Érica Sara Souza de Araújo

**Estabilidade do controle epigenético
em células humanas normais e
transformadas**

**São Paulo
2012**

Érica Sara Souza de Araújo

**Estabilidade do controle epigenético em
células humanas normais e
transformadas**

**Stability of epigenetic control in normal
and transformed human cells**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lygia da Veiga
Pereira Carramaschi

**São Paulo
2012**

Araújo, Érica Sara Souza de

Estabilidade do controle epigenético em células humanas normais e transformadas

81 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Inativação do cromossomo X 2. *Imprinting* genômico
3. Células humanas

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra.
Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedido à aluna Érica Sara Souza de Araújo (2008/07370-0).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Lygia, por permitir que eu fizesse parte de sua equipe e principalmente por me ajudar a permanecer nesta.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus companheiros de laboratório, atuais e antigos: Ana Cláudia, Ana Maria, André, Bruno, Cynthia, Fabiano, Fernanda, Fernando, Giovana, Gustavo, Joana, Juliana Plat, Karla, Lys, Maíra, Naja, Raquel, Simone e Thiago, pelo auxílio e momentos de descontração.

Aos professores do Instituto de Biociências e suas respectivas equipes: Dra. Angela Maria Vianna Morgante, Dra. Luciana Amaral Haddad, Dr. Luis Eduardo Soares Netto, Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno, Dra. Marie-Anne Van Sluys, Dra. Mariz Vainzof, Dra. Mayana Zatz e Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pelos reagentes e equipamentos.

Aos técnicos Fátima, Mara, Paulo e Márcio Yamamoto, pelo trabalho e apoio.

Ao Adriano Bonaldi, pelo experimento de MS-MLPA.

Às minhas amigas Ana, Joana, Rafaella e Raquel, que me deram muita força durante estes anos e espero que possam continuar a fazê-lo.

Ao meu querido Enéas, pelo amor, paciência e por ocupar todos os cargos vagos da minha vida.

Lista de figuras.....	I
Lista de tabelas.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
1 Introdução.....	1
1.1 Epigenética.....	1
1.1.1 Metilação do DNA.....	3
1.1.2 Modificações em histonas.....	6
1.2 Processos epigenéticos.....	9
1.2.1 Inativação do cromossomo X.....	9
1.2.2 <i>Imprinting</i> genômico.....	13
1.3 Modelos experimentais de controle epigenético.....	15
2 Objetivos.....	18
3 Materiais e métodos.....	19
3.1 Linhagens de células.....	19
3.1.1 Células normais.....	19
3.1.2 Células transformadas.....	19
3.2 Procedimentos gerais de cultivo celular.....	20
3.2.1 Descongelamento de células.....	20
3.2.2 Congelamento de células.....	20
3.2.3 Subcultivo de células.....	21
3.3 Tratamentos com modificadores de marcas epigenéticas.....	21
3.3.1 Ácido valproico.....	22

3.3.2 5-aza-2'-deoxicitidina.....	22
3.3.3 Tratamentos combinados.....	23
3.4 Análise da eficácia dos tratamentos.....	24
3.4.1 Análise da acetilação global da histona H4.....	24
3.4.2 Análise da metilação global do DNA.....	26
3.5 Extração dos ácidos nucleicos.....	27
3.6 Obtenção de cDNA.....	27
3.7 Seleção de polimorfismos e iniciadores.....	27
3.7.1 Genes ligados ao cromossomo X.....	27
3.7.2 Genes “imprintados”.....	28
3.8 Genotipagem do DNA genômico e verificação da expressão gênica.....	28
3.8.1 Amplificação por técnicas de PCR e RT-PCR.....	29
3.8.2 Sequenciamento direto.....	29
3.9 Análise da expressão gênica após os tratamentos.....	30
3.9.1 Verificação da qualidade dos cDNAs.....	30
3.9.2 Análise dos eletroferogramas.....	31
3.9.3 RT-PCR em tempo real.....	32
3.9.4 FISH de RNA.....	33
4. Resultados.....	35
4.1 Identificação de SNPs em regiões expressas de genes “imprintados”.....	35
4.2 Genotipagem dos genes “imprintados”.....	36
4.3 Tratamentos com VPA.....	42
4.4 Tratamentos com 5-aza-dC.....	44
4.5 Tratamentos combinados.....	46
4.6 Expressão gênica após os tratamentos.....	49

5. Discussão.....	54
5.1 O modelo GM135-Tel.....	54
5.2 Manutenção do controle epigenético em células normais, mas não em células transformadas, após perturbação de marcas epigenéticas.....	57
5.2.1 Exposição ao VPA não ocasionou reativação de alelos reprimidos.....	57
5.2.2 Exposição ao 5-aza-dC ocasionou reativação de alelos reprimidos em células transformadas.....	58
5.2.3 Tratamentos combinados de VPA e 5-aza-dC ocasionaram diferenças na acetilação da histona H4 e na expressão gênica.....	60
6 Conclusões.....	66
Resumo.....	68
Abstract.....	70
Referências bibliográficas.....	72
Anexo 1.....	81

Figura 1: Metilação do DNA.....	4
Figura 2: Análogos de citidina.....	6
Figura 3: Nucleossomo.....	7
Figura 4: Processo de inativação do cromossomo X em mamíferos eutérios...11	
Figura 5: Componentes de um agrupamento de genes “imprintados”.....14	
Figura 6: Análise do padrão de expressão a partir de eletroferogramas.....32	
Figura 7: Eletroferogramas dos genes “imprintados” na linhagem GM135-Tel.....38	
Figura 8: Análise da expressão dos genes <i>IGF2</i> e <i>H19</i> em fibroblastos por RT-PCR.....39	
Figura 9: Referências das sondas específicas para sítio de <i>HhaI</i> na região 11p15 utilizadas para MS-MLPA.....41	
Figura 10: Análise de metilação da região 11p15 por MS-MLPA.....41	
Figura 11: Acetilação da histona H4 basal e após exposição ao VPA nas células GM135-Tel.....42	
Figura 12: Níveis de acetilação da histona H4 basal e após exposição ao VPA.....43	
Figura 13: Análise da metilação global do DNA através de ensaio com enzimas de restrição nas linhagens HCT116, DKO e GM135-Tel.....45	
Figura 14: Quantificação da metilação global do DNA após exposição ao 5-aza-dC.....45	
Figura 15: Variações nos níveis de acetilação da histona H4 após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.....47	
Figura 16: Expressão relativa de <i>DNMT1</i> na linhagem HCT116.....48	

Figura 17: Expressão relativa de <i>DNMT1</i> na linhagem GM135-Tel.....	48
Figura 18: Eletroferogramas da expressão dos genes <i>PEG10</i> e <i>H19</i> nas células transformadas.....	51
Figura 19: Expressão relativa de <i>XIST</i>	53
Figura 20: FISH de RNA utilizando sonda contra <i>XIST</i>	53
Figura 21: Regulação da expressão dos genes “imprintados” <i>Igf2</i> e <i>H19</i> no modelo murino.....	56
Figura 22: Ações da drogas VPA e 5-aza-dC no controle epigenético.....	63

Tabela 1: Genes “imprintados” selecionados.....	36
Tabela 2: Genotipagem e padrão de expressão dos genes “imprintados” selecionados nas linhagens GM135-Tel e HCT116.....	37
Tabela 3: Expressão de genes ligados ao X e “imprintados” na linhagem GM135-Tel antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.....	49
Tabela 4: Expressão de genes “imprintados” na linhagem HCT116 antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.....	50
Tabela 5: Expressão de genes “imprintados” na linhagem DKO antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.....	50
Tabela 6: Dados da literatura sobre o controle epigenético nas situações experimentais de hipometilação do DNA e/ou hiperacetilação de histonas em diferentes modelos celulares.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenina

BSA – albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar

C – citosina

cm² – centímetros quadrados

CpG – citosina que precede uma guanina

CTCF – fator ligante ao domínio CCCTC

° C – graus Celsius

DNMT – DNA-metiltransferase

DMR – região diferencialmente metilada

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH – hibridação *in situ* com fluorescência

G – guanina

h – hora(s)

HAT – histona-acetiltransferase

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico

hTERT – subunidade catalítica da telomerase humana

HDAC – histona-desacetilase

ICX – inativação do cromossomo X

mA – miliampere(s)

min – minuto(s)

ml – mililitro(s)

mM – milimolar(es)

ncRNA – RNA não-codificante

ng – nanograma(s)

nM – nanomolar(es)

pb – par(es) de base(s)

PBS – solução tampão fosfato-salina

PCR – reação em cadeia de polimerase

PRC2 – complexo de proteínas Polycomb tipo 2

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

SNP – polimorfismo de uma única base

SSC – tampão salino citrato de sódio

T – timina

TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – tampão Tris-Borato-EDTA

TPM – transcritos por milhão

TSA – tricostatina

U – unidade

V – volt(s)

VPA – ácido valproico

Xi – cromossomo X inativo

5-aza-dC – 5-aza-2'-deoxicitidina

μM – micromolar(es)

1.1 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi cunhado por Conrad Waddington em 1942 referindo-se a todos os mecanismos necessários para o desdobramento do programa genético para o desenvolvimento (*apud* Holliday, 2006). Em 1958, Nanney estende este conceito para além da biologia do desenvolvimento: o fenótipo seria produto de dois sistemas, um genético e outro epigenético, sendo o último formado por outros constituintes que não os ácidos nucleicos (Nanney, 1958).

Desde então, o termo epigenética tem apresentado vários conceitos, e de uma maneira geral, todos se referem a fatores herdáveis que não afetam a sequência de nucleotídeos e resultam em regulação da expressão gênica. Uma interessante definição para o termo é dada por Bonasio e colaboradores: sinais moleculares, mantidos por eles próprios, que fornecem uma memória de estímulos anteriores sem mudar irreversivelmente a informação genética (Bonasio, Tu *et al.*, 2010).

De acordo com o conceito acima citado, elementos de diferentes naturezas podem constituir fatores epigenéticos, sendo definidos em dois tipos. O elemento *trans* é passado à geração seguinte através do citosol e capaz de se manter ativo por retroalimentação positiva, como alguns fatores de transcrição. O elemento *cis* é ligado fisicamente ao cromossomo e transmitido à geração seguinte através da segregação dos cromossomos durante a divisão celular. As marcas epigenéticas clássicas são: metilação do DNA, modificações

pós-traducionais em histonas, RNAs não-codificantes e posicionamento dos nucleossomos.

Em eucariotos, o material genético nuclear é compactado em uma estrutura formada por DNA e proteínas nomeada cromatina, a qual é composta por unidades repetitivas denominadas nucleossomos. Cada nucleossomo é constituído por um octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4 envolto por 146-pb de DNA (Arya, Maitra *et al.*, 2010). O posicionamento dos nucleossomos não se dá de forma aleatória: sua distribuição está relacionada diretamente com a acessibilidade da cromatina a elementos regulatórios da expressão gênica (Kiyama e Trifonov, 2002). Outras marcas epigenéticas, fatores remodeladores de cromatina e sequências específicas de DNA controlam este posicionamento (Segal e Widom, 2009).

No final da década de noventa (Fire, Xu *et al.*, 1998), foi descrito o papel de RNAs não-codificantes (ncRNA, do inglês *noncoding RNA*) na regulação da expressão gênica. Vários modos de ação são propostos para estes elementos, entre eles estão o recrutamento de marcas epigenéticas ligadas ao silenciamento transcricional, bloqueio da transcrição por impedimento da ligação de RNA polimerase II e diminuição da quantidade de RNA mensageiro (Morris, 2009; Fabian, Sundermeier *et al.*, 2010; Turner e Morris, 2010; Lochmatter e Mullis, 2011). Os ncRNAs atuam principalmente no silenciamento gênico, mas alguns estudos sugerem também sua ação na ativação de alguns genes (Turner e Morris, 2010).

As marcas epigenéticas melhor estudadas são a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais em histonas. Ambas agem em sinergismo com

as demais marcas e parecem constituir os passos finais no estabelecimento do controle epigenético.

1.1.1 METILAÇÃO DO DNA

Em 1975, Holliday propôs que a metilação em sequências específicas de DNA adjacentes a regiões gênicas controlaria a transcrição destes genes (Holliday e Pugh, 1975). Atualmente, acredita-se que esta marca atue no silenciamento gênico através do bloqueio direto ou indireto da ligação de fatores de transcrição (Klose e Bird, 2006).

A metilação ocorre em citosinas (C) em três diferentes sequências de nucleotídeos: CG, CHG e CHH (onde H= C, T ou A), sendo as duas últimas comuns em plantas, mas também encontradas em células-tronco de mamíferos (Feng, Jacobsen *et al.*, 2010). Em vertebrados, citosinas metiladas podem ser desaminadas naturalmente levando à substituição por uma timina, que pode ou não ser detectada pelos mecanismos de reparo. Desta maneira, a citosina metilada tende a mutar para timina ao longo do período evolutivo. As sequências CG restantes estão distribuídas desigualmente pelo genoma principalmente em regiões denominadas ilhas CpG (Alberts, Johnson *et al.*, 2004). Em humanos, entre 60 e 70% dos genes apresentam ilha CpG em suas regiões promotoras (Illingworth e Bird, 2009).

A adição de um grupo metil ($-CH_3$) no carbono-5 da citosina é uma modificação covalente que ocorre pela ação de DNA-metiltransferases (DNMTs). As DNMTs removem o grupo metil do doador SAM (S-adenosilmetionina) e o acrescentam à citosina (Fig. 1A) (Patra, Patra *et al.*, 2008). Em mamíferos, a metilação é introduzida em um novo sítio pelas

enzimas DNMT3A e DNMT3B (Fig. 1B), enquanto a DNMT1 apresenta afinidade por DNA hemi-metilado, sendo responsável pela manutenção da metilação do DNA (Fig. 1C) (Zhu, Geiman *et al.*, 2006).

Figura 1: Metilação do DNA. (A) O carbono-5 da citosina recebe um grupo metil pela ação de DNMTs na presença de SAM. (B) As enzimas DNMT3A e 3B são responsáveis pela metilação *de novo* no DNA. (C) A manutenção da metilação é garantida pela DNMT1, que atua em DNA hemi-metilado (adaptado de Turek-Plewa e Jagodzinski, 2005).

Durante o ciclo de vida dos mamíferos, ocorrem duas ondas de desmetilação seguidas de remetilação; a primeira delas durante a formação dos gametas, e a segunda, após a fertilização (Smallwood e Kelsey, 2011).

No modelo murino, as células germinativas primordiais sofrem desmetilação em 80 a 90% do genoma, garantindo que marcas epigenéticas adquiridas sejam eliminadas (Kota e Feil, 2010). Pouco se sabe sobre esta

onda de desmetilação, mas estudos sugerem que mecanismos de reparo do DNA possam estar envolvidos (Popp, Dean *et al.*, 2010). Em relação ao tempo de desenvolvimento, a remetilação inicia-se primeiro na linhagem germinativa masculina, antes do nascimento, e nas fêmeas, inicia-se após o nascimento (Smallwood e Kelsey, 2011).

No zigoto, logo após a fertilização, o genoma paterno sofre várias modificações na cromatina. Nesta fase, a desmetilação acontece antes da replicação do DNA, sugerindo um mecanismo ativo de desmetilação, possivelmente através da oxidação da metilcitosina (Iqbal, Jin *et al.*, 2011). Por outro lado, o genoma materno passa por desmetilação passiva, através da ausência de manutenção da metilação (Smallwood e Kelsey, 2011).

A metilação *de novo* que acontece por volta do período de implantação é mantida através das mitoses, constituindo uma marca epigenética estável associada ao silenciamento gênico (Delcuve, Rastegar *et al.*, 2009).

A metilação aberrante do DNA está associada a várias patologias, como doença autoimune e câncer. Há quase 50 anos, foram desenvolvidos análogos de citidina para combate de células de câncer (Sorm, Piskala *et al.*, 1964), mas apenas posteriormente descobriu-se que tais drogas causavam queda nos níveis de metilação do DNA (Jones e Taylor, 1980). Durante a replicação, os análogos de citidina são incorporados no DNA e ao serem reconhecidos como substrato pelas DNMTs ocorre uma ligação covalente irreversível entre a proteína e o material genético, sequestrando a enzima e impedindo sua ação, o que leva a uma queda dos níveis de metilação global do DNA (Stresemann e Lyko, 2008). Destacam-se dois análogos de citidina principais: 5-azacitidina e

5-aza-2'-deoxicitidina (Fig. 2), usados em estudos sobre o papel da metilação na expressão gênica e no tratamento clínico da síndrome mielodisplásica.

Figura 2: Análogos de citidina. A citidina é composta por uma citosina ligada a uma ribose, análogos de citidina possuem uma modificação no carbono-5 da citosina, o qual é substituído por nitrogênio (círculo cinza tracejado). O agente 5-azadeoxicitidina, diferentemente do 5-azacitidina, é ligado à desoxirribose.

1.1.2 MODIFICAÇÕES EM HISTONAS

A acetilação e a metilação de histonas foi descrita pela primeira vez por Allfrey, que sugeriu o papel destas na regulação da expressão gênica (Allfrey, Faulkner *et al.*, 1964). Desde então, outras modificações em histonas envolvidas no controle da expressão gênica foram descobertas, dando origem ao que ficou conhecido como o “código das histonas” (Strahl e Allis, 2000). Estas modificações pós-traducionais podem estar presentes ao longo de toda histona, sendo mais frequentes em sua porção N-terminal (Delcuve, Rastegar *et al.*, 2009), a qual é projetada para além do cerne do nucleossomo (Fig. 3). Os aminoácidos desta “cauda” são passíveis de modificações, como ubiquitinação, fosforilação, sumoilação, metilação e acetilação (Lee e Mahadevan, 2009).

Figura 3: Nucleossomo. O DNA eucarionte é organizado em uma estrutura denominada cromatina, formada por unidades repetitivas chamadas nucleossomo. Cada nucleossomo é constituído por um octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4, sendo dois exemplares de cada) envolto por DNA. As histonas projetam a porção N-terminal além do cerne do nucleossomo, e os aminoácidos desta região (diferentes letras da cauda, onde L=lisina e R=arginina, por exemplo) podem sofrer modificações epigenéticas (baseado em Shilatifard, 2006).

Acetilação e metilação são as modificações em histonas melhor estudadas. O papel da metilação em relação ao controle de transcrição gênica varia de acordo com o resíduo e a quantidade de grupos metil adicionados. A trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3), por exemplo, está associada à eucromatina, enquanto a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) é uma marca enriquecida em heterocromatina. Já a acetilação de histonas é associada à cromatina descondensada (Bartova, Krejci *et al.*, 2008).

Com a adição dessas marcas, as propriedades biofísicas do nucleossomo são alteradas através da neutralização ou adição de carga, acarretando no aumento em sua mobilidade, modulando o contato entre nucleossomos e permitindo a ação de proteínas remodeladoras da cromatina (Ruthenburg, Li *et al.*, 2007).

Várias proteínas modificadoras de histonas e “leitoras” do código de histonas já foram identificadas. As histona-metiltransferases e as histona-desmetilases são responsáveis pela adição e retirada, respectivamente, de grupos metil dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R). A leitura da metilação em histona é realizada por proteínas com domínios do tipo cromo, MBT (*Malignant Brain Tumor*), Tudor e PhD (*Plant Homeodomain*) (Kouzarides, 2007).

O complexo de proteínas Polycomb tem importante papel no silenciamento gênico e nos processos associados à metilação em histonas. Este complexo é classificado em dois grupos, denominados complexo Polycomb repressivo 1 (PRC1) e 2 (PRC2). PRC2 é capaz de metilar as lisinas 27 e 9 da histona H3, enquanto PRC1 reconhece a H3K27me3 e sinaliza para a inibição da transcrição. Além disso, as Polycomb estão envolvidas em outras vias epigenéticas, como ubiquitinação de histonas e recrutamento de DNMTs (Sparmann e Van Lohuizen, 2006).

Outro grupo de proteínas modificadoras de histonas são as histona-acetiltransferases (HAT) e histona-desacetilases (HDAC), responsáveis pelo equilíbrio entre acetilação e desacetilação de lisinas, respectivamente. Estas enzimas são menos específicas que as envolvidas na metilação e podem ter outros substratos além das histonas (Kouzarides, 2007).

Histonas recém sintetizadas recebem acetilação pela ação de uma HAT do tipo B (HAT B) no citoplasma como um sinal de proteína recém-sintetizada. A acetilação que ocorre no núcleo, associada à transcrição, é realizada pela HAT tipo A (HAT A) (Zhang, Williams *et al.*, 2002). Proteínas com domínio bromo reconhecem o grupo acetil nas histonas e agem no sentido de tornarem

a cromatina mais acessível a remodeladores e fatores de transcrição (Kouzarides, 2007).

As HDACs são divididas em quatro classes (I a IV) de acordo com sua homologia com leveduras. As classes I, II e IV são zinco-dependente, enquanto a classe III é NAD⁺-dependente. A HDAC I é nuclear e amplamente expressa, enquanto as classes II (que transita entre núcleo e citoplasma) e IV (nuclear) apresentam uma relação tecido-dependente (Minucci e Pelicci, 2006).

Várias moléculas de origem natural ou sintética têm sido relacionadas à inibição de HDACs, como o ácido hidroxâmico (SAHA) e a tricostatina (TSA), porém não são capazes de inibir todas as classes de HDACs (Xu, Parmigiani *et al.*, 2007). O ácido valproico (VPA, C₇H₁₅COOH), utilizado originalmente como anticonvulsivante e estabilizador de humor, foi descoberto como um potente inibidor de HDAC (Gottlicher, Minucci *et al.*, 2001), sendo capaz de inibir as classes I e IIa de HDACs (Xu, Parmigiani *et al.*, 2007). Devido ao uso clínico comum do VPA, sua farmacologia e efeitos colaterais são bem conhecidos, o que contribui para seu uso em patologias associadas a marcas epigenéticas aberrantes (Voso, Santini *et al.*, 2009).

1.2 PROCESSOS EPIGENÉTICOS

1.2.1 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Em organismos com determinação sexual cromossômica, há um desequilíbrio de produtos gênicos entre os sexos, o que constituiu uma pressão seletiva para um mecanismo de compensação de dosagem (Payer e Lee, 2008). Em mamíferos, a inativação do cromossomo X (ICX), teorizada por Mary Lyon em 1961, garante o equilíbrio entre machos (XY) e fêmeas (XX) através

do silenciamento transcricional de um dos cromossomos X presentes em cada uma das células somáticas das fêmeas (Lyon, 1961).

São descritas duas formas de ICX: “imprintada” (do inglês *imprinted*) e aleatória. Na forma “imprintada”, o cromossomo X inativo (Xi) tem sempre a mesma origem parental. Esta pode ser observada em todos os tecidos de marsupiais (Sharman, 1971) e nos tecidos extraembrionários de camundongos (Takagi e Sasaki, 1975) e bovinos (Xue, Tian *et al.*, 2002), nos quais o cromossomo X paterno é preferencialmente inativado. Já a inativação aleatória ocorre nos tecidos embrionários dos mamíferos eutérios (Erwin e Lee, 2008) e também nos tecidos extraembrionários em humanos (Moreira De Mello, De Araujo *et al.*, 2010), onde qualquer um dos cromossomos X pode ser inativado.

Embora a maioria dos genes presentes no cromossomo Xi esteja transcionalmente silenciada, a ICX é heterogênea, não se estendendo por todo o cromossomo (Carrel e Willard, 2005). Estudos em células híbridas humano-camundongo mostram que cerca de 15% dos genes presentes no Xi escapam da ICX, e pelo menos 10% exibem inativação variável, sendo expressos em alguns mas não em todos os Xi (Carrel e Willard, 2005).

O processo de ICX historicamente é dividido em etapas que caracterizam as fases de iniciação da inativação (incluindo o pareamento, contagem e escolha do cromossomo X a ser inativado), propagação do sinal de inativação, e manutenção do silenciamento nas células descendentes (Fig. 4) (Heard e Distèche, 2006). Um *locus* crucial para o início da ICX é o centro de inativação do cromossomo X (Xic, do inglês *X inactivation center*), que apresenta vários elementos regulatórios (Rastan e Cattanach, 1983; Brown, Lafreniere *et al.*, 1991).

Figura 4: Processo de inativação do cromossomo X em mamíferos eutérios. Passos fundamentais da ICX no modelo murino (adaptado de Avner e Heard, 2001).

No início do processo, o número relativo de cromossomos X por autossomos é contado em cada célula, de forma que apenas um X permanece ativo por genoma diploide. Essas etapas de contagem e escolha envolvem elementos do *Xic* e parecem ocorrer simultaneamente (Morey e Avner, 2011). Concomitante com a diminuição dos níveis de fatores de transcrição relacionados à pluripotência e a diferenciação celular (Donohoe, Silva *et al.*, 2009), o cromossomo X que será inativado passa a supertranscrever *XIST/Xist* (*X-inactive-specific transcript*), um longo ncRNA (Brown, Ballabio *et al.*, 1991;

Brockdorff, Ashworth *et al.*, 1992; Brown, Hendrich *et al.*, 1992). O RNA *Xist* passa a cobrir todo o futuro Xi (Clemson, Mcneil *et al.*, 1996) e liga-se a PRC2, que por sua vez estabelece a marca H3K27me3 em todo o cromossomo (Zhao, Sun *et al.*, 2008).

Uma vez estabelecida, a inativação é mantida ao longo das sucessivas divisões celulares de maneira clonal. Estudos sugerem que vários modificadores de cromatina atuem em conjunto para manter a repressão no Xi (Wutz e Gribnau, 2007). Recentemente foram identificadas 32 proteínas diferentes que atuam na manutenção da ICX em camundongos (Chan, Zhang *et al.*, 2011).

Csankovszki e colaboradores propuseram um sinergismo entre o RNA *Xist*, metilação do DNA e hipoacetilação em histonas na manutenção da ICX (Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001). Os autores demonstraram que a perda do RNA *Xist* desestabiliza o estado inativo nas células somáticas de camundongos, e a inibição de metilação no DNA e de hipoacetilação em histonas aumentou a reativação no Xi.

O Xi é rico em modificações em histonas características de regiões transcricionalmente reprimidas, como hipoacetilação nas histonas H3 e H4, di-metilação da H3 na lisina 9 (H3K9me2), H3K27me3, e perda da di- e tri-metilação da H3 na lisina 4 (H3K4me2 e H3K4me3), muitas das quais aparecem depois do acúmulo em *cis* do RNA *Xist* ao longo desse cromossomo (Heard, 2004; Brinkman, Roelofsen *et al.*, 2006). A associação da variante de histona macroH2A e a metilação em ilhas CpG associadas à região 5' de genes são eventos mais tardios que também caracterizam o Xi (Heard, 2005).

1.2.2 IMPRINTING GENÔMICO

Estudos realizados por volta de 1980 testaram a equivalência dos genomas materno e paterno no desenvolvimento embrionário de mamíferos. A falta de sucesso em obter embriões a partir de uma única origem parental sugeriu a existência de *imprinting* genômico. Este fenômeno, que pode ser definido como expressão monoalélica dependente da origem parental, foi visto pela primeira vez na mosca sciara (Crouse, 1960) e posteriormente em plantas (Kermicle, 1970). Em 1984, dois trabalhos comprovaram a existência do fenômeno também em mamíferos (Mcgrath e Solter, 1984; Surani, Barton *et al.*, 1984).

Em camundongos, já foram descritos 144 genes “imprintados” (<http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting>), muitos também “imprintados” em humanos. Erros de *imprinting* acarretam diferentes doenças, como as síndromes de Angelman e Prader-Willi, relacionadas a crescimento fetal aberrante, e de Silver-Russel e Beckwith-Wiedemann, associadas à desordem no desenvolvimento do sistema nervoso (Hirasawa e Feil, 2010).

Em placentários, acredita-se que o fenômeno do *imprinting* tenha sido evolutivamente selecionado como uma resposta à competição entre os sexos, onde o genoma paterno favorece o crescimento embrionário mesmo em detrimento à saúde da mãe, e o genoma materno limita este crescimento (Biliya e Bulla, 2010). Mas são diversas as funções dos genes “imprintados”, desde crescimento e desenvolvimento placentário e embrionário até comportamento pós-natal (Bartolomei, 2009).

A maioria destes genes ocorre em grupos ao longo do genoma, sob controle de um elemento de ação em *cis* denominado ICR (do inglês *imprinting*

control region) (Fig. 5) (Edwards e Ferguson-Smith, 2007). A metilação na ICR, que ocorre por ação da enzima DNMT3A estimulada pela DNMT3L, marca o estabelecimento do *imprinting*. Esta marca é protegida da onda de desmetilação global pela qual passa o zigoto após a fertilização por fatores maternos, como PGC7/Stella (Nakamura, Arai *et al.*, 2007), DNMT1 (Hirasawa, Chiba *et al.*, 2008) e Zfp57 (Li, Ito *et al.*, 2008).

Além da ICR, pode haver outras regiões diferencialmente metiladas (DMR) (Fig. 5), que não estão presentes em células germinativas e não sobrevivem à reprogramação pós-fertilização das marcas de metilação (Bartolomei, 2009). Vale destacar que vários autores não fazem esta distinção nominal entre ICR e DMR, denominando todas de DMR, como faremos adiante.

Figura 5: Componentes de um agrupamento de genes "imprintados". Os cromossomos materno (acima) e paterno (abaixo) são mostrados. Os agrupamentos contêm genes de expressão materna ou paterna, além de genes não "imprintados". A região de controle de *imprinting* (ICR) apresenta papel fundamental na expressão destes genes, e muitos agrupamentos apresentam outras regiões diferencialmente metiladas (DMR) (adaptado de Bartolomei, 2009).

A metilação do DNA presente nas DMRs pode recrutar diferentes elementos regulatórios, como proteínas com domínios ligantes à metil-CpG, e também podem abrigar elementos isoladores, como sítios de ligação para CTCF (Sha, 2008). Além disso, modificações em histonas e variantes de histonas podem estar presentes nas DMRs ou fora delas, e parecem acompanhar o padrão de metilação do DNA: marcas de histonas associadas à ativação gênica, por exemplo, são encontradas em DMRs pouco metiladas (Sha, 2008).

Os ncRNAs desempenham papel no controle de muitos agrupamentos de genes “imprintados”. A maneira pela qual ocorre este controle não é conhecida, e como este mecanismo atua tanto em genes complementares ou não ao ncRNA, a hipótese de ação através de interferência por RNA (RNAi) é descartada (Bartolomei, 2009).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CONTROLE EPIGENÉTICO

Com intuito de obter um modelo para o estudo do papel da metilação no controle da expressão gênica em mamíferos, Jaenisch e seu grupo desenvolveram mutações no gene *Dnmt1* em células-tronco embrionárias murinas, que posteriormente foram utilizadas para a geração de camundongos nocaute para *Dnmt1* (Li, Bestor *et al.*, 1992; Li, Beard *et al.*, 1993). As mutações em homozigose ocasionaram redução de mais de 70% de citosinas metiladas, morte embrionária em estágios iniciais do desenvolvimento e perda da expressão diferencial dos alelos materno e paterno dos genes “imprintados” *Igf2*, *Igf2r* e *H19*. Em 1995, este mesmo grupo mostrou que embriões

masculinos mutantes para *Dnmt1* apresentaram expressão de *Xist* (Beard, Li *et al.*, 1995).

Em 2000, Rhee e colaboradores avaliaram o papel da DNMT1 humana na manutenção da metilação genômica introduzindo por recombinação homóloga uma mutação em homozigose neste gene na linhagem de células de carcinoma humano HCT116 (Rhee, Jair *et al.*, 2000). Embora tenha sido observada uma redução significativa da atividade de metiltransferase *in vitro*, houve queda em apenas 20% de citosinas metiladas. Posteriormente, o grupo desenvolveu na mesma linhagem celular um duplo nocaute dos genes *DNMT1* e *DNMT3B* (células DKO), quando então foi vista redução de 95% da metilação global e expressão bialélica do gene “imprintado” *IGF2* (Rhee, Bachman *et al.*, 2002).

Dado que em células murinas deficiência de *Dnmt1* leva à expressão do gene *Xist* a partir do X ativo (Beard, Li *et al.*, 1995), nosso grupo questionou como estaria o controle de *XIST* nas linhagens humanas nocaute para as diferentes DNMTs. Neste estudo, foi demonstrado que as células DKO mantinham a repressão de *XIST* no X ativo mesmo em condição de desmetilação global do genoma (Vasques, Stabellini *et al.*, 2005), situação oposta ao observado em camundongos.

Em conjunto, estes trabalhos sugerem diferenças no papel da *Dnmt1*/DNMT1 entre camundongos e humanos, já que no primeiro a ausência de atividade de *Dnmt1* é suficiente para causar a desmetilação global do genoma, enquanto que em humanos, o controle da metilação global depende da ação conjunta de DNMT1 e DNMT3B. Além disso, os dados sugerem que em humanos o controle epigenético envolvido na ICX é mais rigoroso do que

aquele envolvido no *imprinting*, uma vez que as células DKO perderam controle do *imprinting* mas não da repressão do gene *XIST*. Porém, é importante notar que os estudos em humanos foram realizados em células transformadas, que apresentam aberrações genéticas e epigenéticas, e assim podem não refletir o comportamento de células normais.

Neste estudo, propomos comparar a estabilidade do controle epigenético entre células humanas normais e transformadas submetidas a agentes perturbadores das marcas de metilação do DNA e acetilação em histonas, através do monitoramento da expressão alelo-específica de genes “imprintados” e genes ligados ao cromossomo X pelo uso de polimorfismos de base única (SNPs) presentes em regiões expressas.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a estabilidade do controle epigenético dos genes submetidos à ICX e de genes “imprintados”, em células humanas normais e transformadas.

Para isso, utilizamos a linhagem de células normais GM135-Tel e a linhagem transformada HCT116, submetendo ambas a tratamentos com agentes desestabilizadores de marcas epigenéticas, e verificando o efeito dos mesmos na expressão de genes “imprintados” e de genes ligados ao X.

Especificamente, foram:

- Tratadas as duas linhagens com o agente causador de desmetilação 5-aza-dC, e com o inibidor de histona-desacetilase VPA.
- Analisados os padrões de metilação global de DNA e de acetilação da histona H4 em células tratadas e não-tratadas;
- Verificada a expressão de genes ligados ao X e de genes “imprintados” de autossomos, através do monitoramento da expressão alelo-específica pelo uso de polimorfismos de base única (SNPs) presentes em regiões codificadoras.

3.1 LINHAGENS DE CÉLULAS

3.1.1 CÉLULAS NORMAIS

Como linhagem de células humanas normais foi utilizada GM135-Tel. Esta é derivada da linhagem GM135 (Coriell Institute), proveniente de fibroblastos de uma mulher portadora da Síndrome de Lesch-Nyhan, portanto, heterozigota para uma mutação no gene *HPRT* no cromossomo X, que codifica a enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (Nyhan, 2005). Através de seleção em meio contendo suplemento HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina), pode-se obter uma subpopulação de células com desvio total de ICX, onde todas apresentam o alelo normal do gene *HPRT* no X ativo (Migeon e Childs, 1970). Em nosso laboratório, uma subpopulação deste tipo foi imortalizada através da restituição da atividade da telomerase, o que possibilita estender o tempo de cultura sem gerar características de linhagem transformada, sendo então denominada GM135-Tel (Vasques, 2003).

A linhagem GM135-Tel foi cultivada a 37 °C e 5% CO₂, em meio DMEM (Invitrogen) com alta concentração de glicose, acrescido de 15% de soro fetal bovino (Cultilab), 2 mM L-Glutamina (Sigma), 1% aminoácidos não-essenciais (Sigma), 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (Invitrogen).

3.1.2 CÉLULAS TRANSFORMADAS

A linhagem HCT116 é uma linhagem de células humanas masculinas provenientes de carcinoma colo-retal, portanto transformada. Esta linhagem já foi utilizada por nosso e outros grupos em estudos envolvendo o papel da

metilação no controle de expressão gênica (Rhee, Bachman *et al.*, 2002; Vasques, Stabellini *et al.*, 2005; Mossman, Kim *et al.*, 2010). Utilizou-se também a sublinhagem da HCT116 denominada DKO (Rhee, Bachman *et al.*, 2002), obtida a partir do nocaute das enzimas DNMT1 e DNMT3B, cedida pelo Dr. B. Vogelstein.

As linhagens HCT116 e DKO foram cultivadas a 37 °C e 5% CO₂, em meio McCoy (Invitrogen) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 2 mM L-Glutamina (Sigma), 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (Invitrogen).

3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE CULTIVO CELULAR

3.2.1 DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS

Os criotubos contendo células mantidas em nitrogênio líquido foram rapidamente transferidos para o banho a 37 °C por 1 minuto. O conteúdo do criotubo foi vagarosamente misturado a 3 ml do meio de cultura e centrifugado em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado com meio de cultura e plaqueado em área mais adequada ao número de células ou à finalidade de seu uso.

3.2.2 CONGELAMENTO DE CÉLULAS

As células foram lavadas com 1X PBS (Invitrogen) e desagregadas da placa de cultivo pela ação de 0,25% Tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37 °C por 3 minutos. Para inibir a ação da enzima, foi acrescido na placa 3 a 5 ml de meio com soro fetal bovino ($\geq 10\%$), e a camada de células foi desagregada por

pipetagem. As células foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm, o precipitado foi ressuspensionado em meio de cultura acrescido de 10% DMSO (Sigma) e 20% de soro fetal bovino. Os criotubos foram mantidos a -70 °C pelo período mínimo de 24 horas e transferidos para um estoque no nitrogênio líquido por tempo indefinido.

3.2.3 SUBCULTIVO DE CÉLULAS

As células foram lavadas com 1X PBS (Invitrogen) e desagregadas da placa de cultivo pela ação de 0,25% Tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37 °C por 3 minutos. Para inibir a ação da enzima, foi acrescido na placa 3 a 5 ml de meio com soro fetal bovino ($\geq 10\%$), e a camada de células foi desagregada por pipetagem. As células foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm, o precipitado foi ressuspensionado no meio apropriado e dividido em duas ou mais áreas de cultura, conforme a necessidade.

3.3 TRATAMENTO COM MODIFICADORES DE MARCAS EPIGENÉTICAS

Inicialmente, foi realizado um experimento piloto no qual as células foram tratadas com diferentes concentrações e períodos de exposição às drogas com intuito de escolher as condições para cada tratamento, utilizando-se como base dados da literatura (O'Neill, Keohane *et al.*, 1999; Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001; Kishikawa, Ugai *et al.*, 2002; Yang, Hoshino *et al.*, 2005; Mcgarvey, Fahrner *et al.*, 2006; Egger, Aparicio *et al.*, 2007; Huangfu, Maehr *et al.*, 2008; Mikkelsen, Hanna *et al.*, 2008). As condições experimentais deveriam causar modificações nas marcas epigenéticas analisadas sem ocasionar

mudanças morfológicas ou morte celular, características monitoradas visualmente em comparação a cultura celular sem adição de drogas.

É importante destacar que, a cada experimento, todas as linhagens foram tratadas em paralelo nas diferentes condições, utilizando-se a mesma preparação de VPA e 5-aza-dC.

3.3.1 ÁCIDO VALPROICO

O inibidor de histona desacetilase VPA (Calbiochem) foi inicialmente diluído em água bidestilada autoclavada à concentração estoque de 500 mM e armazenado em -20 °C por até 3 meses.

As células foram plaqueadas em área de 10 cm² com cerca de 80% de confluência. Vinte e quatro horas depois, foram adicionados meio de cultivo fresco e VPA nas diferentes concentrações.

A linhagem GM135-Tel foi tratada com 5 mM de VPA por 6 horas, enquanto HCT116 e DKO foram tratadas com 1mM de VPA por 6 horas. Após término do tratamento, as células foram desagregadas da placa (0.25% Trypsin-EDTA, Invitrogen), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com 1X PBS (Invitrogen), centrifugadas novamente nas mesmas condições, e armazenadas em -70 °C para posterior extração de proteínas, DNA e RNA. A verificação da eficácia do tratamento foi realizada como especificado no item 3.4.1.

3.3.2 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA

O agente causador de desmetilação 5-aza-dC (Sigma) foi diluído em água bidestilada autoclavada na concentração de 10 mM no momento do uso.

As células foram plaqueadas em uma área de 10 cm² com cerca de 60% de confluência 24 horas antes do início do tratamento.

A linhagem GM135-Tel foi tratada por 96 horas com 20 µM de 5-aza-dC, HCT116 e DKO foram tratadas com 10 µM de 5-aza-dC por 96 horas. A cada 24 horas o meio foi substituído e adicionado 5-aza-dC na concentração adequada. Após término do tratamento, as células foram desagregadas da placa (0.25% Trypsin-EDTA, Invitrogen), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com 1X PBS (Invitrogen), centrifugadas novamente nas mesmas condições, e armazenadas em -70 °C para posterior extração de DNA, proteína e RNA. A verificação da eficácia do tratamento foi realizada como especificado no item 3.4.2.

3.3.3 TRATAMENTOS COMBINADOS

As células foram plaqueadas em uma área de 10 cm² com cerca de 60% de confluência 24 horas antes do início do tratamento. Parte daquelas recebeu meio fresco acrescido de VPA, cuja concentração dependeu da linhagem (ver item 3.3.1), e após 6 horas seguiu-se tratamento com 5-aza-dC (VPA+5-aza-dC) na concentração desejada (ver item 3.3.2) por 96 horas, sendo o meio substituído a cada 24 horas. Outra parte das células recebeu os tratamentos com ordem inversa, primeiramente foi tratada com 5-aza-dC e depois com VPA (5-aza-dC+VPA).

Após o término dos tratamentos, as células foram desagregadas da placa (0.25% Trypsin-EDTA, Invitrogen), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com 1X PBS (Invitrogen), centrifugadas novamente nas

mesmas condições, e armazenadas em -70 °C para posterior extração de DNA, RNA e proteína.

3.4 ANÁLISE DA EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS

3.4.1 ANÁLISE DA ACETILAÇÃO GLOBAL DA HISTONA H4

Após o tratamento com VPA, os níveis de acetilação global foram verificados através da técnica de *western blot* (Lynch, Tycko *et al.*, 2002), utilizando-se anticorpo anti-histona H4 acetilada (Upstate, cat #08-688). Para controle endógeno, foi utilizado anticorpo contra beta-actina conjugado com HRP (*Horseradish peroxidase*) (Abcam, ab49900-100).

Para a extração proteica, as células foram lavadas com 1X PBS (Invitrogen), desagregadas da placa (0.25% Trypsin-EDTA, Invitrogen) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 ml de 1X PBS (Invitrogen), seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriores; o sobrenadante foi descartado e as células foram mantidas em -70 °C para posterior extração de proteínas. Esta última foi realizada adicionando-se 150 a 200 µl de tampão de lise (50 mM de HEPES pH 7,5, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl e 0,5% Nonidet P40) e 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), a amostra foi então vigorosamente agitada e mantida em gelo por 5 minutos. Para auxiliar a lise celular, as amostras foram passadas por uma seringa com agulha de 0,3 mlímetros de diâmetro, em 10 movimentos do êmbolo. Seguiu-se repouso em gelo por 20 minutos e centrifugação em velocidade máxima por 30 minutos, o sobrenadante foi mantido em -70 °C.

Os extratos proteicos foram quantificados no Qubit (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Um total de 25 ng de proteína foi desnaturada a 95 °C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida 15% (SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-acrylamide gel electrophoresis*), a 120 V por cerca de 3 horas. As amostras foram, então, transferidas para membrana de nitrocelulose nas seguintes condições: 150 mA por 1 hora, em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 30 mM, pH 9,4 e metanol 20%. A transferência das proteínas para a membrana foi confirmada com o corante Ponceau Red. A membrana foi então incubada por uma hora em tampão de bloqueio (1X TBS, 0.1% Tween-20 com 5% de leite em pó desnatado), e após três lavagens de 15 minutos com 1X TBS, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-histona H4 acetilada, em diluição 1:2000, por período de 16 horas a 4 °C. No dia seguinte, após três lavagens de 15 minutos com 1X TBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anticoelho por 1 hora. Para controle endógeno, a membrana foi incubada com anticorpo contra beta-actina por 1 hora. A membrana foi então exposta ao ECL™ Western Blotting System (Ge Healthcare) ou Novex (Invitrogen), e a luminescência foi detectada através do STORM (Ge Healthcare) ou exposição ao filme autoradiográfico (Kodak BioMax, Sigma), respectivamente, de acordo com as especificações dos fabricantes.

O tratamento foi considerado efetivo quando houve aumento nos níveis de acetilação global comparado ao seu respectivo controle (células mantidas sem adição de agente pelo período correspondente de tratamento). A estimativa dos níveis de acetilação foi feita por densitometria com auxílio do *software* Image J, utilizando as bandas da beta-actina para normalização.

3.4.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO GLOBAL DO DNA

Após o tratamento com 5-aza-dC, a análise global da metilação foi avaliada através de digestão com enzima de restrição sensível à metilação (Rhee, Jair *et al.*, 2000; Rhee, Bachman *et al.*, 2002). Este ensaio baseia-se nas características de duas enzimas: *HpaII* é sensível à metilação, portanto não cliva sítios metilados, enquanto seu isoesquisômero, a enzima *MspI*, é insensível à metilação, apresentando, desta maneira, o padrão esperado para digestão total. Quanto menor o nível de metilação global mais semelhante serão os resultados dos ensaios com *MspI* e *HpaII*, assim como quanto maior o nível de metilação mais similares serão os resultados da digestão com *HpaII* e de DNA não-digerido.

Para a digestão, foi utilizado 1 µg de DNA e 1 U da enzima *HpaII* (FastDigest-Fermentas), ou de seu isoesquisômero *MspI* (FastDigest-Fermentas), em um volume final de 20 µl, com incubação a 37 °C por 16 horas. Toda a reação foi submetida à eletroforese a 50 V por cerca de 40 minutos em gel de agarose 1% 1X TAE, em solução 1X TAE, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen).

A análise de metilação global foi realizada por densitometria com auxílio do *software* Image J, comparando-se a intensidade das bandas provenientes de digestão total com as daquelas originárias de digestão sensível à metilação:

$$\% \text{ de metilação} = \frac{(H-M).100}{G}$$

Onde: H- intensidade da banda correspondente ao DNA digerido com *HpaII*, M- intensidade da banda correspondente ao DNA digerido com *MspI*, e G- intensidade da banda correspondente ao DNA genômico não-digerido.

O tratamento com agente causador de desmetilação foi considerado efetivo quando foi possível observar diminuição dos níveis de metilação quando comparado ao seu respectivo controle (células mantidas sem adição do agente pelo tempo correspondente de tratamento).

3.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Após cada tratamento, o DNA das células foi extraído utilizando-se FlexiGene (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. O RNA total foi isolado das células utilizando-se RNeasy (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

3.6 OBTENÇÃO DE cDNA

O RNA total das amostras foi tratado com DNase Turbo DNA Free, de acordo com as instruções do fabricante (Ambion), para evitar contaminação com DNA genômico. A partir desse RNA tratado foi obtido cDNA (DNA complementar) utilizando-se a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e 100 ng de random primer (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.7 SELEÇÃO DE POLIMORFISMOS E INICIADORES

3.7.1 GENES LIGADOS AO CROMOSSOMO X

Estudos prévios realizados em nosso laboratório (Stabellini, 2008; Moreira De Mello, De Araujo *et al.*, 2010) nos forneceram uma importante ferramenta para análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X através de polimorfismos de base única (SNP). Os genes e iniciadores selecionados (anexo 1) tiveram como base o trabalho de Carrel e

Willard (2005), sendo que para alguns genes nossa equipe modificou ou desenhou novos iniciadores.

3.7.2 GENES “IMPRINTADOS”

Com o objetivo de criar uma ferramenta semelhante à descrita no item anterior, nossa equipe buscou analisar genes já descritos como “imprintados” em fibroblastos humanos e com ao menos um SNP apresentando índice de heterozigose maior que 0,3.

Esta seleção foi realizada com base nos bancos de dados VEGA (http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Info/Index), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) e Geneimprint (<http://www.geneimprint.com/>). A confecção dos iniciadores foi realizada com auxílio da ferramenta Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); exceto para o gene *PEG10*, cujo par de iniciadores foi obtido no trabalho de Kim e colaboradores (Kim, Thurston *et al.*, 2007). Foram selecionados 8 genes “imprintados”, localizados em 4 diferentes cromossomos.

3.8 GENOTIPAGEM DO DNA GENÔMICO E VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A região do DNA genômico compreendendo cada polimorfismo foi amplificada por PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) e posteriormente sequenciada. A verificação da expressão gênica foi realizada através de RT-PCR (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*). Para a linhagem GM135-Tel os dados de genotipagem e expressão para genes ligados ao cromossomo X haviam sido obtidos anteriormente (Stabellini, 2008).

As condições de amplificação e sequenciamento dos genes “imprintados” foram padronizadas e verificou-se o padrão de expressão (“imprintado” ou não).

3.8.1 AMPLIFICAÇÃO POR TÉCNICAS DE PCR E RT-PCR

De 50 a 100 ng de DNA ou cDNA foram amplificados usando 1 U de Taq DNA Polimerase (Amersham), 1X de tampão (Amersham), 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 150 nM de cada iniciador, em volume final de 15 µL. Para alguns pares de iniciadores, a reação foi realizada na presença de 1 M betaína ou 10% DMSO. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese a 100 V por cerca de 20 minutos em gel de agarose 1% 1X TAE, em solução 1X TAE, corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e observados sob luz ultravioleta.

3.8.2 SEQUENCIAMENTO DIRETO

Os produtos de PCR foram diluídos em água bidestilada em proporção de 1:4 a 1:6, e dessa diluição foi usado 1 µl em uma reação com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 1X tampão, 150 nM de iniciador, em um volume final de 15 µl. Foi utilizado um programa de 40 ciclos (96 °C/10 segundos; 52 °C/20 segundos; 60 °C/4 minutos). No caso de amostras provenientes das linhagens HCT116 e DKO, os produtos de PCR foram purificados, e não diluídos, antes da reação de sequenciamento com 1X solução PEG (4,92 g acetato de sódio; 0,12 g MgCl₂.6H₂O; 26,2 g PEG800), seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugação por 10 minutos em 14000 rpm, remoção do sobrenadante, acréscimo de 100 µl

etanol 96%, centrifugação por 10 minutos em 14000 rpm, remoção do sobrenadante, secagem em temperatura ambiente e eluição em 5 µl de água bidestilada autoclavada.

O produto da reação para o sequenciamento foi precipitado acrescentando-se 2 µl de EDTA 125 mM pH 8,0, 2µl de acetato de sódio 3 M e 55 µl de etanol 100%, submetido à agitação intensa por 10 segundos para homogeneização, e em seguida deixado no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi então centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado ao precipitado 70 µl de etanol 70%. O tubo foi invertido algumas vezes para homogeneização e submetido a uma nova centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo deixado aberto no escuro para evaporação total do etanol por 2 a 24 horas.

A eletroforese capilar das amostras foi realizada em sequenciador ABI3100 Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems), do Departamento de Parasitologia (ICB-USP), de acordo com as configurações do fabricante.

3.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS OS TRATAMENTOS

3.9.1 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS cDNAs

Para cada amostra, foi realizado controle negativo da síntese de cDNA, que consiste em uma reação na qual não foi adicionada transcriptase reversa (RT-). Para atestar a qualidade, o cDNA e seu controle RT- foram amplificados como descrito anteriormente utilizando-se iniciador para o gene de controle endógeno *TOP1* (F: 5'-TCCTTTGCTTGCATCCCA-3', R: 5'AAGGCAGACAATGACAGACCA-3', descrito em Zhao, Yasui *et al.*, 2003),

nas seguintes condições de ciclagem: 94 °C/3 min; 34 ciclos de 94 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/ 1min; e 72 °C/5 min.

O material amplificado foi submetido à eletroforese a 100 V por 1 hora em gel de poliacrilamida 10 % 1X TBE, em solução 1X TBE. Após a eletroforese, procedeu-se a coloração por impregnação por nitrato de prata (Santos, Pena *et al.*, 1993): o gel foi mergulhado em solução fixadora (10% de etanol; 0,5% de ácido acético) por 10 min, seguindo-se imersão em solução corante (nitrato de prata 2 g/L) por 10 min, breve enxágue com água destilada e imersão em solução reveladora (hidróxido de sódio 30 g/L e 0,002% de formaldeído 37%) até a visualização das bandas. Por fim, o gel foi mergulhado novamente em solução fixadora por 10 min.

3.9.2 ANÁLISE DOS ELETROFEROGRAMAS

A análise de SNPs em regiões expressas dos genes possibilita monitorar a expressão alelo-específica desses, permitindo detectar eventuais alterações após os tratamentos com os agentes modificadores de marcas epigenéticas.

Nos eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do cDNA das células não-tratadas devemos visualizar apenas um pico na posição correspondente ao SNP, dado o padrão de expressão esperado de genes submetidos à ICX na linhagem GM135-Tel (ver item 3.1.1) e dos genes “imprintados”. No cDNA de células tratadas, poderia ser visualizado um pico, o que significaria manutenção da expressão, ou dois picos, que seria interpretado como ativação do alelo anteriormente reprimido (Fig. 6).

Figura 6: Análise do padrão de expressão a partir de eletroferogramas. Em células não-tratadas é esperado no sequenciamento de cDNA apenas um pico na posição do SNP (retângulo vermelho). Após tratamentos com agentes perturbadores de marcas epigenéticas, dois cenários são possíveis: um ou dois picos, que indicam manutenção da expressão monoalélica e ativação do alelo reprimido (com expressão bialélica), respectivamente.

3.9.3 RT-PCR EM TEMPO REAL

Um total de 50 ng de cDNA foram amplificados com 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1X Ensaio para *XIST*, em um volume final de 10 µl. Os genes de controle endógeno e *DNMT1* foram amplificados usando 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 50 nM de cada iniciador, em um volume final de 10 µl. Em todas as amplificações foram utilizados os parâmetros universais de ciclagem (50 °C/2 min; 95 °C/10 min; 40 ciclos (95 °C/15 s; 60 °C/1 min). Utilizou-se a plataforma ABIPRISM 7500FAST Sequence Detection System do Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-USP). Todas as amplificações foram feitas em triplicatas.

Os códigos para identificação dos ensaios prontos obtidos da Applied Biosystems, assim como os fluoróforos acoplados nas sondas foram: *XIST* - ID

Hs01079824_m1, sonda FAM/MGB. Para *DNMT1*, foi utilizado o seguinte par de iniciadores: F: 5'-TGAAGGTGGTGTTAATGGCAAA-3' e R: 5'-CGGCAAATGAGGTGCTGAA-3'.

Os genes utilizados como controle endógeno, e seus iniciadores, foram os seguintes:

HMBS F: 5'-CTGGAAGGAGGCTGCAGTGT-3'

HMBS R: 5'-TACAGTTGCCCATCCTTCATAGC-3'

*YWAHZ** F: 5'-TCCTTTGCTTGCATCCCA-3'

*YWAHZ** R: 5'-AAGCGAGACAATGACAGACCA-3'

*TOP1*** F: 5'-TCCGGAACCAGTATCGAGAAGA-3'

*TOP1*** R: 5'-CCTCCTTTTCATTGCCTGCTC-3'

* descrito em Wikman, kettunen *et al.*, 2002 ** descrito em Zhao, Yasui *et al.*, 2003

As condições destes ensaios foram padronizadas previamente por nossa equipe.

3.9.4 FISH DE RNA

As células foram plaqueadas sobre lâminas Lab-Tek (Nunc) e mantidas por 96 horas sob tratamento com 5-aza-dC, simples ou combinado com VPA, como especificado nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Então foram lavadas com 1X PBS, incubadas em gelo por 4 minutos com CSK (100 mM NaCl, 300 mM sacarose, 10 mM PIPES, 3 mM MgCl₂) acrescido de 0,5 % de triton, e fixadas com 4% paraformaldeído/sacarose por 10 minutos em gelo. Após dois banhos em 70 % etanol gelado por 3 minutos, as células foram desidratadas em banhos

seriados de 80, 90 e 100% etanol por 3 minutos cada. Com as lâminas secas, as células foram colocadas em contato com a solução de hibridação (2X SSC; 50% formamida; 10% dextran sulfato; 2 mM vanadil ribonucleosídeo; 0,02% BSA) na qual foi adicionada 50 ng de sonda contra *XIST* previamente marcada com Biotin-Nick Translation Kit (nucleotídeos marcados com biotina), conforme instruções do fabricante (Roche), e desnaturada por 7 minutos a 74 °C. A hibridação foi feita durante 16 horas a 37 °C em câmara umidificada com uma solução 2X SSC acrescida de 50% formamida, e para minimizar a evaporação as células foram cobertas com uma lamínula plástica. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes por 4 minutos cada com uma solução 2X SSC acrescida de 50% formamida a 42 °C, e 2 vezes por 4 minutos cada com uma solução 2X SSC a 42 °C. Após um bloqueio por 10 minutos em solução 1% BSA, 2X SSC, 2 mM vanadil ribonucleosídeo, as células foram incubadas com anticorpo avidina (Roche), marcado com rodamina (Sigma), na proporção 1:50 em solução 2X SSC, 2 mM vanadil, 1% BSA por 1 hora no escuro. A lâmina com as células foi então lavada 2 vezes por 5 minutos cada com uma solução 4X SSC acrescida de 0,1% Tween em temperatura ambiente, e coberta com Vectashield-DAPI (Vector Laboratories) e lamínula. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Laboratório de Genética Humana (IB-USP). Para documentação, as imagens foram capturadas por câmara CCD e processadas utilizando-se o *software* ISIS (MetaSystem, Altussheim, Alemanha). Como controle da eficiência da sonda e acúmulo de *XIST* foi utilizado células femininas.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM REGIÕES EXPRESSAS DE GENES “IMPRINTADOS”

Para realizar a análise comparativa do controle epigenético entre células humanas normais e transformadas, foi importante analisarmos o maior número possível de genes informativos. Assim, na literatura identificamos 9 genes descritos como “imprintados” em fibroblastos humanos: *SNRPN* (Glenn, Porter *et al.*, 1993); *IGF2* e *H19* (Van Roozendaal, Gillis *et al.*, 1998); *ATP10A* (Meguro, Kashiwagi *et al.*, 2001); *CDKN1* (Diaz-Meyer, Yang *et al.*, 2005); *NDN* (Hanel, Lau *et al.*, 2005); *SMPD1* (Simonaro, Park *et al.*, 2006); *ZAC* e *PEG3* (Shibui, Higo *et al.*, 2008). No banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), buscamos SNPs na região expressa de cada um destes genes, e selecionamos genes que apresentassem ao menos um SNP com heterozigose maior do que 0.3, totalizando 4 dos genes “imprintados” descritos na literatura (*SNRPN*, *IGF2*, *H19* e *ATP10A*).

Para aumentar o número de genes analisados, selecionamos adicionalmente quatro genes descritos como “imprintados” no Geneimprint (<http://www.geneimprint.com/>), expressos em fibroblastos conforme descrito no UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>), e apresentando SNP com heterozigose maior que 0.3 de acordo com os dados depositados no NCBI (*PEG10*, *MEG3*, *MKRN* e *MAGEL2*). Desta maneira, analisamos 8 genes “imprintados” e um total de 25 SNPs, como representado na Tabela 1.

Tabela 1: Genes “imprintados” selecionados

Gene	Localização ^{\$}	Expressão ^{\$}	Identificação do SNP [#]	iniciador F	iniciador R
<i>PEG10</i>	7q21	paterna	rs13073 rs1136429 rs13226637	TCATTTTCCTGCCTGGTTGC	GGAGCCTCTCATTACAGC
<i>H19</i>	11p15.5	materna	rs217727 rs10840159 rs11542726 rs11542724 rs3741216 rs11542723 rs2839703 rs2839704 rs3741219	AGCCCAACATCAAAGACACC	AATGGAATGCTTGAAGGCTG
<i>IGF2</i>	11p15.5	paterna	rs2585	CCTAGTCGTGGCTCTCCATC	TTAAAGACAAAACCCAAGCATG
<i>MEG3</i>	14q32	materna	rs11160608 rs3742393 rs1054013	GTTTCTGGACTGTGGGCTGT	CATTGTCAAATGTCAGAGGCA
<i>MKRN3</i>	15q11-q13	paterna	rs2239669 rs36072495	CTGGCTTCTCAGGCAATTTC	CAAACCTCCCCTGGAAGCATA
<i>MAGEL2</i>	15q11-q12	paterna	rs8920 rs9785	CCCCGCTAATAGGTGTAGCA	AACGTTCAAAGAACAACCGATTA
<i>SNRPN</i>	15q11.2	paterna	rs705	TTCATGCAAAATTGTCTGCC	CCCTCAGCCTTATCATAACAG
<i>ATP10A</i>	15q11.2	materna	rs2076742 rs2076743 rs2076744 rs2076745	GAATACCGGCCACGAAC	GCAGGAAAGTGAGCAGCG

^{\$} de acordo com Geneimprint; [#] segundo NCBI.

4.2 GENOTIPAGEM DOS GENES “IMPRINTADOS”

Após padronização da técnica de PCR, foi possível genotipar os genes “imprintados” e verificar sua expressão nas células GM135-Tel e HCT116 (tabela 2).

Tabela 2: Genotipagem e padrão de expressão dos genes “imprintados” selecionados nas linhagens GM135-Tel e HCT116

Gene	Identificação do SNP [#]	Alelos [#]	GM135-Tel		HCT116	
			DNA	cDNA	DNA	cDNA
<i>PEG10</i>	rs13073	C/T	C/T	T	C	-
	rs1136429	A/G	A	-	A	-
	rs13226637	C/T	C	-	C/T	T
<i>H19</i>	rs217727	C/T	C	-	C/T	T
	rs10840159	A/G	A	-	A	-
	rs11542726	C/T	C	-	C	-
	rs11542724	A/T	T	-	T	-
	rs3741216	A/T	A	-	A	-
	rs11542723	C/G	G	-	G	-
	rs2839703	A/G/T	A	-	A	-
	rs2839704	A/G/T	A	-	T	-
	rs3741219	C/T	T	-	T	-
	rs2585	C/T	C/T	X	C/T	T
	rs11160608	C/A	C/A	A	-	--
<i>MEG3</i>	rs3742393	C/G	G	-	-	--
	rs1054013	A/G	G	-	-	--
<i>MKRN3</i>	rs2239669	C/T	C/T	C	-	--
	rs36072495	C/T	C	-	-	--
<i>MAGEL2</i>	rs8920	A/T	A	-	-	--
	rs9785	A/C	A	-	-	--
	rs10739	A/T	A	-	-	--
<i>SNRPN</i>	rs705	C/T	C/T	T	-	--
<i>ATP10A</i>	rs2076742	C/G	G	-	-	--
	rs2076743	C/T	T	-	-	--
	rs2076744	A/G	A/G	A/g	-	--
	rs2076745	A/G	A	-	-	--

segundo NCBI; (X) não-expresso neste estudo; (-) não analisado; (- -) não expresso de acordo com NCBI; letra minúscula representa menor pico no eletroferograma do sequenciamento do cDNA.

Não há informação na literatura sobre o estado “imprintado” dos genes *PEG10*, *MEG3*, *MKRN3* e *MAGEL2* em fibroblastos. Em nossas análises, pudemos verificar que *PEG10* e *MEG3* apresentam expressão monoalélica nas células GM135-Tel (Fig. 7), caracterizando-os como “imprintados” nesta linhagem.

A expressão do gene *ATP10A* na GM135-Tel difere do padrão esperado para genes “imprintados”, já que se observa expressão dos dois alelos, sendo um deles preferencialmente expresso (tabela 2 e figura 7). De fato, como relatado em trabalhos anteriores (Herzing, Kim *et al.*, 2001; Meguro, Kashiwagi *et al.*, 2001), este gene apresenta expressão preferencial do alelo materno em fibroblastos, não se comportando, portanto, como um gene “imprintado” clássico. Expressão preferencial de um dos alelos na GM135-Tel também foi vista para o gene *MKRN3* (Fig. 7).

Figura 7: Eletroferogramas dos genes “imprintados” na linhagem GM135-Tel. Em A, sequenciamento de DNA genômico e em (B), de cDNA. As setas indicam a posição dos SNPs informativos.

Segundo informações do UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>), o gene *IGF2* é expresso em fibroblasto (200 TPM em tecido conectivo e 18 TPM em pele). Porém, a linhagem GM135-Tel não expressa *IGF2*, ao menos em níveis detectáveis por nossas análises (Tabela 2 e Fig.8), apesar da linhagem original GM135 expressar este gene (Fig. 8).

Visto que *IGF2* compartilha elementos de controle de expressão com *H19*, foi também analisada a expressão deste gene, e verificou-se semelhante discordância entre GM135 e sua versão imortalizada (Fig. 8).

Figura 8: Análise da expressão dos genes *IGF2* e *H19* em fibroblastos por RT-PCR. Em A, gel de poli-acrilamida 10% mostrando a integridade dos cDNAs pela amplificação do gene controle *TOP1*. Em B, gel de agarose 1% mostrando expressão dos genes *IGF2* e *H19* na linhagem GM135 primária, e após imortalização (GM135-Tel). A linhagem Fib (cultura primária de fibroblastos femininos cedidos pelo Centro de Estudos do Genoma Humano) foi utilizada como controle positivo da expressão dos genes *H19* e *IGF2*. Ao lado de cada linhagem é mostrado controle negativo do cDNA (amostra RT-). 1Kb *plus* (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular. Foram utilizadas as mesmas quantidades de cDNA para amplificação e aplicação no gel.

Devido à importância da metilação no controle de expressão dos genes *IGF2* e *H19* (Bartolomei, 2009), avaliamos o padrão de metilação nestes genes nas células GM135 e GM135-Tel. Assim, buscamos verificar possíveis modificações no padrão de metilação na região de controle de expressão destes genes através da técnica MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), com auxílio da equipe do Laboratório de Genética Humana (IB-USP). Neste experimento, foi utilizado SALSA MLPA Kit ME030-B2 BWS/RSS (2009) (MRC-Holland), composto de 45 sondas, sendo que 19 delas constituem referências em cromossomos diversos e as demais 26 sondas são específicas para a região relacionada às síndromes de Silver-Russel e Beckwith-Wiedemann em 11p15 (11 destas contêm sítio de

reconhecimento para a enzima *Hha* I, sensível a metilação, fig. 9). Brevemente, este ensaio é capaz de estimar a metilação em uma dada região baseando-se no fato que somente os complexos DNA-sonda metilados são amplificados e posteriormente detectados em eletroforese capilar (Nygren, Ameziane *et al.*, 2005).

Comparado à linhagem original GM135, o modelo GM135-Tel apresentou hipometilação em regiões de centros de controle de expressão (sondas H19DMR N0213-L9999, KvDMR 7173-L6782, H19DMR 6266-L5772, ver Fig. 10), o que pode gerar *imprinting* aberrante (Cui, Onyango *et al.*, 2002).

Figura 9: Referências das sondas específicas para sítio de *HhaI* na região 11p15 utilizadas para MS-MLPA. São mostradas as regiões diferencialmente metiladas (DMR) importantes para o controle de *imprinting* dos genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *IGF2* e *H19*.

Figura 10: Análise de metilação da região 11p15 por MS-MLPA. A linhagem primária GM135 é comparada com sua versão imortalizada com hTERT GM135-Tel. Barras em azul representam as sondas com referência em *locus* de outros cromossomos, as sondas de dosagem (em amarelo) mostram o número de cópias em 11p15 (<0,7 = deleção; >1,3 = duplicação), as sondas com o sítio de restrição da enzima *HhaI* (em vermelho) mostram o padrão de metilação (<0,7 = hipometilado; >1,3 = hipermetilado). As colunas zeradas confirmam a digestão por *HhaI* em sondas controle de segmentos hipometilados. As setas indicam as regiões hipometiladas da GM135-Tel compara ao controle GM135. Os valores do eixo y foram obtidos através de uma planilha modificada do Excel, desenvolvida para a análise de MLPA (Eggermann, Schonherr *et al.*, 2008).

4.3 TRATAMENTOS COM VPA

Em um experimento inicial, realizado na linhagem GM135-Tel, foram utilizadas diferentes concentrações (400 μ M a 5 mM) e tempos de exposição (3 a 48 horas) ao agente inibidor de HDAC, baseados em dados da literatura (O'Neill, Keohane *et al.*, 1999; Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001; Kishikawa, Ugai *et al.*, 2002; Huangfu, Maehr *et al.*, 2008; Mikkelsen, Hanna *et al.*, 2008), para que pudessemos escolher as condições que promovessem elevação dos níveis de acetilação da histona H4.

Resultados mais significativos foram observados a partir de 1 mM de VPA, sendo que o tratamento com 5 mM de VPA por período de 6 horas apresentou maior modificação na acetilação da histona H4 na GM135-Tel, o que não aumentou com o tempo de tratamento por 12 horas (figura 11).

Figura 11: Acetilação da histona H4 basal e após exposição ao VPA nas células GM135-Tel. *Western-blot* com marcação para beta-actina (controle endógeno) e histona H4 acetilada (acH4). O tempo de exposição em horas (6h e 12h) e a concentração do agente (C= 0 mM, 400 μ M, 1 mM, 2 mM e 5 mM) estão representados acima e abaixo da figura, respectivamente.

Resultados semelhantes foram reportados por Lynch e colaboradores. Estes autores descrevem que o tratamento com TSA, outro inibidor de HDAC, provocou maiores modificações no nível de acetilação da histona H4 no período de 6 horas, com menores modificações em períodos mais longos, em células de câncer (Lynch, Tycko *et al.*, 2002). Em conjunto, estes dados

concordam com os estudos de Katan-Khaykovich e Struhl, onde foi sugerido que a célula possui um mecanismo homeostático para manter o nível basal de acetilação (Katan-Khaykovich e Struhl, 2002).

Diante da concordância de nossos resultados em células normais com os de Lynch e colaboradores (2002) em células transformadas, optamos por tratar as linhagens HCT116 e DKO com apenas duas concentrações distintas de VPA (1 mM e 5 mM) por 6 horas para a escolha do tratamento nestas células.

A partir dos dados obtidos por *western-blot*, foi possível estimar o aumento dos níveis de acetilação da histona H4 com auxílio do *software* Image J (Fig. 12). Observamos que as células normais apresentam menor nível de acetilação basal quando comparada às células transformadas, porém aquelas apresentam resposta dose-dependente mais evidente.

Figura 12: Níveis de acetilação da histona H4 basal e após exposição ao VPA. Dados provenientes da razão da intensidade das bandas de histona H4 acetilada e de beta-actina, obtidas por *western blot*. A densitometria foi realizada com auxílio do Image J. A linhagem GM135-Tel foi tratada com 2 mM e 5 mM VPA por 6 horas, enquanto as linhagens HCT116 e DKO foram tratadas com 1 mM e 5 mM VPA por 6 horas.

Em 6 horas de exposição a 5 mM de VPA para GM135-Tel e 1 mM de VPA para HCT116 e DKO, os níveis de acetilação na histona H4 aumentaram cerca de 3 vezes nas GM135-Tel, 1,4 nas HCT116 e 1,8 nas DKO em comparação ao basal, alcançando níveis semelhantes entre as diferentes linhagens. Assim, as condições acima citadas foram escolhidas para o tratamento com VPA.

4.4 TRATAMENTOS COM 5-AZA-DC

De acordo com Rhee e colaboradores, as células DKO apresentam desmetilação global do DNA e perda de *imprinting* do gene *IGF2* (Rhee, Bachman *et al.*, 2002). Nosso intuito foi tratar as linhagens HCT116 e GM135-Tel com 5-aza-dC para obter níveis de metilação do DNA semelhantes à DKO, e então analisar a expressão de genes submetidos à ICX e genes “imprintados” nestas condições.

Devido ao modo de ação do 5-aza-dC, dependente da replicação do DNA, foi escolhido um longo tempo de exposição à droga (96 horas), baseado em dados da literatura (Suzuki, Harashima *et al.*, 2004; Yang, Hoshino *et al.*, 2005; Mcgarvey, Fahrner *et al.*, 2006; Egger, Aparicio *et al.*, 2007). Após o tratamento em concentrações de 0,5 a 20 μ M de 5-aza-dC, dependendo da linhagem celular, procedeu-se a análise de metilação global de DNA através de ensaio com enzimas de restrição (Fig.13) e quantificação com auxílio do aplicativo Image J (Fig. 14).

Figura 13: Análise da metilação global do DNA através de ensaio com enzimas de restrição nas linhagens HCT116, DKO e GM135-Tel. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando as diferentes concentrações de 5-aza-dC utilizadas nos tratamentos de 96 horas. A primeira amostra de cada situação experimental corresponde ao DNA genômico não-digerido (ND), seguido de DNA digerido por *MspI* (isoesquisômero da *HpaII*) e DNA digerido por *HpaII* (sensível à metilação). Notar semelhante padrão de bandas entre os tratamentos de 10 μM 5-aza-dC nas HCT116, 20 μM 5-aza-dC nas GM135-Tel e 0 μM nas DKO (células que apresentam desmetilação global).

Figura 14: Quantificação da metilação global do DNA após exposição ao 5-aza-dC. A porcentagem relativa de metilação após cada tratamento, com duração de 96 horas, foi mensurada com base na metilação basal (cultura celular sem adição da droga), a qual foi admitida como 100% nas GM135-Tel e HCT116. A baixa porcentagem de metilação da linhagem DKO foi calculada em relação à linhagem original HCT116, e foi a meta do tratamento com 5-aza-dC nas demais células. Dados correspondentes à média e erro padrão de três experimentos independentes.

Como demonstrado, a linhagem HCT116 quando exposta a 10 μ M de 5-aza-dC por 96 horas atingiu níveis de metilação global do DNA semelhantes à DKO (Fig. 13 e 14). Já as células GM135-Tel atingiram esta meta somente quando tratadas com concentrações de 20 μ M da droga por 96 horas.

4.5 TRATAMENTOS COMBINADOS

Após determinar as condições de exposição aos agentes perturbadores de marcas epigenéticas, procederam-se os tratamentos combinados de VPA e 5-aza-dC variando-se a ordem de adição dos reagentes à cultura celular.

Células tratadas somente com 5-aza-dC ou VPA seguido de 5-aza-dC (VPA+5-aza-dC) apresentaram queda na acetilação de histonas H4 quando comparadas à exposição somente com VPA (Fig.15), sugerindo que o 5-aza-dC de alguma forma altera o equilíbrio dinâmico entre acetilação e desacetilação. Já o tratamento primeiro com 5-aza-dC e depois com VPA (5-aza-dC+VPA) levou a uma acetilação de histona H4 semelhante àquela em células expostas somente a VPA (Fig. 15), indicando que a alteração causada pelo 5-aza-dC na via de acetilação/desacetilação de histonas não foi permanente.

Figura 15: Variações nos níveis de acetilação da histona H4 após tratamentos com VPA e 5-aza-dC. A acetilação foi medida em relação à condição basal (cultura sem adição de droga), admitida como 1. Dados correspondem à média e erro padrão de dois experimentos independentes.

No caso da metilação do DNA, não foram vistas diferenças entre o tratamento simples com 5-aza-dC e os combinados. Tendo-se em vista que a metodologia aqui utilizada para análise de metilação global do DNA é pouco sensível e que o uso de inibidores de HDAC ocasiona diminuição da expressão de *DNMT1* (Januchowski, Dabrowski *et al.*, 2007; Zhou, Agoston *et al.*, 2008; Choi, Min *et al.*, 2010), optamos por analisar a expressão deste gene por RT-PCR em tempo real para verificar eventuais alterações.

Nas células HCT116, todos os tratamentos ocasionaram queda na expressão de *DNMT1*, semelhante em todas as condições experimentais (Fig.16). Por outro lado, os tratamentos realizados na linhagem GM135-Tel não provocaram alteração expressiva nos níveis de *DNMT1*, mostrando-se mais estável. As diferenças vistas nos tratamentos VPA e 5-aza-dC+VPA não foram conclusivas nas GM135-Tel, já que houve divergência entre os resultados dependendo do endógeno (Fig. 17); contudo, é possível que tenha ocorrido

uma leve queda na expressão de *DNMT1* após VPA, e ligeiro aumento após 5-aza-dC+VPA.

Figura 16: Expressão relativa de *DNMT1* na linhagem HCT116. Dados obtidos por RT-PCR em tempo real após tratamento com agentes perturbadores de marcas epigenéticas (VPA e 5-aza-dC). Como amostra referência foi utilizada HCT116 sem adição de droga (controle), e como genes de controle endógeno, *TOP1* e *YWAHZ*. Resultados consistentes em dois experimentos independentes

Figura 17: Expressão relativa de *DNMT1* na linhagem GM135-Tel. Dados obtidos por RT-PCR em tempo real após tratamento com agentes perturbadores de marcas epigenéticas (VPA e 5-aza-dC). Como amostra referência foi utilizada GM135-Tel sem adição de droga (controle), e como genes de controle endógeno, *TOP1* e *YWAHZ*. A linhagem primária original (GM135) também foi analisada. Resultados consistentes em dois experimentos independentes.

4.6 EXPRESSÃO GÊNICA APÓS TRATAMENTOS

Após avaliarmos as alterações epigenéticas resultantes dos tratamentos com as drogas VPA e 5-aza-dC, seguiu-se a análise da expressão alelo-específica por sequenciamento direto de produtos de RT-PCR obtidos a partir de cDNA das células tratadas.

Na linhagem de células normais GM135-Tel, os tratamentos com agentes perturbadores de marcas epigenéticas não levaram à ativação do alelo reprimido de genes “imprintados” e de genes submetidos à ICX (Tabela 3), ainda que em condições de desmetilação global do DNA e maiores níveis de acetilação da histona H4.

Tabela 3: Expressão de genes ligados ao X e “imprintados” na linhagem GM135-Tel antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.

Genes	SNP [#]	DNA	cDNA				
			controle	5-aza-dC	VPA	5-aza-dC+VPA	VPA+5-aza-dC
TBL1X	rs7256	A/G	A	A	A	A	A
ZFX*	rs5949242	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
DYNLT3	rs12849	A/T	T	T	T	T	T
MAOA	rs1801291	T/C	T	T	T	T	T
SUV39H1	rs3373	C/T	C	C	T	C	C
XIST	rs1894271	A/G	A	A	A	A	A
	rs16992443	C/A	A	A	A	A	A
TCEAL4	rs11010	C/T	T	T	T	T	T
GPC4	rs1048369	G/A	A	A	A	A	A
ATP10A	rs2076744	G/A	G/a	G/a	G/a	G/a	G/a
MKRN3	rs2239669	C/T	C/t	C/t	C/t	C/t	C/t
PEG10	rs13073	C/A	C	C	C	C	C
SNRPN	rs705	C/T	T	T	T	T	T
MEG3	rs11160608	C/A	A	A	A	A	A

segundo NCBI; * gene escapa à ICX; letra minúscula representa menor pico no eletroferograma; controle: célula não-tratada; genes ligados ao X estão acima da linha tracejada, genes “imprintados”, abaixo.

Por outro lado, na linhagem de células transformadas HCT116, o tratamento com 5-aza-dC ocasionou perda de *imprinting* dos genes *IGF2*, *H19* e *PEG10* (Tabela 4 e Fig. 18), e expressão do gene *XIST* (Fig. 19). Enquanto na linhagem DKO, parâmetro em relação à hipometilação global do DNA, também foi visto perda de *imprinting* nos mesmos genes (Tabela 5), porém não houve expressão significativa de *XIST* (Fig. 19).

Tabela 4: Expressão de genes “imprintados” na linhagem HCT116 antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.

Genes	SNP#	DNA	cDNA				
			controle	5-aza-dC	VPA	5-aza-dC+VPA	VPA+5-aza-dC
PEG10	rs13226637	C/T	T	C/T	T	C/T	C/T
H19	rs217727	C/T	T	C/T	T	C/T	C/T
IGF2	rs2585	C/T	T	C/T	T	C/T	C/T

segundo NCBI; controle: célula não-tratada.

Tabela 5: Expressão de genes “imprintados” na linhagem DKO antes e após tratamentos com VPA e 5-aza-dC.

Genes	SNP#	DNA	cDNA		
			controle	5-aza-dC	VPA
PEG10	rs13226637	C/T	T/C	T/C	T/C
H19	rs217727	T/C	T/C	T/C	T/C
IGF2	rs2585	A/G	T/C	T/C	T/C

segundo NCBI; controle: célula não-tratada.

Figura 18: Eletroferogramas da expressão dos genes *PEG10* e *H19* nas células transformadas. A expressão dos genes é mostrada nas linhagens HCT116 e DKO em diferentes condições experimentais: cultura sem adição de droga (controle) e tratamentos com VPA, 5-aza-dC e combinação de ambas as drogas alternando-se a ordem. A expressão alelo-específica foi monitorada através de SNPs (retângulos amarelos), sendo que dois picos nesta posição correspondem à expressão de ambos os alelos.

A perda de *imprinting* de *IGF2* na linhagem DKO já havia sido relatada (Rhee, Bachman *et al.*, 2002). Em nosso trabalho, vimos que o gene *H19*, sob mesmo controle que *IGF2*, e *PEG10* também apresentam perda de *imprinting* nas HCT116 com baixos níveis de metilação global de DNA (Fig.18). Além disso, vimos que o tratamento VPA+5-aza-dC parece ter reativado o alelo reprimido de *PEG10* em um maior número de células, o que pode ser visualizado pela igualdade dos dois picos na posição do SNP no eletroferograma (Fig. 18).

A ativação de *XIST* nas HCT116 após exposição a 5-aza-dC já havia sido relatada por nosso grupo (Vasques, Stabellini *et al.*, 2005). Aqui, nós estendemos as análises observando a expressão relativa de *XIST*, por RT-PCR em tempo real (Fig. 19), e o número de células onde a expressão deste gene foi induzida após tratamento com 5-aza-dC e VPA, utilizando a técnica de RNA-FISH (Fig. 20).

A expressão relativa de *XIST* nas HCT116 expostas ao VPA+5-aza-dC foi maior quando comparada aos demais tratamentos, embora bastante inferior quando comparada a células femininas (Fig. 19). É interessante notar que o tratamento com VPA realizado após exposição a 5-aza-dC levou a uma menor indução de expressão de *XIST*. Os experimentos de RNA-FISH (Fig. 20) são concordantes com os de RT-PCR em tempo real: de 100 núcleos analisados, notamos que 8% das HCT116 tratadas com VPA+5-aza-dC apresentam nuvem de *XIST*, enquanto esta porcentagem é menor em 5-aza-dC (2%) e 5-aza-dC+VPA (4%).

Figura 19: Expressão relativa de *XIST*. Dados obtidos por RT-PCR em tempo real nas linhagens masculinas HCT116 e DKO, sem adição de droga (controle) e após tratamento com agentes perturbadores de marcas epigenéticas (VPA e 5-aza-dC), e na linhagem feminina GM135-Tel. Como amostra referência foi utilizada HCT116 acrescida de 5-aza-dC, e como genes de controle endógeno, *HMBS* e *YWAHZ*. Resultados consistentes em dois experimentos independentes.

Figura 20: FISH de RNA utilizando sonda contra *XIST*. Em A, células femininas GM135-Tel (Stabellini, 2008). Em B, células masculinas HCT116 após tratamento com 10 μ M de 5-aza-dC por 96 horas. Marcação de *XIST* em rosa; em azul, núcleos celulares marcados com DAPI.

Nosso grupo tem utilizado fibroblastos primários humanos imortalizados com hTERT (subunidade catalítica da telomerase humana) como modelo para o estudo da manutenção da ICX (Vasques, 2003; Stabellini, 2008; Stabellini, De Mello *et al.*, 2009). Por outro lado, células transformadas, como a linhagem HCT116, são de mais fácil manipulação genética, incluindo transgênese e recombinação homóloga. Assim, a disponibilidade de linhagens derivadas das células HCT116 nocaute para genes de DNMTs nos levou a estudar o estado epigenético do gene *XIST* nas mesmas (Vasques, Stabellini *et al.*, 2005). Um resultado surpreendente deste trabalho foi a manutenção da repressão do gene *XIST* em células DKO, apesar das mesmas apresentarem hipometilação global do genoma e perda de *imprinting* do gene *IGF2* (Rhee, Bachman *et al.*, 2002). Isto nos levou a propor que talvez a manutenção do estado epigenético de genes envolvidos na ICX seja mais rigorosa do que a de genes “imprintados”. Neste trabalho avaliamos esta hipótese, e a de que o controle epigenético em células imortalizadas com hTERT, nosso modelo de células normais, é mais rigoroso do que aquele de células transformadas.

5.1 O MODELO GM135-TEL

Células humanas normais apresentam um número limitado de ciclos de divisões celulares, o qual uma vez atingido inicia o estado de senescência (Hayflick e Moorhead, 1961). Os telômeros, que encurtam naturalmente a cada divisão celular como resultado da replicação incompleta dos cromossomos pela DNA polimerase, sinalizam a senescência celular quando alcançam um tamanho crítico (Allsopp, Vaziri *et al.*, 1992).

A enzima telomerase, não-expressa em vários tecidos somáticos de humanos, é capaz de sintetizar as sequências repetitivas que formam os telômeros, e quando sua atividade é restituída em uma linhagem celular amplia seu tempo de vida proliferativa (Bodnar, Ouellette *et al.*, 1998). A célula imortalizada através deste processo não apresenta características de células transformadas, como anormalidades cromossômicas (Jiang, Jimenez *et al.*, 1999; Morales, Holt *et al.*, 1999), o que a torna um bom modelo *in vitro* para pesquisa.

Young e colaboradores mostraram que células imortalizadas após transfecção com o cDNA da hTERT mantém-se “jovem” pela estabilização da metilação do DNA, através da manutenção da expressão de *DNMT1*, e por impedir um padrão de expressão gênica relacionado à senescência (Young, Sedivy *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, a linhagem GM135-Tel não apresenta padrão de expressão gênica idêntico à linhagem original GM135 em relação aos genes “imprintados” *IGF2* e *H19* (Fig. 8). De forma consistente, o padrão de metilação da região de controle destes genes “imprintados” (*H19DRM*) também não foi mantido (Fig. 10), embora a expressão de *DNMT1* seja semelhante em ambas as linhagens celulares (Fig. 17).

Na ausência de metilação em *H19DMR*, fatores CTCF ligam-se a esta região fazendo com que elementos 3' a *H19* atuem na expressão deste gene, mas não de *IGF2*. Por outro lado, a metilação de *H19DMR* impede a ligação de CTCF proporcionando a interação daqueles elementos com *IGF2*, ocasionando a expressão deste gene, mas não de *H19* (Fig. 21). Em condições normais, o cromossomo 11 paterno possui *H19DMR* metilada, e o materno, desmetilada, o

que leva à expressão “imprintada” destes genes (Biliya e Bulla, 2010). Em caso de hipometilação em ambas as cópias do cromossomo 11, são esperadas a não-expressão de *IGF2*, como observado no modelo GM135-Tel, e a expressão bialélica de *H19*. Porém, não foi detectada a expressão de *H19*, e assim, provavelmente outras modificações atuam na GM135-Tel impedindo a expressão deste gene. Ainda que a função de *H19* não esteja esclarecida (Onyango e Feinberg, 2011), é sugerida sua atuação como supressor de tumor (Hao, Crenshaw *et al.*, 1993). Neste sentido, a repressão de *H19* nas GM135-Tel poderia estar relacionada ao processo de immortalização.

Figura 21: Regulação da expressão dos genes “imprintados” *Igf2* e *H19* no modelo murino. Na ausência de metilação em *H19DMR*, elementos isoladores CTCF ligam-se a esta região e limitam a ação de elementos de regulação positiva (*enhancers*) sob *Igf2*. Por outro lado, a metilação em *H19DMR* favorece a ação dos *enhancers* sob *Igf2* (adaptado de Biliya e Bulla, 2010).

Okamura e colaboradores estudaram a perda de *imprinting* dos genes *NDN*, *MAGEL2*, *PEG3* e *ZNF127* em linhagens immortalizadas através de diferentes processos, e encontraram perda de *imprinting* mesmo em células com atividade de telomerase restituída (Okamura, Ohno *et al.*, 2011). Segundo estes pesquisadores, a perda de *imprinting* pode desempenhar algum papel na immortalização ou há um mecanismo comum envolvido em ambos os processos.

Estes dados apoiam a hipótese que as modificações vistas em *IGF2* e *H19* na linhagem GM135-Tel podem ser parte do processo de imortalização.

5.2 MANUTENÇÃO DO CONTROLE EPIGENÉTICO EM CÉLULAS NORMAIS, MAS NÃO EM CÉLULAS TRANSFORMADAS, APÓS PERTURBAÇÃO DE MARCAS EPIGENÉTICAS

5.2.1 EXPOSIÇÃO AO VPA NÃO OCASIONOU REATIVAÇÃO DE ALELOS REPRIMIDOS

Embora a hipoacetilação das histonas H3 e H4 seja característica do cromossomo X inativo (Heard, 2004), e o estado de acetilação de histonas em genes “imprintados” acompanhe o padrão de expressão dos mesmos (Sha, 2008), o tratamento com VPA não foi capaz de ativar alelos reprimidos de genes submetidos à ICX e de genes “imprintados” nas linhagens estudadas. Este resultado pode refletir a menor importância da acetilação no controle da expressão dos genes analisados, ou significar que o aumento dos níveis de acetilação foi insuficiente para detectarmos alguma alteração na expressão gênica.

A correlação positiva entre acetilação em histonas e transcrição gênica é característica comum de genes ativos (Choi e Howe, 2009). Desta maneira, em genes com um controle epigenético mais complexo, como os “imprintados” e os submetidos à ICX, esta marca epigenética pode desempenhar um papel menor no controle de sua expressão. Neste sentido, trabalhos anteriores mostraram que a inibição da desacetilação em histonas, com uso de TSA, não foi capaz de ativar o alelo reprimido de *H19* em células humanas tumorais (Yoshioka, Shirayoshi *et al.*, 2001; Lynch, Tycko *et al.*, 2002). Por outro lado, o tratamento com TSA ou com butirato de sódio provocou expressão bialélica de *IGF2* em fibroblastos fetais humanos (Hu, Oruganti *et al.*, 1998).

As drogas VPA e butirato de sódio inibem as classes I e IIa de HDAC (Davie, 2003; Xu, Parmigiani *et al.*, 2007), enquanto a TSA age sobre as classes I e II (Bertrand, 2010). Então, a discrepância entre os resultados não se deve a abrangência da droga em relação à quantidade de HDACs inibidas, mas é possível que se deva aos diferentes níveis de acetilação atingidos após os diversos tratamentos. Contudo, os estudos acima citados não nos fornecem dados para esta inferência. São necessárias técnicas mais sensíveis, analisando outras histonas além da H4 e especificando as modificações (posição da lisina e quantidade de grupos acetil adicionados) para elaborar correlações entre acetilação de histonas e ativação gênica.

5.2.2 EXPOSIÇÃO AO 5-AZA-DC OCASIONOU REATIVAÇÃO DE ALELOS REPRIMIDOS EM CÉLULAS TRANSFORMADAS

De maneira semelhante ao relatado sobre o uso de inibidores de HDAC, estudos com 5-aza-dC também mostram resultados variáveis. Em células híbridas humano-camundongo tratadas com 5-aza-dC, foi relatada reativação de genes submetidos à ICX (Gartler e Goldman, 1994), o que não se observa em fibroblastos humanos expostos ao mesmo tratamento (Wolf e Migeon, 1982). Já a expressão de *XIST* a partir do X ativo foi induzida por 5-aza-dC tanto em células híbridas humano-camundongo quanto em fibroblastos humanos (Hansen, Canfield *et al.*, 1998). Em relação a genes “imprintados”, a perda de *imprinting* é estudada principalmente em células tumorais, nas quais o tratamento com 5-aza-dC levou a expressão bialélica de *H19* (Lynch, Tycko *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, células humanas normais e transformadas com níveis semelhantes de hipometilação do DNA foram analisadas. Sob esta condição, em células normais não foram observadas modificações na expressão dos genes analisados (tabela 3), enquanto que nas células transformadas foram observadas reativação dos alelos reprimidos dos genes “imprintados” *IGF2*, *H19* e *PEG10* (tabelas 4 e 5 e fig. 18), e indução da expressão de *XIST* a partir do X ativo (Fig. 19 e 20).

A expressão de *XIST* e a perda de *imprinting* observadas juntamente nas células transformadas nos sugerem que genes submetidos à ICX e “imprintados” compartilham uma maquinaria de controle de expressão, não havendo diferenças na rigidez deste controle. Ainda que as células DKO apresentem expressão bialélica de *IGF2* (Rhee, Bachman *et al.*, 2002) mas expressem *XIST* somente após tratamento com 5-aza-dC (Vasques, Stabellini *et al.*, 2005), este fato, provavelmente, não é reflexo de um rígido controle da ICX quando comparado ao *imprinting* genômico, e sim da seleção contra as células que expressam *XIST* a partir do X ativo durante a obtenção da linhagem DKO.

Tendo-se em vista o modelo clássico para controle de expressão de *H19* e *IGF2* (Fig. 20), não é esperada a perda de *imprinting* em ambos os genes, e nas HCT116 hipometiladas observamos expressão bialélica dos dois genes. De fato, aquele modelo não é capaz de explicar a expressão destes genes em diferentes tipos de câncer, onde não há relação óbvia entre metilação na região de controle de *imprinting* *H19DMR* e perda de *imprinting* (Cui, Onyango *et al.*, 2002; Byun, Wong *et al.*, 2007; Wu, Qin *et al.*, 2008). Contudo há associação da hiper- e hipometilação na *H19DMR* com *imprinting* aberrante, e outra região

diferencialmente metilada localizada dentro de *IGF2* desempenha maior importância para expressão bialélica deste gene (Cui, Onyango *et al.*, 2002). Embora a regulação da expressão dos genes *IGF2* e *H19* seja a mais estudada em termos de *imprinting* genômico, ainda são necessários estudos para elucidar o controle de *imprinting* destes genes e se este é diferente entre células normais e transformadas.

5.2.3 TRATAMENTOS COMBINADOS DE VPA E 5-AZA-dC OCASIONARAM DIFERENÇAS NA ACETILAÇÃO DA HISTONA H4 E NA EXPRESSÃO GÊNICA

Csankovszki e colaboradores propuseram um sinergismo entre o RNA *Xist*, metilação do DNA e hipoacetilação em histonas na manutenção de ICX em células murinas (Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001). Em nosso laboratório, observamos que células GM135-Tel com 68% de queda na expressão de *DNMT1* apresentam desmetilação no promotor de *XIST* não acompanhada de mudanças na expressão deste gene (Stabellini, 2008), sugerindo a ação de outros fatores no controle da expressão de *XIST* em células humanas normais. A ação conjunta da desmetilação do DNA e acetilação de histona na perda de *imprinting* do gene *H19* também foi relatada em células murinas (Pedone, Pikaart *et al.*, 1999). Em nossas análises, os tratamentos combinados ocasionaram diferenças nos níveis de acetilação da histona H4, tanto nas células normais quanto nas transformadas, e na expressão dos genes *PEG10* e *XIST* em células transformadas (Fig. 18 e 19, respectivamente).

O tratamento das células somente com 5-aza-dC ou posterior ao tratamento com VPA levou à diminuição global da acetilação da histona H4, provavelmente pela alteração do equilíbrio entre acetilação e desacetilação de

histonas. Já Sugimura e colaboradores relataram aumento da acetilação da histona H3.3 após exposição a 5-aza-dC em regiões pericentroméricas (Sugimura, Fukushima *et al.*, 2010). A divergência entre esses e os nossos dados pode se dar por várias razões: diferentes histonas analisadas, abrangência da análise e diferentes células utilizadas como modelo. Em nosso estudo, analisamos a acetilação global da histona H4 em células humanas, enquanto Sugimura e colaboradores (2010) se concentraram na análise da acetilação da histona H3.3 em regiões específicas de células murinas. De qualquer maneira, a identificação de um efeito de 5-aza-dC na acetilação de histona H4 descrito neste trabalho é importante para a melhor compreensão do efeito desta droga no epigenoma celular.

Nas células HCT116, as drogas VPA e 5-aza-dC, utilizadas em tratamentos simples ou combinadas, ocasionaram a diminuição da expressão de *DNMT1* (Fig. 16). Por outro lado, nas mesmas condições, as células normais se apresentaram mais estáveis em relação à expressão de *DNMT1* (Fig. 17), o que pode ser reflexo da manutenção da expressão desta enzima em células imortalizadas com hTERT (Young, Sedivy *et al.*, 2003).

A diminuição da expressão de *DNMT1* após exposição a inibidores de HDAC já havia sido relatada (Januchowski, Dabrowski *et al.*, 2007; Zhou, Agoston *et al.*, 2008; Choi, Min *et al.*, 2010), no entanto o efeito de 5-aza-dC sobre a expressão de *DNMT1* ainda não havia sido descrito. Em geral, a exposição a 5-aza-dC leva à ativação gênica decorrente da desmetilação de DNA. Porém, essa droga também causa queda na expressão de alguns genes (Gius, Cui *et al.*, 2004; Schuebel, Chen *et al.*, 2007), como observamos aqui

em relação ao gene *DNMT1* nas HCT116. Este é provavelmente um efeito secundário da 5-aza-dC, que deve ser melhor investigado.

A maior expressão de *XIST* (Fig. 19) e o possível aumento no número de células com perda de *imprinting* em *PEG10* (Fig. 18) após o tratamento VPA+5-aza-dC nas HCT116 não estão relacionados ao aumento de acetilação (Fig. 15) e/ou queda de expressão de *DNMT1* (Fig. 16). Pois este tratamento não corresponde aos maiores níveis de acetilação e diminuição da expressão de *DNMT1* alcançados nas diferentes condições experimentais. Mas, possivelmente, se deva a efeitos secundários destas drogas.

As drogas aqui utilizadas possuem efeito mais abrangente do que hiperacetilação em histonas e hipometilação do DNA. Embora todos os efeitos ainda não estejam completamente elucidados, o VPA é capaz de induzir a depleção de várias proteínas remodeladoras de cromatina (Marchion, Bicaku *et al.*, 2005) e o 5-aza-dC pode ativar até mesmo genes sem ilha CpG em sua região promotora (Liang, Gonzales *et al.*, 2002). Neste trabalho identificamos que o 5-aza-dC e VPA acarretam a diminuição da expressão de *DNMT1*, e 5-aza-dC leva a diminuição de acetilação da histona H4 (Fig. 22).

Figura 22: Ações das drogas VPA e 5-aza-dC no controle epigenético. VPA atua inibindo a ação de HDAC e a expressão de *DNMT1*. 5-aza-dC inibe a atuação e expressão de *DNMT1* e altera o equilíbrio dinâmico entre acetilação e desacetilação da histona H4, possivelmente através da ativação de HDAC ou da inibição de HAT.

Os vários elementos que constituem o controle epigenético agem de maneira integrada: proteínas não-histona e modificações no DNA e em histonas agem em conjunto modificando a cromatina (Ruthenburg, Li *et al.*, 2007; Winter e Fischle, 2010). Há proteínas capazes de reconhecer os sinais epigenéticos, recrutar outras marcas e transduzir o sinal à frente da cascata de sinalização (Klose e Bird, 2006; Bannister e Kouzarides, 2011). Mecanismos redundantes e de retroalimentação positiva garantem a manutenção do controle epigenético (Costa, 2008; Bonasio, Tu *et al.*, 2010). Diante da complexa rede formada por fatores epigenéticos, torna-se difícil traçar as modificações que ocorrem na célula após perturbar quaisquer dessas marcas.

Poucos trabalhos analisaram a expressão de genes submetidos à ICX e “imprintados” após exposição a agentes perturbadores de marcas epigenéticas (tabela 6), e nosso conhecimento a respeito da resposta celular a estes agentes ainda é controverso.

Tabela 6: Dados da literatura sobre o controle epigenético nas situações experimentais de hipometilação do DNA e/ou hiperacetilação de histonas em diferentes modelos celulares.

Linhagem celular	Condição experimental		
	Hipometilação do DNA	Hiperacetilação de histonas	Hipometilação do DNA + Hiperacetilação de histonas
murina	perda de <i>imprinting</i> em <i>Igf2</i> e manutenção em <i>H19</i> (Pedone <i>et al.</i> , 1999)	manutenção da ICX (O'Neill <i>et al.</i> , 1999; Csankovszki <i>et al.</i> , 2001)	reativação de gene repórter ligado ao X (Csankovszki <i>et al.</i> , 2001) perda de <i>imprinting</i> em <i>H19</i> (Pedone <i>et al.</i> , 1999)
híbrida hunamo-camundongo	reativação de <i>XIST</i> no X ativo (Gartler e Goldman, 1994; Hansen <i>et al.</i> , 1998)		
humana normal	manutenção ICX (Wolf e Migeon, 1982; Stabellini, 2008) reativação de <i>XIST</i> no X ativo (Hansen <i>et al.</i> , 1998)	perda de <i>imprinting</i> em <i>IGF2</i> (Hu <i>et al.</i> , 1998)	
humana transformada	perda de <i>imprinting</i> em <i>IGF2</i> (Rhee <i>et al.</i> , 2002) e <i>H19</i> (Lynch <i>et al.</i> , 2002) expressão de <i>XIST</i> em célula XY (Vasques <i>et al.</i> , 2005)	manutenção do <i>imprinting</i> em <i>H19</i> (Yoshioka <i>et al.</i> , 2001; Lynch <i>et al.</i> , 2002)	

Nossa hipótese foi que células humanas normais e genes submetidos à ICX possuem controle epigenético mais rígido que células humanas transformadas e gene “imprintados”, respectivamente. Embora os modelos utilizados não compartilhem o mesmo genoma, eles foram submetidos a condições de hipometilação do DNA e aumento na acetilação da histona H4 semelhantes, e nos mostraram que células normais são menos suscetíveis a tratamentos com 5-aza-dC e VPA que células transformadas, e que genes submetidos à ICX e “imprintados” respondem de forma equivalente às perturbações epigenéticas impostas por estes agentes.

Após submissão de linhagens celulares a agentes perturbadores de duas das principais e melhor caracterizadas marcas epigenéticas (metilação do DNA e acetilação em histonas), foi observado que células humanas normais apresentam o controle epigenético mais rígido que células humanas transformadas.

O modelo de células normais apresentou modificações epigenéticas no controle de expressão dos genes “imprintados” *IGF2* e *H19* quando comparado à linhagem celular primária. Ainda assim, manteve a expressão de genes submetidos à ICX e outros “imprintados”, mesmo sob hipometilação do DNA e aumento da acetilação em histonas. Em células transformadas hipometiladas, a perda de *imprinting* foi observada juntamente com a ativação de *XIST* a partir do X ativo, sugerindo que não há diferenças na rigidez do controle de expressão gênica em ambos os fenômenos (ICX e *imprinting* genômico).

Além disso, foram observadas novas atuações de VPA e 5-aza-dC: ambas as drogas podem diminuir a expressão de *DNMT1* e 5-aza-dC altera a via acetilação/desacetilação da histona H4, levando à diminuição de H4 acetilada. Ainda, a combinação dos dois reagentes ocasionou diferentes resultados em relação à acetilação da histona H4 e expressão gênica de *XIST* e *PEG10*; este fato pode estar ligado às diferenças na cascata de sinalização geradas após a perturbação das marcas epigenéticas, uma vez que depende da ordem de adição das drogas.

Em conjunto, esses resultados reforçam a importância do uso de sistemas celulares não transformados para estudos de epigenética, e indicam

uma maior complexidade de atuação das drogas 5-aza e VPA no epigenoma celular.

A epigenética aborda o controle da expressão gênica através de diversos fatores que agem sob a cromatina, os melhor estudados são a metilação do DNA e a acetilação em histonas, relacionadas à repressão e ativação gênica, respectivamente. Em mamíferos, existem dois fenômenos epigenéticos interessantes: a inativação do cromossomo X (ICX) em fêmeas, que garante o equilíbrio transcricional gênico entre os sexos, e o *imprinting* genômico, caracterizado pela expressão monoalélica dependente da origem parental.

No presente estudo, propusemos verificar a manutenção do controle epigenético em células humanas normais e transformadas em condições semelhantes de hipometilação do DNA e hiperacetilação em histonas (após uso das drogas 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-dC) e ácido valproico, respectivamente), através do monitoramento da expressão alelo-específica pelo uso de polimorfismos de única base presentes em regiões codificadoras.

Em células normais houve manutenção da ICX e do *imprinting* genômico, enquanto que em células transformadas hipometiladas foram observadas indução de *XIST*, e perda de *imprinting* dos genes *IGF2*, *H19* e *PEG10*. Observamos que ambas as drogas podem diminuir a expressão de *DNMT1*, e 5-aza-dC altera o equilíbrio entre acetilação e desacetilação da histona H4. Ainda, a ordem de adição dos reagentes ocasionou diferenças no nível de acetilação da histona H4 e na expressão gênica de *XIST* e *PEG10*.

Nossos dados sugerem que: células humanas normais apresentam maior estabilidade do controle epigenético comparadas às células humanas transformadas, genes submetidos à ICX e “imprintados” não apresentam

diferenças na rigidez do controle de expressão, e a cascata de reação seguida após perturbação de marcas epigenéticas pode ser alterada dependendo da modificação inicial.

Epigenetics refers to mechanisms related to gene activity through conformational modifications in DNA without changes in the nucleotide sequence. Key players in the epigenetic control are DNA methylation and histone acetylation, which are related to gene activation and repression, respectively. Two striking epigenetic phenomena in mammals are X chromosome inactivation (XCI) and genomic imprinting. XCI triggers the transcriptional silencing of all but one X chromosome in each female cell, while genomic imprinting is a process that leads to mono-allelic gene expression based on parental origin.

In the present study, we intended to verify the maintenance of epigenetic control in normal and transformed human cells under the same conditions of epigenetic disturbance. For this purpose, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) and valproic acid (VPA) were used to cause DNA hypomethylation and histone hyperacetylation, respectively. By monitoring allelic-specific expression using single nucleotide polymorphisms present in coding regions, we were able to check the effects of the modifications in the expression pattern of imprinted or subjected to XCI genes.

While in female normal cells XCI and genomic imprinting were not affected by VPA or 5-aza-dC treatments, transformed male cells showed *XIST* activation and loss of imprinting of *PEG10*, *IGF2* and *H19* genes in the hypomethylation scenario. In addition, both drugs can decrease the expression of *DNMT1*, and 5-aza-dC alters the balance between acetylation and deacetylation of histone H4. Furthermore, we could see different degrees of

histone H4 acetylation levels and of *XIST* and *PEG10* expression, depending on which of the drugs was added first.

Our data suggest that the epigenetic control in normal human cells is more stable when compared to transformed human cells. In addition, both XCI and genomic imprinting are epigenetic features equally hard to disturb. Finally, depending on the initial epigenetic modification (global demethylation or acethylation), it will induce different epigenetic control networks, with consequence to the final status of gene expression.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B., A. Johnson *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Tradução de Ana Beatriz Gorini. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, *et al.* Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.51, May, p.786-94. 1964.
- Allsopp, R. C., H. Vaziri, *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.21, Nov 1, p.10114-8. 1992.
- Arya, G., A. Maitra, *et al.* A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning. J Biomol Struct Dyn, v.27, n.6, Jun, p.803-20. 2010.
- Avner, P. e E. Heard. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. Nat Rev Genet, v.2, n.1, Jan, p.59-67. 2001.
- Bannister, A. J. e T. Kouzarides. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res, v.21, n.3, Mar, p.381-95. 2011.
- Bartolomei, M. S. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. Genes Dev, v.23, n.18, Sep 15, p.2124-33. 2009.
- Bartova, E., J. Krejci, *et al.* Histone modifications and nuclear architecture: a review. J Histochem Cytochem, v.56, n.8, Aug, p.711-21. 2008.
- Beard, C., E. Li, *et al.* Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. Genes Dev, v.9, n.19, Oct 1, p.2325-34. 1995.
- Bertrand, P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. Eur J Med Chem, v.45, n.6, Jun, p.2095-116. 2010.
- Biliya, S. e L. A. Bulla, Jr. Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. Exp Biol Med (Maywood), v.235, n.2, Feb, p.139-47. 2010.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science, v.279, n.5349, Jan 16, p.349-52. 1998.
- Bonasio, R., S. Tu, *et al.* Molecular signals of epigenetic states. Science, v.330, n.6004, Oct 29, p.612-6. 2010.
- Brinkman, A. B., T. Roelofsen, *et al.* Histone modification patterns associated with the human X chromosome. EMBO Rep, v.7, n.6, Jun, p.628-34. 2006.
- Brockdorff, N., A. Ashworth, *et al.* The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. Cell, v.71, n.3, Oct 30, p.515-26. 1992.
- Brown, C. J., A. Ballabio, *et al.* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature, v.349, n.6304, Jan 3, p.38-44. 1991.
- Brown, C. J., B. D. Hendrich, *et al.* The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell, v.71, n.3, Oct 30, p.527-42. 1992.

- Brown, C. J., R. G. Lafreniere, *et al.* Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. Nature, v.349, n.6304, Jan 3, p.82-4. 1991.
- Byun, H. M., H. L. Wong, *et al.* Examination of IGF2 and H19 loss of imprinting in bladder cancer. Cancer Res, v.67, n.22, Nov 15, p.10753-8. 2007.
- Carrel, L. e H. F. Willard. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. Nature, v.434, n.7031, Mar 17, p.400-4. 2005.
- Chan, K. M., H. Zhang, *et al.* Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108, n.40, Oct 4, p.16699-704. 2011.
- Choi, J. H., N. Y. Min, *et al.* TSA-induced DNMT1 down-regulation represses hTERT expression via recruiting CTCF into demethylated core promoter region of hTERT in HCT116. Biochem Biophys Res Commun, v.391, n.1, Jan 1, p.449-54. 2010.
- Choi, J. K. e L. J. Howe. Histone acetylation: truth of consequences? Biochem Cell Biol, v.87, n.1, Feb, p.139-50. 2009.
- Clemson, C. M., J. A. Mcneil, *et al.* XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. J Cell Biol, v.132, n.3, Feb, p.259-75. 1996.
- Costa, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. Gene, v.410, n.1, Feb 29, p.9-17. 2008.
- Crouse, H. V. The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*. Genetics, v.45, n.10, Oct, p.1429-43. 1960.
- Csankovszki, G., A. Nagy, *et al.* Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. J Cell Biol, v.153, n.4, May 14, p.773-84. 2001.
- Cui, H., P. Onyango, *et al.* Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Res, v.62, n.22, Nov 15, p.6442-6. 2002.
- Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. J Nutr, v.133, n.7 Suppl, Jul, p.2485S-2493S. 2003.
- Delcuve, G. P., M. Rastegar, *et al.* Epigenetic control. J Cell Physiol, v.219, n.2, May, p.243-50. 2009.
- Diaz-Meyer, N., Y. Yang, *et al.* Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith-Wiedemann syndrome. J Med Genet, v.42, n.8, Aug, p.648-55. 2005.
- Donohoe, M. E., S. S. Silva, *et al.* The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctcf and also controls X-chromosome pairing and counting. Nature, v.460, n.7251, Jul 2, p.128-32. 2009.
- Edwards, C. A. e A. C. Ferguson-Smith. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. Curr Opin Cell Biol, v.19, n.3, Jun, p.281-9. 2007.
- Egger, G., A. M. Aparicio, *et al.* Inhibition of histone deacetylation does not block resiliencing of p16 after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. Cancer Res, v.67, n.1, Jan 1, p.346-53. 2007.
- Eggermann, T., N. Schonherr, *et al.* Use of multiplex ligation-dependent probe amplification increases the detection rate for 11p15 epigenetic alterations in Silver-Russell syndrome. Clin Genet, v.73, n.1, Jan, p.79-84. 2008.
- Erwin, J. A. e J. T. Lee. New twists in X-chromosome inactivation. Curr Opin Cell Biol, v.20, n.3, Jun, p.349-55. 2008.

Fabian, M. R., T. R. Sundermeier, *et al.* Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. Prog Mol Subcell Biol, v.50, p.1-20. 2010.

Feng, S., S. E. Jacobsen, *et al.* Epigenetic reprogramming in plant and animal development. Science, v.330, n.6004, Oct 29, p.622-7. 2010.

Fire, A., S. Xu, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v.391, n.6669, Feb 19, p.806-11. 1998.

Gartler, S. M. e M. A. Goldman. Reactivation of inactive X-linked genes. Dev Genet, v.15, n.6, p.504-14. 1994.

Geneimprint

Disponível em: < <http://www.geneimprint.com>>

Gius, D., H. Cui, *et al.* Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. Cancer Cell, v.6, n.4, Oct, p.361-71. 2004.

Glenn, C. C., K. A. Porter, *et al.* Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene. Hum Mol Genet, v.2, n.12, Dec, p.2001-5. 1993.

Gottlicher, M., S. Minucci, *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J, v.20, n.24, Dec 17, p.6969-78. 2001.

Hanel, M. L., J. C. Lau, *et al.* Chromatin modification of the human imprinted NDN (necdin) gene detected by in vivo footprinting. J Cell Biochem, v.94, n.5, Apr 1, p.1046-57. 2005.

Hansen, R. S., T. K. Canfield, *et al.* Reactivation of XIST in normal fibroblasts and a somatic cell hybrid: abnormal localization of XIST RNA in hybrid cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.9, Apr 28, p.5133-8. 1998.

Hao, Y., T. Crenshaw, *et al.* Tumour-suppressor activity of H19 RNA. Nature, v.365, n.6448, Oct 21, p.764-7. 1993.

Hayflick, L. e P. S. Moorhead. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res, v.25, Dec, p.585-621. 1961.

Heard, E. Recent advances in X-chromosome inactivation. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.3, Jun, p.247-55. 2004.

_____. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. Curr Opin Genet Dev, v.15, n.5, Oct, p.482-9. 2005.

Heard, E. e C. M. Disteche. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. Genes Dev, v.20, n.14, Jul 15, p.1848-67. 2006.

Herzing, L. B., S. J. Kim, *et al.* The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. Am J Hum Genet, v.68, n.6, Jun, p.1501-5. 2001.

Hirasawa, R., H. Chiba, *et al.* Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. Genes Dev, v.22, n.12, Jun 15, p.1607-16. 2008.

Hirasawa, R. e R. Feil. Genomic imprinting and human disease. Essays Biochem, v.48, n.1, Sep 20, p.187-200. 2010.

Holliday, R. Epigenetics: a historical overview. Epigenetics, v.1, n.2, Apr-Jun, p.76-80. 2006.

Holliday, R. e J. E. Pugh. DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science, v.187, n.4173, Jan 24, p.226-32. 1975.

Hu, J. F., H. Oruganti, *et al.* The role of histone acetylation in the allelic expression of the imprinted human insulin-like growth factor II gene. Biochem Biophys Res Commun, v.251, n.2, Oct 20, p.403-8. 1998.

Huangfu, D., R. Maehr, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat Biotechnol, v.26, n.7, Jul, p.795-7. 2008.

Illingworth, R. S. e A. P. Bird. CpG islands--'a rough guide'. FEBS Lett, v.583, n.11, Jun 5, p.1713-20. 2009.

Iqbal, K., S. G. Jin, *et al.* Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108, n.9, Mar 1, p.3642-7. 2011.

Januchowski, R., M. Dabrowski, *et al.* Trichostatin A down-regulate DNA methyltransferase 1 in Jurkat T cells. Cancer Lett, v.246, n.1-2, Feb 8, p.313-7. 2007.

Jiang, X. R., G. Jimenez, *et al.* Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. Nat Genet, v.21, n.1, Jan, p.111-4. 1999.

Jones, P. A. e S. M. Taylor. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell, v.20, n.1, May, p.85-93. 1980.

Katan-Khaykovich, Y. e K. Struhl. Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. Genes Dev, v.16, n.6, Mar 15, p.743-52. 2002.

Kermicle, J. L. Dependence of the R-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. Genetics, v.66, n.1, Sep, p.69-85. 1970.

Kim, K. P., A. Thurston, *et al.* Gene-specific vulnerability to imprinting variability in human embryonic stem cell lines. Genome Res, v.17, n.12, Dec, p.1731-42. 2007.

Kishikawa, S., H. Ugai, *et al.* Roles of histone acetylation in the Dnmt1 gene expression. Nucleic Acids Res Suppl, n.2, p.209-10. 2002.

Kiyama, R. e E. N. Trifonov. What positions nucleosomes?--A model. FEBS Lett, v.523, n.1-3, Jul 17, p.7-11. 2002.

Klose, R. J. e A. P. Bird. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci, v.31, n.2, Feb, p.89-97. 2006.

Kota, S. K. e R. Feil. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. Dev Cell, v.19, n.5, Nov 16, p.675-86. 2010.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.693-705. 2007.

Lee, B. M. e L. C. Mahadevan. Stability of histone modifications across mammalian genomes: implications for 'epigenetic' marking. J Cell Biochem, v.108, n.1, Sep 1, p.22-34. 2009.

Li, E., C. Beard, *et al.* Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature, v.366, n.6453, Nov 25, p.362-5. 1993.

Li, E., T. H. Bestor, *et al.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell, v.69, n.6, Jun 12, p.915-26. 1992.

Li, X., M. Ito, *et al.* A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. Dev Cell, v.15, n.4, Oct, p.547-57. 2008.

Liang, G., F. A. Gonzales, *et al.* Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res, v.62, n.4, Feb 15, p.961-6. 2002.

Lochmatter, D. e P. E. Mullis. RNA interference in mammalian cell systems. Horm Res Paediatr, v.75, n.1, p.63-9. 2011.

Lynch, C. A., B. Tycko, *et al.* Reactivation of a silenced H19 gene in human rhabdomyosarcoma by demethylation of DNA but not by histone hyperacetylation. Mol Cancer, v.1, Jul 11, p.2. 2002.

Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature, v.190, Apr 22, p.372-3. 1961.

Marchion, D. C., E. Bickaku, *et al.* Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. Cancer Res, v.65, n.9, May 1, p.3815-22. 2005.

Mcgarvey, K. M., J. A. Fahrner, *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. Cancer Res, v.66, n.7, Apr 1, p.3541-9. 2006.

Mcgrath, J. e D. Solter. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. Science, v.226, n.4680, Dec 14, p.1317-9. 1984.

Meguro, M., A. Kashiwagi, *et al.* A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. Nat Genet, v.28, n.1, May, p.19-20. 2001.

Migeon, B. R. e B. Childs. Hybridization of mammalian somatic cells. Prog Med Genet, v.7, p.1-28. 1970.

Mikkelsen, T. S., J. Hanna, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature, v.454, n.7200, Jul 3, p.49-55. 2008.

Minucci, S. e P. G. Pelicci. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.1, Jan, p.38-51. 2006.

Morales, C. P., S. E. Holt, *et al.* Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. Nat Genet, v.21, n.1, Jan, p.115-8. 1999.

Moreira De Mello, J. C., E. S. De Araujo, *et al.* Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. PLoS One, v.5, n.6, p.e10947. 2010.

Morey, C. e P. Avner. The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. PLoS Genet, v.7, n.7, Jul, p.e1002212. 2011.

Morris, K. V. RNA-directed transcriptional gene silencing and activation in human cells. Oligonucleotides, v.19, n.4, Dec, p.299-306. 2009.

Mossman, D., K. T. Kim, *et al.* Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists. BMC Cancer, v.10, p.366. 2010.

MouseBook

Disponível em: <<http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting>>

Acesso em : 24 nov. 2011

Nakamura, T., Y. Arai, *et al.* PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. Nat Cell Biol, v.9, n.1, Jan, p.64-71. 2007.

Nanney, D. L. Epigenetic Control Systems. Proc Natl Acad Sci U S A, v.44, n.7, Jul 15, p.712-7. 1958.

NCBI

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>>

Nygren, A. O., N. Ameziane, *et al.* Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. Nucleic Acids Res, v.33, n.14, p.e128. 2005.

Nyhan, W. L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. Mol Genet Metab, v.86, n.1-2, Sep-Oct, p.25-33. 2005.

O'Neill, L. P., A. M. Keohane, *et al.* A developmental switch in H4 acetylation upstream of Xist plays a role in X chromosome inactivation. Embo J, v.18, n.10, May 17, p.2897-907. 1999.

Okamura, K., M. Ohno, *et al.* Possible involvement of loss of imprinting in immortalization of human fibroblasts. Int J Oncol, v.38, n.4, Apr, p.903-10. 2011.

Onyango, P. e A. P. Feinberg. A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108, n.40, Oct 4, p.16759-64. 2011.

Patra, S. K., A. Patra, *et al.* Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. Cancer Metastasis Rev, v.27, n.2, Jun, p.315-34. 2008.

Payer, B. e J. T. Lee. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. Annu Rev Genet, v.42, p.733-72. 2008.

Pedone, P. V., M. J. Pikaart, *et al.* Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the H19 and Igf2 genes. FEBS Lett, v.458, n.1, Sep 10, p.45-50. 1999.

Popp, C., W. Dean, *et al.* Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. Nature, v.463, n.7284, Feb 25, p.1101-5. 2010.

Primer-Blast

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>

Rastan, S. e B. M. Cattanaach. Interaction between the Xce locus and imprinting of the paternal X chromosome in mouse yolk-sac endoderm. Nature, v.303, n.5918, Jun 16-22, p.635-7. 1983.

Rhee, I., K. E. Bachman, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature, v.416, n.6880, Apr 4, p.552-6. 2002.

Rhee, I., K. W. Jair, *et al.* CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. Nature, v.404, n.6781, Apr 27, p.1003-7. 2000.

Ruthenburg, A. J., H. Li, *et al.* Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.12, Dec, p.983-94. 2007.

Santos, F. R., S. D. Pena, *et al.* Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum Genet, v.90, n.6, Feb, p.655-6. 1993.

Schuebel, K. E., W. Chen, *et al.* Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. PLoS Genet, v.3, n.9, Sep, p.1709-23. 2007.

Segal, E. e J. Widom. What controls nucleosome positions? Trends Genet, v.25, n.8, Aug, p.335-43. 2009.

Sha, K. A mechanistic view of genomic imprinting. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.9, p.197-216. 2008.

Sharman, G. B. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. Nature, v.230, n.5291, Mar 26, p.231-2. 1971.

Shibui, T., Y. Higo, *et al.* Changes in expression of imprinted genes following treatment of human cancer cell lines with non-mutagenic or mutagenic carcinogens. Int J Oncol, v.33, n.2, Aug, p.351-60. 2008.

Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. Annu Rev Biochem, v.75, p.243-69. 2006.

Simonaro, C. M., J. H. Park, *et al.* Imprinting at the SMPD1 locus: implications for acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. Am J Hum Genet, v.78, n.5, May, p.865-70. 2006.

Smallwood, S. A. e G. Kelsey. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends Genet, v.28, n.1, Jan, p.33-42. 2011.

Sorm, F., A. Piskala, *et al.* 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. Experientia, v.20, n.4, Apr 15, p.202-3. 1964.

Sparmann, A. e M. Van Lohuizen. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.11, Nov, p.846-56. 2006.

Stabellini R. **Análise funcional dos genes *XIST* e *DNMT1* na manutenção do processo de inativação do cromossomo X humano através do silenciamento gênico por RNAi.** São Paulo: USP, 2008. 142 pág. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Stabellini, R., J. C. De Mello, *et al.* MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts. Epigenetics, v.4, n.6, Aug 16, p.388-93. 2009.

Strahl, B. D. e C. D. Allis. The language of covalent histone modifications. Nature, v.403, n.6765, Jan 6, p.41-5. 2000.

Stresemann, C. e F. Lyko. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer, v.123, n.1, Jul 1, p.8-13. 2008.

Sugimura, K., Y. Fukushima, *et al.* Cell cycle-dependent accumulation of histone H3.3 and euchromatic histone modifications in pericentromeric heterochromatin in response to a decrease in DNA methylation levels. Exp Cell Res, v.316, n.17, Oct 15, p.2731-46. 2010.

Surani, M. A., S. C. Barton, *et al.* Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature, v.308, n.5959, Apr 5-11, p.548-50. 1984.

Suzuki, M., A. Harashima, *et al.* 5-Azacytidine supports the long-term repopulating activity of cord blood CD34(+) cells. Am J Hematol, v.77, n.3, Nov, p.313-5. 2004.

Takagi, N. e M. Sasaki. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. Nature, v.256, n.5519, Aug 21, p.640-2. 1975.

Turek-Plewa, J. e P. P. Jagodzinski. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Cell Mol Biol Lett, v.10, n.4, p.631-47. 2005.

Turner, A. M. e K. V. Morris. Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. Biotechniques, v.48, n.6, Jun, p.ix-xvi. 2010.

Unigene

disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>>

Van Roozendaal, C. E., A. J. Gillis, *et al.* Loss of imprinting of IGF2 and not H19 in breast cancer, adjacent normal tissue and derived fibroblast cultures. FEBS Lett, v.437, n.1-2, Oct 16, p.107-11. 1998.

Vasques, LR. **Análise funcional do gene *DNMT1* no controle da expressão do gene *XIST* e na manutenção do estado inativo do cromossomo X-inativo (Xi)**. São Paulo: USP, 2003. 142 pág. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Vasques, L. R., R. Stabellini, *et al.* XIST repression in the absence of DNMT1 and DNMT3B. DNA Res, v.12, n.5, p.373-8. 2005.

Vega

Disponível em: <http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Info/Index>

Acesso em: jan. a fev. 2009

Voso, M. T., V. Santini, *et al.* Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. Clin Cancer Res, v.15, n.15, Aug 1, p.5002-7. 2009.

Wikman, H., E. Kettunen, *et al.* Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. Oncogene, v.21, n.37, Aug 22, p.5804-13. 2002.

Winter, S. e W. Fischle. Epigenetic markers and their cross-talk. Essays Biochem, v.48, n.1, Sep 20, p.45-61. 2010.

Wolf, S. F. e B. R. Migeon. Studies of X chromosome DNA methylation in normal human cells. Nature, v.295, n.5851, Feb 25, p.667-71. 1982.

Wu, J., Y. Qin, *et al.* Hypomethylated and hypermethylated profiles of H19DMR are associated with the aberrant imprinting of IGF2 and H19 in human hepatocellular carcinoma. Genomics, v.91, n.5, May, p.443-50. 2008.

Wutz, A. e J. Gribnau. X inactivation Xplained. Curr Opin Genet Dev, v.17, n.5, Oct, p.387-93. 2007.

Xu, W. S., R. B. Parmigiani, *et al.* Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. Oncogene, v.26, n.37, Aug 13, p.5541-52. 2007.

Xue, F., X. C. Tian, *et al.* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. Nat Genet, v.31, n.2, Jun, p.216-20. 2002.

Yang, H., K. Hoshino, *et al.* Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. Leuk Res, v.29, n.7, Jul, p.739-48. 2005.

Yoshioka, H., Y. Shirayoshi, *et al.* A novel in vitro system for analyzing parental allele-specific histone acetylation in genomic imprinting. J Hum Genet, v.46, n.11, p.626-32. 2001.

Young, J. I., J. M. Sedivy, *et al.* Telomerase expression in normal human fibroblasts stabilizes DNA 5-methylcytosine transferase I. J Biol Chem, v.278, n.22, May 30, p.19904-8. 2003.

Zhang, K., K. E. Williams, *et al.* Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, v.1, n.7, Jul, p.500-8. 2002.

Zhao, C., K. Yasui, *et al.* Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. Cancer, v.98, n.1, Jul 1, p.18-23. 2003.

Zhao, J., B. K. Sun, *et al.* Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. Science, v.322, n.5902, Oct 31, p.750-6. 2008.

Zhou, Q., A. T. Agoston, *et al.* Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. Mol Cancer Res, v.6, n.5, May, p.873-83. 2008.

Zhu, H., T. M. Geiman, *et al.* Lsh is involved in de novo methylation of DNA. Embo J, v.25, n.2, Jan 25, p.335-45. 2006.

Anexo 1- Lista de iniciadores para amplificação de genes ligados ao cromossomo X utilizados nesse trabalho.

Gene	SNP	Polimorfismo	Iniciador F	Inicador R
<i>DYNLT3</i> *	rs12849	T/A	GCCAAAAACAAAGATCACTGC	GAGAGCGGAACCATAACTCA
<i>GPC4</i> *	rs1048369	C/A	CACGTCGTTCCCATTGTATG	ACCTGTTTGCAGTGACAGGA
<i>MAOA</i> *	rs3027407	A/G	AAATGGTCTCGGGAAGGTGA	ACCGTGGCAGGAGCTTGTAT
<i>SUV39H1</i> *	rs3373	G/A	TTGTGCTCACCCCTGGTTC	GCATAGGGTTGAGGGGTGTA
<i>TCEAL4</i> *	rs11010	C/T	TGGCTCATTACCTCAAGGAG	CTTGGACCTCTAGGGTAGAA
<i>XIST</i> **	rs1894271	A/G	CAGCATGGTTGGTGACACCTAAG	TGGAATGAGCAGTGTGCGAT
<i>XIST</i> **	rs16992443	C/A	GTGACACAAGGCCAACGACC	GAATCAGGCTTAAAGATAAACAGGAG
<i>ZFX</i> *	rs5949242	T/C	TGGCAAACCTCTGAAGTGCT	ACATTATGGGGGCCAAGAAG

*descritos em Carrel e Willard (2005); **desenhados por nossa equipe (Moreira De Mello, De Araujo *et al.*, 2010)