UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Maria Paula Martins Januario

Padrão de metilação do DNA da H19DMR em Osteomielite

“Versão corrigida. A versão original está disponível tanto na Biblioteca da Unidade que hospeda o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD) ”

Ribeirão Preto, SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Maria Paula Martins Januario

Padrão de Metilação do DNA da H19DMR em osteomielite

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências (Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi

Ribeirão Preto, SP

2021

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

Ficha catalográfica

Januario, Maria Paula Martins

Título – Padrão de Metilação do DNA da H19DMR em osteomielite

Maria Paula Martins Januário. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2021.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

1. Metilação do DNA; 2. Neoplasias; 3. Lesões reparativas; 4. H19DMR.

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais e amigos, que sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram,

Agradecimentos

Aos meus pais Eloá e Paulo, por toda dedicação, apoio e suporte que sempre me deram.

À professora Dra. Ester Silveira Ramos, minha orientadora, por todo apoio e ensinamentos durante o trabalho e pesquisa.

Ao professor Dr. Marcelo Baruffi, por disponibilizar seu material para realização deste trabalho e pelo apoio.

A todos os alunos e funcionários do Bloco C do Departamento de Genética da FMRP/USP.

A toda equipe do laboratório de Genética e Câncer (GECAN) do IBB-UNESP.

Ao CNPq, CAPES e FAEPA pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço de coração a todos que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Januario, M. P. M. **Padrão de metilação do DNA da H19DMR em Osteomielite.**

2021. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O gene *H19* é considerado um importante supressor tumoral, está localizado no cromossomo 11, na região controladora de *imprinting* 1 (ICR1) e é controlado pela região diferencialmente metilada denominada de H19DMR. Foi descrito o seu envolvimento com a regeneração óssea e a sua expressão foi associada a um mau prognóstico em casos de osteossarcoma. Os processos proliferativos reparativos, como as osteomielites, apresentam potencial para transformações malignas. O objetivo deste trabalho foi analisar o padrão de metilação da H19DMR na osteomielite e sua associação com o prognóstico da doença. Foram selecionadas, no Laboratório de Genética e Câncer – UNESP – Botucatu, amostras de sangue e de lesões coletadas durante cirurgias. Foram obtidas, em estudos citogenéticos anteriores, células em suspensão a partir de cultura de células das amostras das lesões. O DNA foi extraído das células de sangue periférico e do material fixado das lesões utilizado para o estudo citogenético. O padrão da metilação do DNA da H19DMR foi observado utilizando-se a técnica de PCR em tempo real associada à enzima de restrição sensível à metilação. Foram selecionados quatro casos, sendo um de osteomielite crônica com progressão mais agressiva para fibrossarcoma (Caso 1), o qual apresentava, entre outras alterações cromossômicas, monossomia do cromossomo X e 11; mais dois de osteomielite (Casos 2 e 3), sendo que no Caso 2 foi possível a análise citogenética com várias alterações clonais; e um caso de fibrossarcoma (Caso 4), uma neoplasia óssea e não osteomielite, para comparação, devido à progressão do Caso 1. O mosaicismismo contendo células com monossomia do cromossomo X clonal não foi detectado pela eletroforese capilar, o que mostra que a citogenética tradicional ainda pode trazer resultados relevantes não detectados por outras técnicas. Nos Casos 1, 3 e 4 foi constatada a hipometilação da H19DMR proporcional à gravidade dos casos. Como a metilação estaria relacionada a uma menor expressão do gene, o esperado seria a hipermetilação nos casos de pior prognóstico, uma vez que o papel de supressor tumoral seria o de diminuir a progressão. No entanto, foi obtido o resultado inverso. Embora o número pequeno de amostras analisadas, os resultados obtidos de um provável aumento da expressão do *H19*, devido à sua hipometilação, poderia corresponder a uma tentativa

de regeneração óssea, papel que já tem sido relacionado a este gene e mostraria um potencial de utilização da H19DMR como biomarcador.

Palavras-chave: epigenética, *imprinting* genômico, gene *H19*, qPCR.

ABSTRACT

Januario, M. P. M. DNA methylation pattern of H19DMR in osteomyelitis. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The H19 gene is considered an important tumor suppressor, is located on chromosome 11, in the controlling region of imprinting 1 (ICR1) and is controlled by the differentially methylated region called H19DMR. Its involvement with bone regeneration has been described and its expression has been associated with a poor prognosis in cases of osteosarcoma. Reparative proliferative processes, such as osteomyelitis, have the potential for malignant transformations. The aim of this study was to analyze the methylation pattern of H19DMR in osteomyelitis and its association with the prognosis of the disease. Blood and lesion samples collected during surgeries were selected at the Laboratory of Genetics and Cancer - UNESP - Botucatu. In previous cytogenetic studies, cells were obtained from cell culture of the samples of the lesions. DNA was extracted from peripheral blood cells and from the fixed material of the lesions used for cytogenetic study. The h19DMR DNA methylation pattern was observed using the real-time PCR technique associated with the methylation-sensitive restriction enzyme. Four cases were selected, one of chronic osteomyelitis with more aggressive progression (Case 1), which presented, among other chromosomal alterations, monosomy of chromosome X and 11; two more osteomyelitis (Cases 2 and 3), and in case 2 it was possible to analyze cytogenetics with several clonal alterations; and one case of fibrosarcoma (Case 4), a bone neoplasm and not osteomyelitis, for comparison. Mosaicism containing cells with clonal X chromosome monosomy was not detected by capillary electrophoresis, which shows that traditional cytogenetics can still bring relevant results not detected by other techniques. In Cases 1, 3 and 4, hypomethylation of H19DMR proportional to the severity of the cases was found. As methylation would be related to a lower gene expression, hypermethylation would be expected in cases of worse prognosis, since the role of tumor suppressor would be to decrease progression. However, the opposite result was obtained. Although the small number of samples analyzed, the results obtained from a probable increase in H19expression, due to its hypomethylation, could correspond to an attempt at bone regeneration, a role that has already been related to this gene and would show a potential use of H19DMR as a biomarker.

Keywords: epigenetics, genomic *imprinting*, gene *H19*, qPCR.

Lista de siglas, símbolos, acrônimos e abreviaturas

5mc	5 metilcitocinas
CpG	Citocina-fosfato-Guanina
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	Dna metiltransferase
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
FS	Fibrossarcoma
<i>H19</i>	<i>Imprinted Maternally Expressed Transcript</i>
ICRs	<i>Imprinting Control Regions</i>
<i>IGF-1</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
<i>IGF-2</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
KCl	Cloreto de potássio
ncRNAs	RNAs não codificadores
OM	Osteomielite
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	Fator de crescimento derivados de plaquetas
RNA	Ácido ribonucleico
TGF- β	Fator de crescimento transformador
TP53	Tumor Protein P53

Lista de figuras

Figura 1: Representação de alterações epigenéticas que podem ocorrer durante a progressão e iniciação do câncer.....	4
Figura 2: Mecanismos de metilação e desmetilação do DNA mediados pelas enzimas DNMTs e TETs.....	11
Figura 3: Representação da perda de metilação do DNA que pode resultar em transcrição aberrante no gene alvo.....	12
Figura 4: Expressões dos genes H19 (do inglês, Imprinted Maternally Expressed Transcript) e IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2).....	14
Figura 5: PCR em tempo real com o material ND (não digerido); HpaII (material digerido com a HpaII).....	29
Figura 6: Dados obtidos pela análise da PCR em tempo real associada a enzima sensível à metilação para o cálculo da porcentagem de metilação da H19DMR (Tabela 1).....	30
Figura 7: Resultado da eletroforese capilar para quantificação do número de cópias do cromossomo X por meio de análise semi-quantitativa de dois alelos do gene do Receptor de Andógenos.....	31

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação dos casos e análise dos resultados das análises citogenéticas e moleculares.....28

Sumário

Lista de siglas, símbolos, acrônimos e abreviaturas	12
Lista de tabelas	14
1. Introdução	3
1.1. Lesões Pré-Neoplásicas	3
1.2 Osteomielite	4
1.3 Funcionamento e constituição do tecido ósseo.....	6
1.3.1 O tecido ósseo	6
1.4 Neoplasias ósseas.....	7
1.4.2 Neoplasias ósseas e genética	8
1.5. Epigenética	9
1.5.1 Conceitos gerais	9
1.5.2 Imprinting gênomico e H19DMR.....	12
2. Hipótese	16
2. Hipótese	17
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivos	19
3.1.1 Objetivos gerais.....	19
3.1.2 Objetivos específicos.....	19
4. Materiais e Métodos	20
4.1 Coleta e seleção do material	21
4.2 Cultivo celular e preparação das lâminas.....	21
4.3 Extração do DNA	23
4.4 Avaliação do padrão de metilação da H19DMR.....	23
5. Resultados	26
5.1 Resultados	27
5.1.1 Diagnósticos	27
5.1.2 Análises citogenéticas	29
5.1.3 Análises moleculares.....	29
6. Discussão	32
6.1 Discussão	33
7. Conclusões	37
9. Bibliografia.....	39

10. Anexos.....	45
11. Apêndice.....	51

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Lesões Pré-Neoplásicas

É de grande importância entender e classificar as lesões pré-neoplásicas, visto que, estão relacionadas com o distúrbio de regulação da replicação celular e associadas com a transformação cancerosa. As proliferações celulares, como as regenerativas, hiperplásicas e displásicas são consideradas potenciais para a origem de uma neoplasia maligna, pois qualquer erro durante essas replicações pode levar à formação de células alteradas. Diversos distúrbios estão associados com a evolução neoplásica e muitos cânceres surgem a partir de lesões inicialmente consideradas benignas (KUMAR et al., 2006; FISHBEIN et al., 2020). Se o potencial de malignidade for detectado antes de as células tornarem-se malignas, ou numa fase inicial da doença, pode haver uma condição mais favorável para o tratamento e consequentemente para cura (SOBIN et al., 2002).

A manutenção de tecidos e órgãos geralmente é controlada por vias de sinalização, e as alterações nos genes que codificam os componentes dessas vias podem perturbar essa organização e contribuir para a perda de controle da proliferação celular. A proliferação celular descontrolada é uma característica do câncer, considerado uma doença do desenvolvimento, um produto que deu errado (GRIFFITHS et al., 2008).

O câncer é definido também como uma doença genética, podendo apresentar anormalidades cromossômicas que surgem como uma consequência de erros aleatórios de replicação, exposição à carcinógenos ou processos de reparo de DNA danificados

(SUDOYO; HARDI, 2011). Apesar disso, atualmente sabe-se que está diretamente relacionado ao meio ambiente, por diversas razões, como hábitos alimentares pouco saudáveis, estresse ocupacional, exposição a radiações e/ou agentes tóxicos, além de também ser desencadeado por infecções e inflamações (ANAND et al., 2008). Essas questões podem ser explicadas também pelas alterações epigenéticas dinâmicas as quais contribuem para a iniciação e progressão do câncer, como a metilação do DNA e as modificações das histonas (Figura 1) (TOH et al., 2017).

Figura 1: Representação de alterações epigenéticas que podem ocorrer durante a progressão e iniciação do câncer. A metilação do DNA, pode envolver tanto a hipermetilação do promotor, como a hipometilação, já as alterações nas histonas envolvem alterações com acetilação e a metilação anormal (modificada de TOH et al., 2017).

1.2 Osteomielite

A osteomielite (OM) é uma inflamação do osso, provinda a partir de uma infecção causada por microrganismos que invadem e destroem progressivamente o osso no local da infecção, que pode progredir para um estágio crônico e persistente. O tecido ósseo tende a ser resistente à infecção, porém a osteomielite ocorre quando há uma alta

inoculação de organismos, usualmente ocorrendo após complicações decorrentes de fraturas e cirurgias, traumas que levam a danos ósseos. Os fatores associados ao grau de patogênese da osteomielite incluem a virulência do organismo, estado imunológico, o tipo de osso e as comorbidades do paciente. A OM pode apresentar sinais sistêmicos como febre, irritabilidade e letargia (JORGE et al., 2010; SHINGO; JOHN, 2010).

Os microrganismos mais freqüentemente isolados na osteomielite bacteriana são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli*. Além da divisão por microorganismos vários métodos de classificação de osteomielite já foram propostos, o mais utilizado é baseado na duração, mecanismo de infecção e presença de insuficiência vascular, sendo o seguinte: a) osteomielite hematogênica aguda; b) osteomielite por contiguidade, com ou sem insuficiência vascular; c) osteomielite vertebral; d) osteomielite crônica. (JORGE et al., 2010).

Mesmo sendo de grande importância a identificação e o isolamento de microrganismos para determinar o tratamento das infecções ósseas, são poucos e raros os estudos nacionais sobre o perfil dessas doenças, assim, a padronização de um protocolo ideal de tratamento para a osteomielite é considerado um desafio. Além disso, não é raro que haja presença de neoplasias como uma das complicações da osteomielite, principalmente a que evolui como crônica. Diversos casos de cânceres posteriores à OM já foram descritos como osteossarcoma, mieloma, angiossarcoma, fibrossarcoma entre outros, essa evolução pode causar a morte em um curto espaço de tempo. (SAMARAS et al., 2010)

1.3 Funcionamento e constituição do tecido ósseo

1.3.1 O tecido ósseo

O tecido ósseo é formado pelas matrizes orgânica (35%), que confere resistência à tração, e inorgânica (65%), que oferece resistência à compressão, além de ser um tecido conjuntivo diferenciado, pois é um dos poucos tecidos que sofre mineralização. Devido à sua rigidez, desempenha função de proteção dos órgãos internos e sustentação de tecidos moles, permitindo a fixação de músculos e ligamentos. Atua ainda como elemento passivo na realização dos movimentos, por servir de alavanca fixa para a ação dos músculos. Armazena cálcio, fosfato e magnésio e desempenha função hematopoiética (formação de células do sangue), devido a presença de medula óssea em seu interior (KUMAR et al., 2006; DÂNGELO; FATTINI, 1988).

A formação do tecido ósseo engloba três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são células ósseas consideradas jovens, que iniciam o processo de mineralização e têm por função sintetizar a parte orgânica da matriz óssea (colágeno e proteoglicana), sobre essa matriz são depositados os componentes da matriz inorgânica (sais mineirais, como cálcio e fosfato). Os osteoblastos exibem receptores de membrana que se ligam a hormônios (paratormônios, vitamina D e estrógeno), citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular. Seguido da deposição da matriz inorgânica o osteoblasto transforma-se em osteócito, tendo como função a manutenção do tecido ósseo, e são as mais numerosas células formadoras do tecido ósseo. Já os osteoclastos são células que secretam enzimas proteolíticas e promovem a reabsorção óssea e derivam das células progenitoras hematopoiéticas, as quais também originam os monócitos e macrófagos e participam do processo de renovação óssea (KUMAR et al., 2006; DÂNGELO; FATTINI, 1988).

A estimulação das células do tecido ósseo é regulada por citocinas e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). (KUMAR et al., 2006; DÂNGELO; FATTINI, 1988).

1.4 Neoplasias ósseas

Os tumores ósseos quando comparados com as demais neoplasias humanas são relativamente incomuns e isso faz com que haja uma escassez de dados significativos a respeito de diversas questões relacionadas com os vários tipos e subtipos de tumores ósseos (DORFMAN; BOGDDAN, 1995). Além disso, é observado que as características clínicas dos tumores ósseos não são específicas ou reconhecidas; então muitas vezes estes tipos de tumores demoram para serem detectados o que também atrasa o cuidado terapêutico, e geralmente causa danos ao paciente. Os indicadores da doença, são principalmente inchaço, dores e desconfortos no local. Avanços moleculares e de desenvolvimento nos estudos têm facilitado o entendimento desse tipo de tumor. (HAMEED; HOWARD, 2011).

Há relatos de associação de tumores ósseos com alguns tipos de lesões ósseas, as quais rompem o equilíbrio metabólico do tecido osteocartilaginoso, como por exemplo, distúrbios genéticos de cartilagem pré-óssea, lesões por radiação, doença de Paget e osteomielite crônica. Algumas dessas doenças ósseas inflamatórias foram associadas de forma clínica a osteossarcoma e fibrossarcoma, considerados tumores ósseos malignos, podendo causar a morte em um curto espaço de tempo (FISHBEIN et al., 2020).

Com as modalidades de tratamentos atuais, a sobrevida para os tumores ósseos malignos tem aumentado; para osteossarcoma e sarcoma de Ewing é de 70% e 60%,

respectivamente (LAM et al., 2019). Mas apesar disso, as neoplasias ósseas apresentam uma grande variedade histológica de subtipos, o que dificulta a diferenciação celular nesses tumores e torna o diagnóstico muitas vezes inconclusivo, levando a atrasos na terapêutica e prognósticos dos tumores. Sendo assim, as mudanças genéticas específicas devem ser investigadas na oncologia clínica, pois auxiliam nas respostas quanto aos diagnósticos para que a terapêutica e o prognóstico sejam adequados (WALTHER et al., 2011).

1.4.2 Neoplasias ósseas e genética

Com os avanços de novas técnicas moleculares e identificação de alterações genéticas, foi possível detectar a base genética de muitos tumores ósseos. Diversos estudos foram realizados e mostraram que baseados nas alterações moleculares, os tumores ósseos podem ser classificados como tumores com cariótipos simples e outros com cariótipos complexos. Alterações específicas de gene recorrentes, que ocorrem geralmente no grupo de tumores com cariótipos simples, podem alterar a transcrição, a função do gene e causar alteração da sinalização. Além disso, com a difícil caracterização radiológica, clínica e histológica, as análises genéticas fazem diferença, desde análises citogenéticas até análises moleculares. (BARUFFI et al, 2003; LAM et al., 2019).)

Além disso, em muitos casos, observa-se que as alterações estão são primariamente moleculares e essas descobertas estão abrindo portas para novas áreas de pesquisa, como por exemplo a área da Epigenética, que vem sendo mais estudada na biologia óssea. Observa-se que os progressos da tecnologia têm proporcionado uma facilidade e melhora para identificação do desenvolvimento do câncer, porém ainda é pequeno o conhecimento das alterações (epi)genéticas em lesões ósseas. (ZELZER; OLSEN, 2003)

1.5. Epigenética

1.5.1 Conceitos gerais

Epigenética é considerada uma área de estudo que examina as alterações envolvendo o DNA mas não alteram sua sequência. Essas modificações podem ser herdáveis e reversíveis, afetando a atividade do genoma, levando a alterações na estrutura da cromatina e na forma com que os genes são expressos. Esse processo leva a mudanças no fenótipo sem alterar a sequência de bases do DNA. Estas modificações, no entanto, se mantêm à medida que as células se dividem e podem ser herdadas, apenas em alguns casos, por meio das gerações. Além disso, podem auxiliar a determinar se os genes são ativados ou desativados, ou seja, são expressos em proteína ou silenciados e isso garante a produção de proteínas necessárias (REIK et al, 2001; ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Os principais mecanismos epigenéticos que podem influenciar a expressão gênica são basicamente três. As modificações químicas nas caudas de histonas, as quais ocorrem nas subunidades de histonas H3 e H4, as alterações químicas nessas caudas levam a interações da histona com o DNA e as proteínas nucleares, o que possibilita ou não que os genes sejam acessados pela maquinaria de transcrição e por fatores de regulação, levando a expressão ou silenciamento. (BÁRTOVÁ et al., 2008).

Outro mecanismo de regulação epigenética ocorre por meio de modificações pós transcricionais e são os denominados RNAs não codificadores (ncRNAs). Esta classe de RNAs funcionam a partir de interações com proteínas que modificam a cromatina, recrutando sua atividade catalítica para locais específicos do genoma, e, portanto, influenciando os estados da cromatina e levando a modificações na expressão gênica. (LEE, 2012 et al., 2013)

O mecanismo epigenético mais bem caracterizado e mais estudado atualmente é a metilação do DNA, e é uma das principais mudanças epigenéticas que ocorrem em mamíferos. Este mecanismo se dá em uma modificação química da cadeia de DNA que pode ser herdada e subsequentemente removida, sem que altere a sequência original da molécula, é um mecanismo amplamente encontrado em organismos eucariotos vivos. (LOWDON et al., 2016).

A metilação que mais se destaca e é melhor caracterizada consiste na adição de um grupo metil (CH_3) no carbono 5 das citosinas de bases nitrogenadas, que são encontradas como dinucleotídeos Citosina-fosfato-Guanina (chamados de ilhas CpG), resultando na conversão de citosinas para 5-metilcitosinas (5-Mc) na sequência de DNA (SMITH; MEISSNER, 2013). A modificação química na estrutura da molécula de DNA pode afetar a expressão gênica, pois impede a ligação de fatores de transcrição aos sítios de reconhecimento presentes nas regiões reguladoras. Então, a metilação das ilhas CpGs, é um dos mecanismos que influencia a regulação da expressão dos genes. (BOGDANOVIĆ; VEENSTRA, 2009).

Em camundongos e humanos, cerca de 60 a 70% dos genes têm uma ilha CpG em sua região promotora, sendo que em praticamente todos os organismos estudados a metilação nas regiões promotoras se correlaciona negativamente com a expressão gênica, apesar de não ser uma regra (DEATON; BIRD, 2011).

As ilhas CpGs são metiladas através da catalisação de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (Figura 2) (BESTOR, 2000). Em vertebrados, geralmente são encontrados três subtipos de DNMTs, responsáveis pela metilação de DNA: *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*. A *DNMT1*, responsável pela restauração dos sítios hemi-metilados, que ocorrem durante a replicação do DNA, em um processo denominado metilação de manutenção, no qual ocorre cópia do padrão de metilação da fita original. As *DNMT3a* e

DNMT3b, estão relacionadas com a aquisição de novos sítios metilados e comandam a metilação *de novo*. Essas enzimas fazem parte das regulações de expressão dos genes e trabalham para a manutenção e diferenciação dos diferentes tipos celulares ao longo do desenvolvimento e vida de um organismo. (BESTOR, 2000).

Figura 2: Mecanismos de metilação e desmetilação do DNA mediados pelas enzimas DNMTs e TETs. A metilação do DNA (5-mC) é catalisada pelas enzimas da família DNMT as quais adicionam radicais metis ao carbono 5' das citosinas-guaninas durante a divisão celular (moificado de BESTOR, 2000).

As primeiras indicações de ligação epigenética com estudos de câncer foram derivadas de análises de expressão gênica e metilação do DNA. Padrões de expressão anormais ou alterações genômicas nos reguladores de cromatina podem levar a indução e manutenção de vários tipos de câncer. Mudanças no perfil de metilação foram encontrados em grande parte dos tipos de câncer, além de alterações também em distúrbios do desenvolvimento e envelhecimento celular. Diversos métodos foram desenvolvidos para determinar a taxa de metilação do DNA, fornecendo informações sobre o perfil de metilação, desde o estado inicial de metilação de genes específicos até o conteúdo de metilação de todo o genoma, denominado metilação global. Alterações

epigenéticas, podem alterar a expressão de genes críticos e importantes para o desenvolvimento de uma grande variedade de pré-neoplasias e neoplasias. (Figura 3) (TOH et al., 2017; ARANTES et al., 2014).

Figura 3: Representação da perda de metilação do DNA que pode resultar em transcrição aberrante no gene alvo. Alterações epigenéticas, podem alterar a expressão de genes críticos e importantes para o desenvolvimento de uma grande variedade de pré-neoplasias e neoplasias (modificado de TOH et al., 2017; ARANTES et al., 2014).

1.5.2 Imprinting genômico e H19DMR.

Sabe-se que os mamíferos são organismos diplóides, ou seja, apresentam células que possuem dois conjuntos de cromossomos, um herdado da mãe e outro do pai, dessa forma os mamíferos apresentam duas cópias de cada gene. O *imprinting* genômico é um processo epigenético, o qual distingue os alelos maternos e paternos, ou seja, os genes são expressos de uma forma origem-parental-específica, ou seja, apenas uma cópia parental específica de um gene será expressa, a outra cópia será silenciada. Esse fenômeno ocorre em apenas alguns genes do nosso genoma, pois a maioria dos nossos genes é expresso igualmente quando herdado de um dos pais. (REIK; WALTER, 2001) (DARWICHE, 2020).

As marcas epigenéticas são estabelecidas na linhagem germinativas dos pais e são mantidas através de divisões celulares mitóticas nas células somáticas de um organismo (WOOD; REBECCA, 2006). Grande parte dos genes que sofrem *imprinting* estão agrupados em conjunto e são controlados por regiões ricas em ilhas CpGs, pequenas sequências de DNA ricas em bases guanina (G) e citosina (C) e o (p) refere-se ao grupo fosfato (DEATON; BIRD, 2011). Esse conjunto apresenta uma região controladora de *imprinting* (ICRs- *Imprinting Control Regions*), as quais regulam a expressão gênica de acordo com a origem parental e incluem regiões diferencialmente metiladas (DMRs). (JANG et al., 2017; PLASSCHAERT; BARTOLOMEI, 2014; MACKAY et al., 2017).

Como exemplo, as expressões dos genes *H19* (do inglês, *Imprinted Maternally Expressed Transcript*) e *IGF2* (*Insulin-like Growth Factor 2*) estão intimamente ligadas, pois ambos os genes estão localizados na ICR1 (*Imprinting Control Regions*) e que inclui também a *H19DMR*, metilada no alelo paterno e desmetilada no alelo materno (Figura 4) (RATAJCZAK, 2012). Esse acoplamento pode ser perdido em casos de perda de *imprinting* (ilha CpG metilada) ou mutação do promotor (PATTEN et al., 2016; TIETZE; KESSLER, 2020). O gene *H19* é mapeado no cromossomo 11p15.5, esse gene pode atuar como um supressor tumoral (ANGRAND et al., 2015; KANDURI, 2016). Estudos demonstram a associação com metástase e envolvimento na progressão de vários tipos de câncer humano, além disso, já foi descrito que a diminuição da expressão do gene *H19* pode promover migração e invasão de células de osteossarcoma, um tipo de neoplasia óssea. (ZHAO; MA, 2018; CHAN et al., 2014).

Figura 4: Expressões dos genes *H19* (do inglês, *Imprinted Maternally Expressed Transcript*) e *IGF2* (*Insulin-like Growth Factor 2*). Ambas são consideradas intimamente ligadas, pois os dois genes estão localizados na ICR1 (*Imprinting Control Region 1*) que inclui também a *H19*DMR, metilada no alelo paterno e desmetilada no alelo materno.

O Laboratório de Genética e Câncer da UNESP de Botucatu, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi, há muitos anos vem realizando análises Citogenética e de Biologia Molecular em alterações ósseas. No laboratório foram desenvolvidos vários Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) envolvendo osteomielite e neoplasias ósseas.

O Laboratório de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP, coordenado pela Profa. Dra. Ester Silveira Ramos trabalha com o gene *H19* e doenças relacionadas a problemas do *imprinting* genômico desde 1998 e tem disponíveis as técnicas para sua avaliação bem estabelecidas pelo grupo de pesquisa.

Com os trabalhos da literatura sobre o envolvimento do gene *H19* em neoplasias e na regeneração ósseas (PENG et al., 2018; ZHAO; MA, 2018), os dois laboratórios que

já desenvolviam trabalhos em colaboração para análises moleculares e citogenéticas, passaram a incluir a análise da região H19DMR em seus estudos.

2. Hipótese

2. Hipótese

A porcentagem da metilação da H19DMR pode variar em casos de lesões ósseas.

3. Objetivos

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos gerais

Analisar o padrão de metilação do DNA do gene *H19* em lesões ósseas e associar com a gravidade e prognóstico das lesões.

3.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a possibilidade de análise de DNA extraído de células em suspensão em fixador, obtidas a partir de cultura de amostras das lesões ósseas.
- Analisar o padrão de metilação da H19DMR por meio de PCR em tempo real em pacientes com lesões ósseas (osteomielite e fibrossarcoma).
- Quantificar o número de cópias do cromossomo X por eletroforese capilar.
- Comparar a metilação da H19DMR em sangue periférico com a da lesão óssea.

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta e seleção do material

Este estudo foi previamente aprovado pelos processos CEP-IBB-UNESP 144/08 e CONEP 25000.003012/00-54. Foram utilizadas amostras de tecido tumoral (biópsias de tumor) e amostras de sangue de pacientes acometidos por osteomielite, coletadas de pacientes nunca submetidos a tratamento quimio ou radioterápico. As coletas das amostras teciduais foram realizadas em condições estéreis em centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP) da cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil. As amostras foram processadas/estocadas no Laboratório de Genética e Câncer (GECAN) do IBB- UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi onde também foi realizada a análise citogenética, descrita nas monografias de alunos do Prof. Marcelo, em especial na do aluno João Antonio Priolli e Silva (2011) da UNESP-Botucatu.

As análises epigenéticas foram realizadas no Laboratório de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP.

4.2 Cultivo celular e preparação das lâminas

Observação: A descrição foi acrescentada devido à sua importância para a posterior utilização do material fixado para as análises moleculares e a comparação dos resultados.

Para a realização do cultivo das células das lesões foi utilizado o protocolo de cultivo de células como realizado por Baruffi (BARUFFI et al, 2001). Inicialmente, as amostras de tecido frescas foram seccionadas e dissociadas enzimaticamente com solução

de collagenase 0,4% (tipo IV, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e transferidoas para frascos de cultura contendo meio HAM F-10 (Sigma) suplementado com 15% de soro bovino fetal (20%), vitaminas e antibióticos. As culturas de células foram mantidas em estufa a 37 ° C e uma alta umidade relativa de 95% e alimentadas duas vezes por semana até cobrir o fundo da garrafa de cultivo. O tempo de cultura foi ajustado individualmente para cada caso, dependendo da atividade mitótica.

Para a interrupção do fuso mitótico as células na fase de crescimento potencial foram tratadas com colchicina 0,0016% por pelo menos 6 horas. Posteriormente adicionou-se solução de tripsina-EDTA para promover o desprendimento das células do frasco, então a solução foi centrifugada a 1000 rpm, por pelo menos 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma solução hipotônica 0,075M KCI foi adicionada ao cultivo por 30 min, para facilitar a visualização da célula. Seguido do uso de um fixador metanol: ácido acético (3: 1). As lâminas histológicas utilizadas no processo foram rigorosamente limpas e mantidas úmidas em frascos, o material fixado foi devidamente ressuspensionado com pipeta Pasteur e pingado a uma distância de aproximadamente 1m das lâminas úmidas e levemente inclinadas, as lâminas pingadas foram então colocadas para secar à temperatura ambiente. Após secas, as lâminas foram coradas com Giemsa (Merck) diluído em tampão fosfato 0,06M (1:3) e observadas em microscópio óptico para a determinação do cariótipo. O *International Standard for Human Cytogenetic Nomenclature* (MCGOWAN-JORDAN et al., 2016) foi utilizado para a descrição cariotípica. O material fixado foi estocado e utilizado posteriormente para a análise molecular, de Hibridação in situ por fluorescência e mutações/metilação do DNA.

4.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico total, amostras de sangue periférico e do material fixado (suspensão em fixador de células obtidas a partir da cultura da amostra da lesão) durante a preparação da análise citogenética foram submetidas ao método de extração *salting out* como descrito e modificado (OLERUP et al., 1992). Para isso inicialmente o material foi digerido em 50 µL de solução de lise (Sacarose 0,32M; Tris-HCl (pH 7,5) 12mM; MgCl₂ 5mM; Triton-X 1%) contendo 1 µL de Proteinase K (Qiagen, Hilden Germany) na concentração de 20 ng/µL. A digestão foi realizada à 55°C por 40 minutos seguida de um passo de inativação da enzima à 95°C por 10 minutos. Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado em freezer -20°C para a realização das análises moleculares.

4.4 Avaliação do padrão de metilação da H19DMR

Para identificação do padrão de metilação da H19DMR foi utilizada a técnica de PCR em tempo real associada à digestão com enzima sensível à metilação, segundo descrito por GOMES et al.(2007). A partir das amostras foram obtidos 0,2µg de DNA genômico, o qual foi submetido a uma enzima sensível a metilação, *HpaII*, capaz de clivar apenas os alelos não metilados, uma enzima (isoesquizômero) não sensível a metilação, *MspI*, e um controle não digerido. A digestão foi realizada em meio com 1mM Bis Tris Propano-HCL, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT (ph 7.0) com 5 U da enzima *HpaII* e *MspI* (NE – New England) a 37°C, *overnight*, seguido por uma etapa de 60°C durante 20 minutos para a inativação. O sistema de detecção foi o StepOnePlus (Applied Biosystems) com 5 µL *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied BioSystems) e 0,4 µMol

de cada *primer* (H19 UPH19II: 5' - CAATGAGGTGTCCCAGTTCCA – 3' e H19 Real T – 2: 5' – CTATGAGTGTCTATTCCCA – 3'). Cada amostra foi quantificada em duplicata ou triplicata, com desvio máximo estipulado em 0,2. Todo resultado foi confirmado ao menos uma vez, com uma nova digestão e nova amplificação em uma placa de reação diferente da primeira análise. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 minutos e 35 ciclos (95°C por 15 segundos e 61°C por 60 segundos), seguido por análise de dissociação realizada de 60°C a 95°C, variando 0,1°C a cada segundo. A porcentagem de DNA metilado foi calculada pela fórmula: $(1/2)^{d-nd}$, sendo *d* a medida do *ct* (limiar do ciclo) do DNA digerido e *nd* a medida do *ct* do DNA não digerido. (GOMES et al., 2007).

4.5 Quantificação de cópias do cromossomo X

O gene do receptor de andrógeno humano (HUMARA) está localizado na região Xq11.12, possui duas regiões de repetições em tandem, caracterizadas como microsatélites, polimórficas no éxon 1, com números diferentes de repetições CAG e GGC resultando em tamanhos variados de poliglutamina e poliglicina. Essa região de CAG confere uma heterozigosidade de aproximadamente 87% e, dessa forma, a chance do segundo cromossomo X ter alelo diferente do primeiro é alta; permitindo que ambos os alelos sejam diferenciados após a amplificação por PCR (YORIFUJI et al., 1997).

Aos produtos da PCR realizada com os primers HUMARA-S (5'-GTGCGCGAAGTGATCCAGAA-3') e HUMARA-AS (5'-CCAGGACCAGGTAGCCTGTG-3') (1µL) foram adicionados 8,7µL de formamida (Hi-Di Formamida, Applied Biosystems) e 0,3µL do padrão de massa molecular LIZ 500,

marcado com o fluorocromo LIZTM (fluorescência laranja) (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese capilar com o polímero POP7 (Applied Biosystems), utilizando a plataforma ABI PrismTM 3130 Genetic Analyzer. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa GeneMapperM (Applied Biosystems). Na eletroforese capilar, é quantificado um alelo em relação ao outro a partir do cálculo da área dos picos. Na maioria dos casos, de sangue periférico de mulheres normais são visualizados dois picos com áreas similares.

5. Resultados

5.1 Resultados

5.1.1 Diagnósticos

As amostras de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu foram coletadas e armazenadas pela equipe do Laboratório GECAN. A revisão dos casos e a seleção dos pacientes foram realizadas sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi. As hipóteses diagnósticas, dos casos analisados nesta dissertação foram de três casos de osteomielite (Casos 1, 2 e 3) e um de fibrossarcoma (Caso 4) (Tabela 1). O Caso 1 apresentou um quadro de osteomielite mais grave em relação aos outros dois, precisando de intervenções posteriores e com progressão para fibrossarcoma (vide Apêndice).

Tabela 1: Identificação dos casos e análise dos resultados das análises citogenéticas e moleculares.

Caso (registro GECAN)	Diagnóstico	Sexo	Análise citogenética (alterações clonais)	H19DMR (%)		Cromossomo X (suspensão) %
				Sangue	Suspensão	
1 (T35)	Osteomielite (progressão para fibrossarcoma)	Feminino	-X[13], -1[6], -2[4], -10[4], -11[4], add (12) (q24.3) [2], del(17) (p13) [3], -19[3], -20[4], -21[3], -22[4], +mar1[4], +mar2[5], +mar3[3]	22,0	27,5	Alelo 1= 43,0 Alelo 2= 57,0
2 (T36)	Osteomielite	Masculino	-2[3], -4[3], -12[3], -15[4], -17[3], -18[4], -19[3], -20[4], +21[2], add(21)(p13)[2], +mar2[2]	46,5	33,0	
3 (T37)	Osteomielite	Feminino	Não foram obtidas metáfases	34,5	64,0	
4 (T08)	Fibrossarcoma	Feminino	Não foram obtidas metáfases	100,0	12,0	

Observação: a metilação da H19DMR considerada normal foi entre 35 e 65%, uma vez que, por se tratar de gene que é regulado por *imprinting* genômico, a metilação (50%) ocorre apenas no cromossomo paterno. Detalhes da análise citogenética podem ser encontrados em Anexos.

5.1.2 Análises citogenéticas

Foram realizadas as análises citogenéticas das amostras (SILVA, 2011). Para os pacientes 1 e 2 foram observadas metáfases e foi possível diferenciar as alterações clonais (Tabela 1) das não clonais. Não foram obtidas metáfases dos Casos 3 e 4 (SILVA, 2011).

No Caso 1 (Tabela 1) foi possível observar, como dados importantes, a deleção do braço curto do cromossomo 17 [del(17)(p13)], presença de cromossomos marcadores e monossomia dos cromossomos X (em 13 células) e do 11 (em 4 células), onde está mapeado o gene *H19*.

5.1.3 Análises moleculares

Na Figura 8, são apresentados os resultados das reações utilizados para o cálculo da percentagem de metilação de cada amostra.

Figura 5: PCR em tempo real com o material ND (não digerido); HpaII (material digerido com a HpaII - que é sensível à metilação e só corta o DNA quando ele não está metilado) e MspI (corta o DNA no mesmo sítio da HpaII, indiferentemente de o DNA estar metilado ou não – foi utilizado como um controle).

C1 sangue	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ		C1 suspensão	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ
ND	24,81209	24,8242	2,184616	0,219971		ND	27,64284	27,75397	1,861632	0,275165
	24,8363						27,8651			
HpaII	27,07746	27,00881				HpaII	29,55864	29,6156		
	26,94017						29,67257			

C2 sangue	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ		C2 suspensão	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ
ND	25,75601	25,55626	1,102895	0,465581		ND	26,66612	26,74482	1,590919	0,33196
	25,35652						26,82352			
HpaII	26,8607	26,65916				HpaII	28,44735	28,33574		
	26,45762						28,22413			

C3 sangue	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ		C3 suspensão	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ
ND	25,64058	25,6907	1,533726	0,345384		ND	32,97409	32,7326	0,64275	0,640491
	25,74082						32,49111			
HpaII	27,08441	27,22443				HpaII	33,65009	33,37535		
	27,36445						33,10061			

C4 sangue	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ		C4 suspensão	Ct	MÉDIAS	n	(1/2) ⁿ
ND	27,10517	26,78531	-0,5193	1,433261		ND	29,69645	29,66619	3,068572	0,119198
	26,46546						29,63593			
HpaII	26,40704	26,26601				HpaII	32,71395	32,73476		
	26,12499						32,75557			

Figura 6: Dados obtidos pela análise da PCR em tempo real associada a enzima sensível à metilação para o cálculo da porcentagem de metilação da H19DMR (Tabela 1). Onde C=caso, ND= Não Digerido, Ct= cycle threshold.

Quanto à quantificação do Cromossomo X, os alelos apresentaram áreas semelhantes, o que indica um número de cópias semelhantes entre os dois cromossomos X do Caso 01 (Figura 10).

Figura 7: Resultado da eletroforese capilar para quantificação do número de cópias do cromossomo X por meio de análise semi-quantitativa de dois alelos do gene do Receptor de Andógenos. Os número 192,5 e 196,0 indicam os alelos, e os 5403 e 7240 são relativos às áreas dos picos utilizadas para o cálculo do número de cópias.

6. Discussão

6.1 Discussão

No presente trabalho, foram analisadas amostras de três pacientes com osteomielite e um com fibrossarcoma. Acredita-se que pacientes que desenvolvem lesões proliferativas ósseas, as quais são consideradas não neoplásicas, como por exemplo, a osteomielite (OM), na tentativa de cessar o processo de inflamação e infecção, acabam gerando uma reação no organismo que levam a diversas alterações celulares, o que pode desencadear alterações tanto citogenéticas como moleculares e consequentemente levar ao surgimento de processos tumorais.

Resultados prévios dos membros da equipe do Laboratório GECAN, nos quais pacientes acometidos por lesões ósseas foram submetidos a análise citogenética, observaram diversas alterações cromossômicas clonais (BARUFFI, 2001; SILVA 2011). Sendo assim, é considerado que há uma correlação entre processos proliferativos reparativos ósseos e alterações citogenéticas, o que pode levar também a alterações moleculares e consequentemente o surgimento de neoplasias. Desse modo, se faz importante descrever essas correlações, visto que há poucos dados na literatura.

Devido à dificuldade de obtenção de material passível de análise citogenética convencional de lesões ósseas, a análise molecular vem aos poucos substituindo essa estratégia inicial. No entanto, algumas alterações são melhor caracterizadas por essa técnica. No caso da monossomia do cromossomo X do Caso 1, a análise por eletroforese capilar não teve resolução suficiente para a detecção dessa alteração cromossômica.

Neste trabalho, foi realizada análise do material obtido das células em suspensão. Como não havia mais material da amostra para processamento e em dois casos (3 e 4) não havia também células em metáfase para a análise citogenética convencional, o aproveitamento desse material foi importante para a análise da quantificação relativa da metilação.

O fibrossarcoma (FS) é um tumor maligno extremamente raro e não caracterizado geneticamente, representa menos de 5% de todas as neoplasias malignas ósseas primárias (BERNER et al, 2018). Em FS de adultos, estudos cromossômicos demonstraram que aneuploidias e múltiplos rearranjos estruturais são mais comuns, porém, nenhuma translocação recorrente específica foi identificada em (BERNER et al, 2018).

O Caso 01, uma paciente de 42 anos de idade acometida por osteomielite e que evoluiu de forma mais agressiva, apresentou várias alterações cromossômicas numéricas envolvendo a maioria dos cromossomos, o que pode ter ocorrido devido o processo proliferativo reparativo ósseo emergencial durante o período em que a paciente havia sido acometida por osteomielite, o que provavelmente levou a um aumento da proliferação celular.

No Caso 1, pode-se observar que houve alterações com envolvimento do braço curto do cromossomo 17, nesse caso houve deleção onde está mapeado o gene *TP53* que pode ter propiciado uma evolução mais grave neste caso. A paciente também apresentou monossomia do cromossomo X em 11 células. Por se tratar de um cromossomo onde ocorre a inativação normal ao acaso, um processo epigenético complexo, que exige a ação dos vários mecanismos epigenéticos, foi realizada a análise por eletroforese capilar para a detecção do número de cópias desse cromossomo. No entanto, a resolução da técnica de Biologia Molecular não foi suficiente para a observação da monossomia, o que mostra a importância da associação de técnicas na estratégia de investigação desses casos, além da utilização da análise citogenética que mantém seu lugar dentro da pesquisa dessas lesões. Foi indicado, para este caso, a realização da pesquisa posterior de inativação preferencial do cromossomo X.

A alteração que mais interessou a este trabalho foi a monossomia do cromossomo 11 encontrada no Caso 1. Embora em poucas células (4), é neste cromossomo que está mapeada a H19DMR. A análise de metilação mostrou hipometilação tanto em sangue quanto no material da cultura da lesão. Como a expressão monoalélica do gene *H19* normalmente é exclusivamente materna, a perda de um cromossomo paterno (normalmente com o alelo do H19 hipermetilado) poderia levar a um aumento da detecção de células com hipometilação.

Já o Caso 02, um paciente acometido por osteomielite com progressão menos agressiva que o Caso 1, embora as alterações cromossômicas encontradas, a metilação da H19DMR foi considerada normal no sangue mas com hipometilação na lesão, embora menos importante que no primeiro caso.

O Caso 3, com uma evolução mais benigna, mostrou resultados muito próximos do normal, embora no limite inferior no sangue e superior na lesão.

No caso de fibrossarcoma (Caso 4), já uma lesão maligna e não uma osteomielite, os resultados foram bem marcantes com uma hipermetilação de 100% em sangue e uma hipometilação de 12% na lesão.

Em relação as análises moleculares, sabe-se que a modulação epigenética da expressão gênica é altamente anormal em cânceres, que frequentemente apresentam hipermetilação da ilha CpG do promotor aberrante e silenciamento transcricional de genes supressores de tumor e fatores de pró-diferenciação (MICHALAK et al, 2019).

Foi sugerido que o acúmulo de anormalidade epigenéticas age como um evento precoce que predispõe células tumorais a adquirir mais mutações e instabilidades genômica (TOH et al, 2017). Isso se deve ao fato de que a maquinaria epigenética é importante para a manutenção dos processos normais das células e que o acúmulo de alterações anormais, nessa maquinaria pode levar a erros aumentados, dando origem a células alteradas e até mesmo tumorais.

A perda do *imprinting* de *IGF2* e/ou *H19* ocorre comumente no câncer e pode estar envolvida na transformação maligna (ULANER et al, 2003), embora o número reduzido de casos, observa-se que há uma alteração na metilação dos pacientes com pior prognóstico ou com uma lesão maligna quando comparado ao paciente que por enquanto não apresentou tal evolução, e essa mudança na metilação da região H19DMR, leva a mudanças no *imprinting*.

Já foi descrito que um mecanismo potencial de transformação maligna envolve regiões diferencialmente metiladas (DMRs) que atuam como modificadores epigenéticos da expressão alélica, recrutando proteínas que se ligam especificamente ao DNA metilado ou não metilado (JIN; YUN, 2018).

O gene *H19* é um dos genes mais expressos durante a indução das células tronco primitivas com meios de indução osteogênicos (PENG et al., 2018). Embora considerado como um supressor tumoral na maioria dos trabalhos, o gene *H19* pode ter, para alguns tumores, uma ação diferente. No trabalho de ZHAO e MA (2018), o aumento da expressão do gene *H19* estava relacionado com o desenvolvimento de metástases à distância e à uma menor sobrevida dos pacientes. O *knockdown* desse gene reduziu significativamente a migração e a invasão das células de osteossarcoma.

No presente trabalho, a hipometilação foi associada a casos de evolução mais agressiva da osteomielite e também no caso de fibrosarcoma utilizado para comparação. Esses resultados são compatíveis com os dados de estudos mais recentes envolvendo a regeneração e o mau prognóstico em lesões ósseas.

Embora o número pequeno de amostras analisadas, os resultados obtidos de um provável aumento da expressão do *H19*, devido à sua hipometilação, poderia

corresponder a uma tentativa de regeneração óssea, papel que já tem sido relacionado a este gene e mostraria um potencial de utilização da H19DMR como biomarcador.

7. Conclusões

7. Conclusões

Além do DNA extraído de sangue periférico, foi possível avaliar o padrão de metilação da H19DMR a partir do DNA extraído das células em suspensão fixadora provindas da cultura das amostras das lesões ósseas, utilizadas para a análise citogenética.

No mesmo material (células fixadas em suspensão), foi possível a quantificação relativa do número de cópias do cromossomo X por eletroforese capilar.

A monossomia clonal do cromossomo X detectada pela análise citogenética não foi confirmada pela análise de alelos por eletroforese capilar devido ao número de células com monossomia no mosaicismo ser menor do que a resolução da técnica molecular. Esse fato mostra a importância de associação de mais de uma estratégia de investigação para uma análise mais precisa desses casos.

O estudo mostrou como resultado a hipometilação da H19DMR proporcional nos casos mais graves. Isso indicaria um provável aumento da expressão do gene *H19*, que, embora seja reconhecido como um gene supressor tumoral, nos casos de lesão óssea, teria um papel mais relacionado provavelmente com a tentativa de regeneração óssea da lesão e quadros mais agressivos.

9. Bibliografia

ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, 2016.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res**, 2008.

ANGRAND, P.O.; VENNIN, C.; LE BOURHIS, X.; ADRIAENSSENS, E. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. **Front Genet**, 2015.

BÁRTOVÁ, E. *et al.* Histone modifications and nuclear architecture: A review. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 2008

BARUFFI, M.R.; ENGEL, E.E.; SQUIRE, J.A.; TONE, L.G.; ROGATTO, S.R. Chromosomal imbalances detected in primary bone tumors by comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. **Genetics and molecular biology**, 2003.

BARUFFI, MR; VOLPON, JB; NETO, JB; CASARTELLI, C. Osteoid osteomas with chromosome alterations involving 22q. **Cancer Genet Cytogenet**. 2001.

BERNER, K; JOHANNESSEN, TB; HALL, KS; BRULAND, ØS. Clinical epidemiology and treatment outcomes of spindle cell non-osteogenic bone sarcomas - A nationwide population-based study. **J Bone Oncol**, 2018.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, 2000.

BOGDANOVIĆ, O.; VEENSTRA, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: Developmental requirements and function. **Chromosoma**, 2009.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2018.

DÂNGELO, J.G.; FATTINI, C.A. Anatomia humana sistêmica e segmentar 2. ed. **Atheneu**, 1988.

DARWICHE. N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. **Am J Cancer Res**, 2020.

DEATON, A.M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & Development**, v. 25, n. 10, p. 1010–1022, 15 maio 2011.

DORFMAN, H.D.; BOGDAN C. Bone cancers. **Cancer** **75**, 1995.

FISHBEIN, A.; HAMMOCK, B.D.; SERHAN, C.N.; PANIGRAHY, D. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation?. **Pharmacol Ther**, 2020.

GOMES, MV; GOMES, CC; PINTO, W JR; RAMOS, ES. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. **American Journal of Medical Genetics, Part A**. 2007.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S. R; LEWONTIN, R. C.; CARROL, S.B. **Introdução à genética** 9. ed. **Guanabara Koogan**, 2008.

HAMEED, M.; HOWARD, D. Primary malignant bone tumors—recent developments. **Seminars in diagnostic pathology**, 2011.

JANG, H.S.; SHIN, W.J.; LEE, J.E.; DO, J.T. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. **Genes**, 2017.

JIN, Z; YUN, L. "DNA methylation in human diseases." **Genes & diseases**, 2018.

JORGE, L. S.; CHUEIRE, A.G.; ROSSIT, A.R.B. Osteomyelitis: a current challenge. **Braz J Infect Dis**, 2010.

KANDURI, C. Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. **Biochim Biophys Acta**, 2016.

KIM, S; YU, N.K; KAANG, B.K. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. **Exp Mol Med**, 2015.

KUMAR, V.; MITCHEL, R.N.; Robbins & Cotran: Fundamentos de Patología 7.ed. **Elseiver Editora Ltda**, 2006.

LAM, S.W.; VAN, I.D.; CLETON-JANSEN, A.M.; SZUHAI, K.; BOVÉE, J.V. Molecular Pathology of Bone Tumors. **J Mol Diagn**, 2019.

LEE, J. T. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. **Science**, 2012.

LOWDON, R. F.; JANG, H. S.; WANG, T. Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes. **Trends in Genetics**, 2016.

MACKAY, D.J, TEMPLE IK. Human imprinting disorders: Principles, practice, problems and progress. **European journal of medical genetics**, 2017.

MCGOWAN-JORDAN, J; SIMONS, A; SCHMID, M. An international system for human cytogenomic nomenclature. **S. Karger Basel**. 2016.

MICHALAK, EM; BURR, ML; BANNISTER, AJ; DAWSON, MA. The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2018.

OLERUP, O; HENRIK, Z. "HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation." **Tissue antigens**.1992.

PATTEN, M.M.; COWLEY, M.; OAKEY, R.J.; FEIL, R. Regulatory links between imprinted genes: evolutionary predictions and consequences. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2016.

PLASSCHAERT, R.N.; BARTOLOMEI, M.S. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. **Development**, 2014.

RAINIER, S; JOHNSON, LA; DOBRY, CJ; PING, AJ; GRUNDY, PE; FEINBERG, AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**. 1993.

RATAJCZAK, M.Z. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a

regulator of longevity, and a 'passkey' to cancerogenesis. **Folia Histochem Cytobiol**, 2012.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, 2001.

ROGATTO, SR; RAINHO, CA; ZHANG, ZM; FIGUEIREDO, F; BARBIERI-NETO, J; GEORGETTO, SM et al. Hemangioendothelioma of bone in a patient with a constitutional supernumerary marker. **Cancer Genet Cytogenet**. 1999.

SAMARAS, V.; RAFAILIDIS, P.I.; MOURTZOUKOU, E.G., PEPPAS, G.; FALAGAS, M. E. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 2010.

SCHOENHERR, C.J; LEVORSE, J.M; TILGHMAN, S.M. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. **Nat Genet**, 2003.

SHINGO, C.; JOHN S. (2010). Osteomyelitis. **Dis Mon**, 2010.

SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: Roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, 2013.

SOARES, MR; HUBER, J; RIOS, AF; RAMOS, ES. Investigation of IGF2/ApaI and H19/RsaI polymorphisms in patients with cutaneous melanoma. **Growth Horm IGF Res**, 2010.

SOBIN, L.H. International union against cancer. **TNM Classification of Malignant Tumour**, 2002.

SUDOYO, A.W.; HARDI, F. Cytogenetics in solid tumors: lessons from the Philadelphia Chromosome. **Acta Med Indones**, 2011.

TADOKORO, K; FUJII, H; INOUE, T; YAMADA, M. "Polymerase chain reaction (PCR) for detection of ApaI polymorphism at the insulin like growth factor II gene (IGF2)." **Nucleic acids research**. 1991.

TIETZE, L.; KESSLER, S.M. The Good, the Bad, the Question—*H19* in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 2020.

TOH, T.B.; LIM, J.J.; CHOW, E.K.; Epigenetics in cancer stem cells. *Mol Cancer*, 2017.

ULANER, GA; VU, TH; LI, T; HU, JF; YAO, XM; YANG, Y; et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet*, 2003.

WALTHER, C.; DOMANSKI, H.A.; STEYERN, F.V.; MANDAH, N.; MERTENS, F. Chromosome banding analysis of cells from fine needle aspiration biopsy samples from soft tissue and bone tumors: is it clinically meaningful? *Cancer Genetics*, 2011.

WOOD, A.J.; REBECCA, J.O. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet*, 2006.

ZELZER, E.; OLSEN, B. The genetic basis for skeletal disease. *Nature*, 2003.

10. Anexos

Anexo A - Parecer do CEP do Hospital das Clínicas da UNESP – Botucatu/SP

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de maio de 2008

Of. 144/08-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi,
Departamento de Genética do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Dr. Marcelo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa **"Estudo genético em lesões pseudotumorais e pré-neoplásicas e sua relação com sarcomas ósseos"**, a ser conduzido por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05 de maio de 2008, não sendo necessário seu envio à CONEP, haja vista cumprir a Resolução 340/2004 de Genética Humana.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Anexo B – Resultados da Análise de Citogenética**Caso 1 – T35 – Osteomielite crônica com progressão para fibrossarcoma**

M1) 43,XX,-3,-15,del(17)(p13),-18,-19,+mar1

M2) 42,X,-X,-8,-11,-20,-21,+mar1

M3) end 46,XX

M4) 46,X,-X,-2,-21,+mar1,+mar2,+mar3

M5) 44,X,-X,add(12)(q24.3),-20 – Figura 1

M6) 44,X,-X,-11,add(12)(q24.3)

M7) 44,X,-X,-3

M8) 41,X,-X,tas(5;7)(p15.3;q36),-10,-14,-15,-16,+mar4

M9) 45,X,-X,t(17;18)(q25;p11)

M10) 44,XX,-1,-2,-2,-4,-4,-22,+mar1,+mar5

M11) 45,XX,-1,-17,+mar6

M12) 44,X,-X,-11,-12,del(17)(p13)-22,+mar2,+mar7,+mar8 – Figura 2

M13) 42,X,-X,-4,-10,-19,-21,+mar3

M14) 43,XX,-1,del(17)(p13),-10,-20,+mar1

M15) 42,X,-X,-22,-22,+mar2

M16) 38,-X-X,-1,-2,-10,-11,-12,-19,t(19;7)(p13;q36)

M17) 46,XX

M18) 47,XX,-1,-1,+15,+16,-20,+mar2,+mar9

M19) 44,XX,-1,-2,-8,-22,+mar10,+mar11

M20) 46,X,-X,+mar3

M21) 47,X,-X,+mar2,+mar12

Alterações cromossômicas não clonais:

-3[2],-4[2],tas(5;7)(p15.3;p11)[1],-8[2],-12[2],-14[1],-15[2],+15[1],-16[2],
-17[1],t(17;18)(q25;p11)[1],-[1],t(19;7)(p13;q36)[1],end46,XX,+mar4[1],+mar5[1],
+mar6[1],+mar7[1],+,mar8[1],+mar9[1],+mar10[1],+mar11[1],+mar12[1]

Alterações cromossômicas clonais:

-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3]

Cariótipo composto:

38~47,XX,-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3] cp[19]/46,XX[1]

Caso 2 – T36 – Osteomielite aguda

M1) 37,-X-Y,-3,-4,-15,del(16)(q22),-17,-17,-20,-22

M2) 43,XY,del(12)(q24),-13,-16,-18

M3) 37,XY,-2,-7,-8,-8,-11,-13,-17,-19,-22

M4) 49,XY,+X,-15,+19,+21,+21

M5) 44,XY,-6,-9,-19,+mar1

M6) 47,XY,+21

M7) 42,XY,-2,-4,-12,-18,-20,+mar2 – Figura 1

M8) 43,XY,-12,-18,-20

M9) 46,X,-Y,+mar3

M10) 44,XY,-11,-12,add(21)(p13)

M11) 46,XY,+11,tas(15;21)(p13;p13),add(21)(p13),del(22)(q12)

M12) 46,Y,-X,+mar2,+mar4

M13) 45,XY,-17,-18,+mar5

M14) 44,XY,-10,-21

M15) 49,XY,+14,+mar6,+mar7

M16) 45,XY,+4,del(6)(q27),-14,-15,+17,-19

M17) 40,XY,-2,-4,-15,-16,-20

Alterações cromossômicas não clonais:

+X[1],-X[2],-Y[2],-3[1],+4[1],-6[1],del(6)(q27)[1],-7[1],-8[1],-9[1],-10[1],-11[2],
+11[1],del(12)(q24)[1],-13[2],+14[1],tas(15;21)(p13;p13)[1],-16[2],
del(16)(q22)[1],+17[1],+19[1],-21[1],-22[2],del(22)(q12),+mar1[1],+mar3[1],
+mar4[1], +mar5[1],+mar6[1],+mar7[1]

Alterações cromossômicas clonais:

-2[3],-4[3],-12[3],-15[4],-17[3],-18[4],-19[3],-20[4],+21[2],add(21)(p13)[2], +mar2[2],

Cariótipo composto:

37~47,XY,-2[3],-4[3],-12[3],-15[4],-17[3],-18[4],-19[3],-20[4],+21[2],+mar2[2],
add(21)(p13)[2] cp[14]/46,XY[0]

11. Apêndice

Dados clínicos dos pacientes

Caso 1 – T35

Paciente, sexo feminino, 43 anos, há 2 anos com dor em tornozelo esquerdo, com duas biópsias prévias compatíveis com osteomielite crônica. Teve piora do quadro de dor e dos achados radiológicos nos últimos meses. Quatro meses após a última biópsia, quando foi coletado material para esta pesquisa, a lesão progrediu para um fibrossarcoma de baixo grau, com realização de amputação do tornozelo esquerdo.

- Cultura: Streptococcus (alfa hemolítico) viridans
- Antibiótico: Oxacilina - sem melhora.
- Ressonância Magnética: Sinais de osteomielite crônica com osteomielite ativa, caracterizada por áreas de abscessos, fístulas e sequestros ósseos.
- Anatomopatológico 1 (2009): Biópsia óssea de tíbia esquerda - terço distal. Ausência de neoplasia. Processo inflamatório crônico.
- Anatomopatológico 2: Proliferação miofibroblástica benigna. Notas: A correlação anátomo-clínica-radiológica aponta para a possibilidade de osteomielite crônica.

*Anatomopatológico 3 (foi nesta biópsia que foi coletado o material analisado neste trabalho, em maio de 2011): Biópsia de lesão na tíbia esquerda. Ausência de neoplasia neste material. Material constituído por tecido de padrão miofibroblástico com intenso processo inflamatório crônico linfoplasmocitário.

Caso 2

Paciente, sexo masculino, 14 anos, sofreu trauma na coxa direita ao prender a perna em um motor. Após, houve aparecimento de edema no seu joelho, limitação articular e aumento de temperatura na região distal lateral do fêmur direito, com marcha claudicante, não conseguindo apoiar o membro inferior direito no chão. Limitação flexo-extensora.

RX: lesão de aspecto osteolítico em região metafisária de fêmur distal direito de difícil delimitação.

Acompanhamento: Paciente teve alta sem maiores problemas.

Anatomopatológico 1 (2011 - desta foi coletada o material analisado): Intenso processo inflamatório predominantemente por neutrófilos permeando fragmentos ósseos.

Nota: O presente material favorece a hipótese diagnóstica de osteomielite aguda.

Anatomopatológico 2: Biópsia em fêmur distal. Ausência de neoplasia. Processo inflamatório neutrofílico com focos de tecido de granulação e proliferação vascular.