DNA tem sido destacada como um elemento de relevância significativa na emergência de resistência medicamentosa. Além disso, é conhecido que a quimioterapia exerce modificações epigenéticas sem necessariamente engendrar mutações genéticas (Pan *et al.*, 2017).

Nesse mesmo enfoque, os principais achados acerca de tal objeção aos medicamentos são: modificações na metilação do DNA nos sítios promotores do gene responsável pela EMT (transição epitelial-mesenquimal) podem assumir relevância crucial na obtenção de resistência a substâncias medicamentosas. Tendo em vista que a EMT é um processo pelo qual a polaridade adesiva das células cancerosas epiteliais se dissipa e se transforma em células mesenquimais. Isso ocorre em conjunto com o aumento da migração celular e capacidade de invasão e também é conhecido por desempenhar um papel importante na remodelação do citoesqueleto e na resistência à apoptose. Assim, a metamorfose EMT engatilhada por meio da metilação do DNA constitui o fundamento subjacente à resistência observada no tratamento de primeira linha com sorafenibe em pacientes portadores de CHC em estágio avançado (Oura *et al.*, 2023).

É necessário tomar nota que o sorafenibe é um dos principais medicamentos para o tratamento de carcinomas, juntamente com o lenvatinibe. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição de quinases múltiplas que suprime a proliferação do tumor e a formação de novos vasos sanguíneos ao inibir quinases Raf intracelulares (CRAF, BRAF e BRAF mutante) e também receptores de quinases presentes na superfície celular (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-beta, RET e RET / PTC) (Pan *et al.*, 2017).

Contudo, nos pacientes cuja enfermidade inicialmente cedeu, mas que, posteriormente, manifestaram resistência às terapias medicamentosas, identificou-se padrões coerentes de modificação na metilação do DNA instigados pelo processo EMT. Porém, tais alterações não foram detectadas no conjunto de indivíduos que manteve uma resposta positiva ao tratamento com sorafenibe (Oura *et al.*, 2023).

Progressão tumoral: A progressão tumoral é uma das facetas mais complexas para a consecução de um biomarcador confiável, demandando um considerável período de tempo até que alguns sejam validamente constatados (Zob *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, registram-se apenas algumas incursões na compreensão da trajetória progressiva dos tumores: em análises específicas que abrangiam o contexto do carcinoma adenopancreático, foi identificado que a enzima citoplasmática serina-treonina quinase (WNK2), caracterizada como uma supressora tumoral, exibe uma hipermetilação discernível em comparação com os tecidos adjacentes nesses tumores. Tal fenômeno, por sua vez, culmina na regulação negativa tanto do mRNA quanto da expressão proteica da referida enzima no próprio tumor, associando-se, desse modo, com o processo de progressão tumoral característico desse tipo de neoplasia (Montalvo-javé *et al.*, 2023).

Dessa mesma forma, também foi mostrado que o gene *KLF10*, esse possuindo efeitos antiproliferativos e indução de apoptose em várias células de carcinoma, incluindo câncer pancreático e leucemia, é regulado através da modulação epigenética. Esse gene sofre metilação de sua região promotora, com seu consequente silenciamento, resultando na sinalização de TGF- β 1 (Fator de crescimento transformante Beta 1). Essas mudanças resultam em aumento da proliferação, invasão e migração de células tumorais e foram observados durante a progressão do carcinoma pancreático (Montalvo-javé *et al.*, 2023).

Sobrevida global: No tocante a esse fator, apenas um dentre os estudos se mostrou conclusivo e assertivo em seus achados. Esse desfecho decorre da necessidade de um maior período para efetuar uma análise abrangente da sobrevida em vários tipos de tumores, assim sendo, temos: ao avaliar o desenvolvimento de melanomas, foi estudado o perfil de metilação de todo o genoma de 45 pacientes. Com base na metilação global, o estudo foi dividido em um grupo favorável, com sobrevida média de

31,5 meses e um grupo desfavorável, com sobrevida média de 10,3 meses, com sobrevida global em 5 anos de 41,2 e 0%, respectivamente. O estudo identificou uma assinatura de metilação de 17 genes suficiente para distinguir o grupo de melhor prognóstico, caracterizado por baixa densidade de metilação. A hipometilação foi um preditor significativo de aumento da sobrevida global (Zob *et al.*, 2022).

Conclusão

Conforme demonstrado anteriormente, a investigação da epigenética e de seus mecanismos, notadamente a metilação do DNA nos casos em análise, como elementos prognósticos de tumores, emerge como um aspecto de significativa relevância e que desempenha de maneira eficaz o papel atribuído a essa abordagem. É possível comprovar isso perquirindo a especificidade de cada molécula analisada em relação à carcinogênese tratada, mostrando sua eficácia como biomarcadores epigenéticos. Dessa forma, pode-se inferir que a epigenética possui um potencial importante para essa área e ainda não foi explorada de uma devida maneira, mostrando-se um campo incipiente. Pode-se afirmar isso ao perceber que a maior parte dos artigos analisados, e considerados satisfatórios para o método de pesquisa rigoroso aplicado, possui data de publicação nos últimos anos, ou seja, extremamente atuais. Logo, haja vista a importância de um prognóstico bem avaliado e conciso sobre a tumorigênese, conclui-se que há uma demanda por um refinamento e um aumento do comprometimento por parte da comunidade científica, visando alcançar um patamar de investigação satisfatório em relação ao prognóstico de neoplasias aliado à epigenética, aprofundando essa cada vez mais.

Referências

CZARNECKA-CHREBELSKA, Karolina. H. *et al.* Biological and Genetic Mechanisms of COPD, Its Diagnosis, Treatment, and Relationship with Lung Cancer. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 448, 2023.

MONTALVO-JAVÉ, Eduardo. E. *et al.* Pancreatic Cancer: Genetic Conditions and Epigenetic Alterations. **Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract**, v. 27, n. 5, p. 1001-1010, 2023.

NEBBIOSO, Angela. *et al.* Cancer epigenetics: Moving forward. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007362, 2018.

OURA, Kyoko. *et al.* The Roles of Epigenetic Regulation and the Tumor Microenvironment in the Mechanism of Resistance to Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2805, 2023.

PAN, Yunbao. *et al.* DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

ZOB, Daniela. *et al.* Genomics and Epigenomics in the Molecular Biology of Melanoma—A Prerequisite for Biomarkers Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 716–716, 2022.