

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Mariana Ribeiro Costa

**PARTICIPAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NO CONTROLE
TRANSCRICIONAL DA VIA HEDGEHOG EM MODELO
MURINO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS**

Taubaté

2020

Mariana Riberio Costa

**PARTICIPAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NO CONTROLE
TRANSCRICIONAL DA VIA HEDGEHOG EM MODELO
MURINO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS**

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do grau de Bacharel pelo curso de
Ciências Biológicas, do Departamento de
Ciências Biológicas da Universidade de
Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da
Silva

Taubaté

2020

Grupo Especial de Tratamento da Informação - GETI
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBi
Universidade de Taubaté - UNITAU

C837p Costa, Marina Ribeiro
Participação da metilação do DNA no controle transcricional da via Hedgehog em modelo Murino de neuroinflamação induzida por LPS / Mariana Ribeiro Costa. -- 2020.
48 f. : il.

Monografia (graduação) - Universidade de Taubaté,
Departamento de Ciências Biológicas, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva, Departamento de Odontologia.

1. Neuroepigenética. 2. Sonic Hedgehog. 3. Neuroinflamação.
4. Metilação do DNA. Departamento Unificado. Curso de Ciências Biológicas. II. Título.

CDD – 572.86

Mariana Riberio Costa

**PARTICIPAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NO CONTROLE TRANSCRICIONAL
DA VIA HEDGEHOG EM MODELO MURINO DE NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDA POR LPS**

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau de Bacharel pelo curso de Ciências Biológicas, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

Data: 07/11/2020

Resultado: Aprovado.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Me. Roberto de Oliveira Portella

Universidade de Taubaté

Assinatura: Roberto de Oliveira Portella

Dra. Taís Browne de Miranda

Universidade de Taubaté

Assinatura: Taís Browne de Miranda

Dedico esse trabalho aos meus pais, Daniel e Carina, pois sem eles nada disso seria possível. Aos meus amigos da Universidade Estadual de Goiás, que iniciaram essa jornada comigo e aos meus amigos da Universidade de Taubaté que me ajudaram a concluí-la. E por fim, ao meu orientador Professor Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Aos meus pais pelo incentivo, paciência e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva, pela oportunidade de ter trabalhado em sua equipe e pela confiança.

A FAPESP, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho através da Iniciação Científica.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial a Samantha Veloso, por ter me incentivado, apoiado e feito dos meus dias de trabalho mais leves e felizes. E também a Taís Browne, por todos os conselhos e ajuda.

A todos os meus amigos de sala, Júlia, Joyce, Renata, Thamires, Nicolas, Paula, Flávia, Gabriela, Ana Carolina, Denner e Victória, por todas as vezes que me disseram que no fim tudo daria certo.

Ao Gustavo Siemann, por tanto me incentivar e estar presente em todos os momentos.

E por fim, agradeço a todos os meus professores que me fizeram acreditar e reconhecer que fiz a escolha certa.

RESUMO

A neuroinflamação crônica tem sido fortemente associada como fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Embora ainda existam poucas informações sobre o impacto da neuroinflamação no controle transcricional da via de sinalização Hedgehog, em especial no organismo adulto, evidências sugerem que a desregulação das funções de Ptch-Gli1, pode levar à perda anormal de células precursoras da glia, progressiva degeneração neural e instalação dos quadros de disfunção cognitiva e déficits motores. Em resposta a inflamação o Sistema Nervoso Central (SNC) pode ativar distintas vias de sinalização e mecanismos epigenéticos de controle transcricional relacionadas a neurogênese e reparo tecidual. A fim de se determinar a participação da metilação do DNA sobre o controle transcricional dos membros da via de Sinalização Hedgehog, o estado de metilação da região promotora dos membros da via, bem como a caracterização do perfil transcricional das enzimas modificadoras do DNA foram investigadas em modelo murino de neuroinflamação induzida pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as diferentes regiões cerebrais possuem perfil transcricional basal das enzimas modificadoras do DNA diferentes e respondem de forma distinta a neuroinflamação. A investigação do efeito da neuroinflamação no controle transcricional dos membros da Via Hedgehog sugere que o efeito da neuroinflamação está associado à região encefálica. Adicionalmente, a correlação inversamente proporcional entre o estado de metilação da região promotora e a expressão gênica foi observada apenas para o gene *Sufu* na região do córtex pré-frontal. Cientificamente, este estudo é o primeiro em caracterizar o perfil transcricional basal das enzimas DNMTs e TETs no SNC e demonstrar o efeito da neuroinflamação intermediando o controle transcricional mediado pela metilação do DNA de um dos membros da Via Hedgehog no cérebro adulto. De fato, o melhor conhecimento da relação entre a neuroinflamação e o controle da Via Hedgehog é fundamental para promover o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas aplicadas às doenças neurológicas. Desta maneira, o presente trabalho apresenta resultados inéditos, contribuindo no conhecimento da neuroepigenética que podem guiar estudos futuros para validação de potenciais marcadores de prognóstico do fenótipo inflamatório no SNC.

Palavras-Chave: Neuroepigenética, Sonic Hedgehog, Neuroinflamação, Metilação do DNA.

ABSTRACT

Chronic neuroinflammation has been strongly associated as a risk factor for the development of neurodegenerative diseases. Although there is still little information about the impact of neuroinflammation on the transcriptional control of the Hedgehog signaling pathway, especially in the adult organism, evidence suggests that dysregulation of Ptch1-Gli1 functions, can lead to abnormal loss of glial precursor cells, progressive degeneration neural disorder and installation of cognitive dysfunction and motor deficits. In response to inflammation, the Central Nervous System (CNS) can activate different signaling pathways and epigenetic mechanisms of transcriptional control related to neurogenesis and tissue repair. In order to determine the participation of DNA methylation on the transcriptional control of members of the Hedgehog Signaling pathway, the methylation status of the promoter region of the members of the pathway, as well as the characterization of the transcriptional profile of DNA-modifying enzymes were investigated in murine model of neuroinflammation induced by intraperitoneal administration of LPS. The results obtained in this study demonstrated that the different brain regions have a different baseline transcriptional profile of DNA modifying enzymes and respond differently to neuroinflammation. The investigation of the effect of neuroinflammation on the transcriptional control of Via Hedgehog members suggests that the effect of neuroinflammation is associated with the brain region. Additionally, an inversely proportional correlation between the methylation status of the promoter region and gene expression was observed only for the *Sufu* gene in the prefrontal cortex region. Scientifically, this study is first to characterize the basal transcriptional profile of the enzymes DNMTs and TETs in the CNS and to demonstrate the effect of neuroinflammation by mediating transcriptional control mediated by the DNA methylation of one of the members of the Via Hedgehog in the adult brain. In fact, better knowledge of the relationship between neuroinflammation and Via Hedgehog control is essential to promote the development of new therapeutic strategies applied to neurological diseases. In this way, the present work presents unprecedented results, contributing to the knowledge of neuroepigenetics that can guide future studies for the validation of potential prognostic markers of the inflammatory phenotype in the Central Nervous System.

Keywords: Neuroepigenetics, Sonic Hedgehog, Neuroinflammation, DNA methylation.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

°C – Graus Celsius

2OG – 2-oxoglurato

5-hmeC – 5-hidroximetilcitosina

5-meC – 5-metilcitosina

ANOVA – Teste de Variância

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – Barreira Hematoencefálica

CA – Califórnia

cDNA – DNA complementar

chr – Cromossomo

CpG – Pares de Citosina-fosfato-Guanina

CRB – Cerebelo

Ct - Cycle Threshold

CTX – Córtex

CXXC – Cisteína-XX-cisteína de dedo de zinco

DEPC – Dietil Pirocarbonato

Dhh – Desert hedgehog

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Dnmt1 – DNA metiltransferase 1

Dnmt3a – DNA metiltransferase 3a

Dnmt3b – DNA metiltransferases 3b

DNMTs – DNA metiltransferases

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe – Ferro

gDNA – DNA genômico

Gli1 – Fator de transcrição Oncogene homólogo associado ao glioma 1

Gli1 – Gene Oncogene homólogo associado ao glioma 1

H₂O – água

Hh – Hedgehog

HIP – Hipocampo

i.p. - região intraperitoneal

Ihh – Indian hedgehog

kg – Quilograma

LABOX – Laboratório de Estresse Oxidativo

LPS – Lipopolissacarídeo

MA – Massachusetts

MBD – Domínios de ligação para a metilação

mg – miligrama

min – Minutos

mL – Mililitros

mM – Milimolar

ng – Nanograma

NJ – New Jersey

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFC – Córtex Pré-frontal

Ptch-1 – Gene Patched1

Ptch-1 – Receptor transmembrana Patched1

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotação por minuto

RT-qPCR - Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase

SAM – S-adenosilmetionina

Shh – Gene Sonic hedgehog

Shh – Sonic hedgehog

Smo – Gene Smoothened

Smo – Proteína Smoothened

SNC – Sistema Nervoso Central

STR – Estriado

Sufu – Gene Supressor de fusão

Sufu – Proteína Supressor de fusão

T4-BGT – T4- β -glicosiltransferase

Tet1 – Gene Ten Eleven Translocation 1

Tet1 – Ten Eleven Translocation 1

Tet2 – Gene Ten Eleven Translocation 2

Tet2 – Ten Eleven Translocation 2

Tet3 – Gene Ten Eleven Translocation 3

Tet3 – Ten Eleven Translocation 3

TETs – Ten Eleven Translocation

TSSs – Locais de início da transcrição

U – Unidade de Massa Atômica

UDP-Glc – Glicose da difosfogluose de uridina

USA - United States of America

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Neuroinflamação e mecanismos moleculares de degeneração neural.....	11
1.2 Via Hedgehog e Sistema Nervoso Central.....	12
1.3 Epigenética e membros da Via Hedgehog.....	15
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Protocolo de indução de Neuroinflamação in vivo.....	21
4.2 Extração de RNA total.....	22
4.3 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	22
4.4 Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR	22
4.5 Obtenção do gDNA.....	23
4.6 Tratamento do gDNA.....	23
4.7 Determinação do padrão de metilação.....	24
4.8 Análises dos Resultados.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Determinação do perfil transcricional das enzimas DNMTs e TETs.....	28
5.2 Avaliação do efeito da neuroinflamação no perfil transcricional das enzimas DNMTs e TETs.....	32
5.3 Avaliação do efeito da neuroinflamação no perfil transcricional dos componentes da Via Hedgehog.....	33
5.4 Impacto da neuroinflamação no estado de metilação da região promotora dos membros da Via Hedgehog.....	34
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuroinflamação e mecanismos moleculares de degeneração neural

O cérebro já foi considerado um órgão imunoprivilegiado devido a capacidade fisiológica da barreira hematoencefálica (BHE) de restringir a entrada de células e macromoléculas. Esse fato nos fez acreditar que o cérebro não estaria sujeito às respostas imunitária e inflamatória periférica. Entretanto, hoje sabemos que o Sistema Nervoso Central (SNC) é altamente integrado com os demais sistemas fisiológicos e responde ativamente à resposta inflamatória periférica. ⁽¹⁾ Neste sentido, podemos definir a resposta inflamatória como uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido lesionado essencial para a sobrevivência do organismo a estímulos nocivos. ⁽²⁾ Esta resposta é caracterizada por uma sequência de processos bioquímicos e moleculares, inicialmente benéficos ao organismo que agem para promover o reparo tecidual e impedir a proliferação dos patógenos invasores. ⁽³⁾ Análises bioquímicas realizadas em diversas circunstâncias fisiológicas e patológicas mostram que além da resposta inflamatória constituir um dos principais mecanismos de defesa, responsável pela reparação tecidual cerebral, quando em excesso, essa resposta, também está relacionada com a ativação dos processos de degeneração secundária. ⁽⁴⁾

Na fase aguda da resposta inflamatória, proteínas do plasma e leucócitos dos vasos sanguíneos, extravasam rapidamente para os locais infectados, normalizando geralmente em alguns dias. No entanto, em algumas situações esta resposta inflamatória pode persistir, tornando-se crônica. ⁽⁵⁾ No SNC, a inflamação crônica pode levar à liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias e moléculas neurotróficas pela persistente ativação microglial e astrocitária, fato este que acelera a ativação dos mecanismos de neurodegeneração. ⁽⁶⁾ As microglias, além de serem consideradas as células imunitárias do SNC, podem ter também um papel ativo no suporte da homeostase cerebral, através da absorção de substâncias tóxicas e do excesso de íons K^+ do espaço extracelular. ⁽⁷⁾ Quando ativada, a microglia sofre mudanças morfológicas e adquire alta capacidade de proliferação e atividade fagocitária, sendo o principal componente de defesa imune no SNC. Sua ativação apresenta um processo de carácter ambíguo, pois muitas vezes pode apresentar um efeito contraditório, já que em alguns casos exerce um efeito neuroprotetor e, em outros, um resultado negativo, culminando na perda sináptica e até na morte neuronal. ⁽⁸⁾ Contudo, nem todas as respostas imunes do SNC são prejudiciais e a

microglia pode exercer ação dupla no SNC, agindo como guardião da homeostase cerebral e participando ativamente nos processos neurodegenerativos. ⁽⁹⁾

A redução progressiva e gradual do número de neurônios devido a prejuízos na sua estrutura ou de sua funcionalidade em resposta à persistente ativação da resposta inflamatória é uma característica comum observada entre as doenças neurodegenerativas. ⁽¹⁰⁾ É importante relatar que doenças crônicas degenerativas, como Alzheimer e Parkinson possuem fisiopatologias distintas e apresentam características neuropatológicas bem definidas. ⁽¹¹⁾ Contudo, inúmeros estudos têm demonstrado que estas doenças compartilham um alto grau de similaridade entre os mecanismos moleculares de degeneração neural, compartilhando principalmente a neuroinflamação como característica comum. ^(11, 12)

Estudos têm relatado que o processo de degeneração neural mediado pela resposta inflamatória envolve a ativação de macrófagos residentes no encéfalo (microglia), os quais ativados, liberam fatores neurotóxicos e citocinas pró-inflamatórias que promovem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). ⁽¹³⁾ Neste sentido, tanto os sinais pró-inflamatórios quanto o aumento de EROs/ERNs quando não controlados podem desencadear uma variedade de repostas bioquímicas e moleculares no SNC, e levar à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas prejudicando o equilíbrio homeostático. ⁽¹³⁾ Este delicado equilíbrio entre a produção e neutralização das EROs como também da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias deve-se a uma regulação única e sutil de inúmeras vias de sinalização e diversos sinais extracelulares, os quais devem ser corretamente interpretados e interconectados pelas células do SNC. ⁽¹⁴⁾ Dentre as diversas vias de sinalização envolvidas neste processo, podemos destacar a ação da Via Hedgehog, a qual tem se mostrado de fundamental importância para a manutenção da neurogênese e atividade neuronal em cérebros adultos. ⁽¹⁵⁾

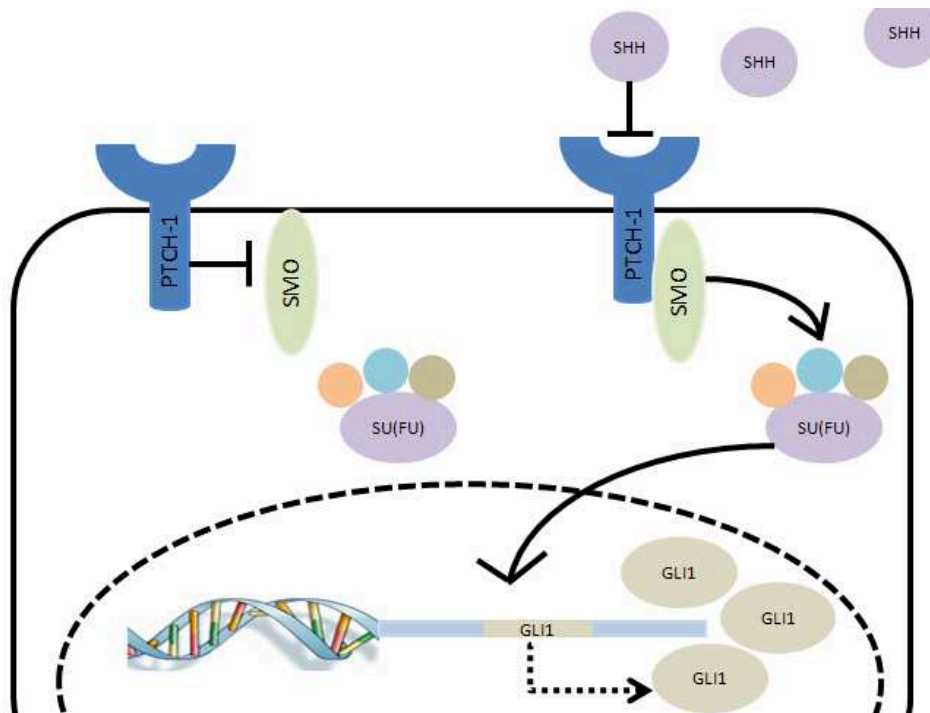
1.2 Via Hedgehog e Sistema Nervoso Central

Devido ao isolamento e caracterização dos membros da família Hedgehog (Hh), eles passaram a ser reconhecidos como mediadores-chave do desenvolvimento embrionário. ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Na morfogênese os sinais propagados pela Via Hedgehog são responsáveis pelo desenvolvimento dos diferentes tecidos. ⁽¹⁶⁾ Em vertebrados, podem atuar também como mitógenos, regulando a proliferação celular. ⁽¹⁹⁾ Durante o desenvolvimento embrionário sua ativação desempenha um papel crucial influenciando de forma autócrina e parácrina a

proliferação e diferenciação celular, controlando a aquisição da polaridade do SNC, a assimetria esquerda-direita dos membros e também o desenvolvimento dos folhetos germinativos na organogênese dos órgãos internos do organismo. ⁽²⁰⁾

A família dos ligantes Hh nos vertebrados é representada por 3 componentes, Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) e Sonic hedgehog (Shh), os quais podem ser diferencialmente expressos nos tecidos e possuir funções biológicas distintas. Estas glicoproteínas se ligam ao receptor transmembrana Patched1 (Ptch-1), que em condições normais, inibe constitutivamente a atividade do tipo receptor acoplado à proteína G da proteína Smoothed (Smo). Shh ao se ligar a Ptch-1, promove alterações conformacionais em Ptch-1 diminuindo assim sua interação com Smo. Desta forma Smo deixa de ser reprimido e se torna capaz de transduzir a cascata de sinalização que leva à ativação do fator de transcrição Oncogene homólogo associado ao glioma 1 (Gli1) como demonstrado na **Figura 1**. Com a ativação, as proteínas Gli são translocadas para o núcleo para exercer seu papel de fator de transcrição. ⁽¹⁹⁾ Enquanto Gli2 e Gli3 são os respondedores primários, Gli1 atua amplificando a resposta do sinal. ⁽²¹⁾ Atuando em conjunto no controle dos níveis e atividades da proteína Gli, temos a ação da proteína supressor de fusão (Sufu). No citoplasma, esta proteína é capaz de sequestrar a proteína Gli ⁽²²⁾ e assim controla seu nível proteico. Também é capaz de regular a atividade de Gli pela produção de proteínas repressores e ativadores de Gli ⁽²³⁾. A função citoplasmática de Sufu parece estar bem definida, contudo, pouco se sabe a respeito de sua ação nuclear e embora Sufu seja essencial para inibir a Gli em células não estimuladas, ainda não está claro se a sinalização de Hh é capaz de regular diretamente a Sufu. ⁽²³⁾

Figura 1. Funcionamento da Via Hedgehog



Fonte: www.docplayer.com.br

De todos os ligantes da via, Shh é o membro mais estudado, sendo caracterizado como uma glicoproteína com atividades morfogênicas e mitogênicas. Sua ação tem sido extensivamente estudada no contexto do desenvolvimento embrionário, contudo, existem fortes evidências de que suas propriedades mitogênicas podem ser reativadas durante a vida adulta, atuando principalmente na ativação dos mecanismos de defesa e reparo tecidual em diferentes órgãos. ⁽²⁴⁾ No SNC sua sinalização exerce um importante papel central no controle da neurogênese e reparo tecidual no cérebro adulto. Visto que seus componentes são amplamente expressos em todo o parênquima do cérebro anterior ⁽²⁵⁾ e sua redução está associada à senescência celular e a maior suscetibilidade a distúrbios relacionados ao envelhecimento ⁽²⁶⁾ a sinalização ativa desta via parece ser crucial para manutenção da atividade neuronal em adultos. ⁽²⁷⁾

É crescente o número de evidências que relacionam desregulação das funções de Ptc1-Gli1 com inúmeros distúrbios neurológicos principalmente por promover a perda anormal de células precursoras da glia e uma regulação negativa da ação de Smo no hipocampo, fato este que contribui para a instalação do quadro de disfunção cognitiva. ⁽²⁸⁾ Também foi demonstrado a importância da proteína Shh para as doenças neurológicas, visto que esta tem influência direta na manutenção da neurogênese, ^(29,30,15) além de ter ação anti-oxidante e anti-inflamatória. ⁽³¹⁾ Shh ainda, pode promover a quiescência da resposta imune em células endoteliais da barreira

hematoencefálica pela diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da adesão/migração de leucócitos ^(32, 33).

A interrupção da barreira hematoencefálica e a ativação microglial são características patológicas comuns de várias doenças neurológicas, como a esclerose múltipla, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Alzheimer. Além disso, a interleucina-1 β (IL-1 β) liberada principalmente pela microglia ativada impede a ação protetora dos astrócitos por suprimir a produção astrocítica de Shh, promovendo o aumento da permeabilidade e perda da integridade da barreira hematoencefálica. ⁽³⁴⁾ Assim, a ativação da via Hh pelo ligante Shh tem sido considerado como um sinal antienvhecimento por proteger os neurônios contra a ação dos peptídeos β -amilóide, aos níveis elevados de glutamato, as EROs e ERNs e citocinas pró-inflamatórias. Moléculas e mediadores que estão diretamente relacionados a lesões isquêmicas e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. ⁽³⁰⁾

1.3 Epigenética e membros da Via Hedgehog

Segundo Tang e Ho ⁽³⁵⁾, a epigenética é definida como as mudanças herdáveis na expressão do gene que não alteram a sequência do DNA, mas que são herdáveis mitoticamente (2001). ⁽³⁶⁾ Além dos mecanismos epigenéticos envolverem apenas modificações químicas na molécula do DNA, algumas características como a reversibilidade, os efeitos de posicionamento, e a habilidade de agir em distâncias não esperadas maiores do que um único gene, distinguem a epigenética dos mecanismos da genética convencional. ⁽³⁷⁾

Os mecanismos epigenéticos incluem a metilação de DNA, modificação pós traducionais de histonas e mecanismos baseados em RNAs não codificantes (ncRNAs), os quais podem atuar de forma isolada ou em conjunto no remodelamento estrutural da cromatina e regulação transcricional tanto em nível transcricional como também na tradução. ⁽³⁸⁾ Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é o mecanismo mais bem estudado, caracterizado por ser uma modificação química na molécula do DNA na qual ocorre a transferência de um grupamento metil proveniente do SAM (S-adenosilmetionina) à posição C5 do anel da citosina. ⁽³⁹⁾ Esta transferência é catalisada pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferases. Os membros desta família possuem capacidades distintas que se diferenciam entre a manutenção do padrão de metilação pré-existente durante a divisão celular e na criação de novos padrões de metilação (*de novo*). A Dnmt1 por estar

localizada nos focos de replicação e possuir a capacidade de reconhecimento dos dinucleotídeos CpG hemimetilados é a enzima responsável na manutenção do padrão de metilação, copiando os padrões de hemimetilados para fita recém-formada durante a replicação. Por outro lado, as DNMTs3 possuem como representantes as Dnmt3a e 3b que são classificadas como DNMTs *de novo* por atuarem preferencialmente no estabelecimento de novos padrões de metilação de DNA. ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ Embora o “modelo de divisão do trabalho”, que pro-afirma que as DNMTs3 estabelecem novos padrões de metilação e que Dnmt1 conserva o padrão de metilação existente do DNA, vários estudos têm mostrado que as enzimas DNMTs3 também contribuem para a manutenção do padrão de metilação do DNA ⁽⁴³⁾.

A metilação do DNA desempenha papel central durante o desenvolvimento embrionário, regulando funções celulares essenciais durante a embriologia, como a estabilidade do genoma, a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico e a reprogramação de genes não imprintados. Além de atuarem na plasticidade do desenvolvimento, de modo que, as exposições a fatores endógenos ou exógenos nocivos durante períodos críticos podem alterar permanentemente a estrutura ou função de sistemas orgânicos pela ativação ou inativação gênica mediada pela ação destas enzimas ^(44,35). Estudos recentes também têm mostrado um importante papel da metilação do DNA no desenvolvimento e manutenção das funções no SNC, sugerindo que a manutenção dos padrões de metilação do DNA de neurônios pós-mitóticos seja necessária para a maturação neuronal e plasticidade sináptica. ⁽⁴⁵⁾ Embora ainda pouco se saiba sobre como a metilação é regulada nos neurônios do SNC, dados sugerem que a ação de metilação *de novo* da Dnmt3a é necessária para a regulação dos genes neuronais. Reforçando esta hipótese, foi observado tanto em cultura de neurônios cerebelares quanto em regiões do SNC *in vivo*, níveis elevados de expressão de Dnmt3a durante as fases pós-natais iniciais com drástica redução de sua expressão em neurônios corticais na fase adulta. ⁽⁴⁶⁾ Também foi demonstrado que a deficiência de Dnmt3b afeta os processos de neurogênese e gliogênese. ^(45,47) O fato do cérebro possuir áreas em constante estado pós-mitótico faz com que a expressão da Dnmt1 permaneça detectável no cérebro adulto, devido principalmente à sua função crítica na manutenção do DNA e padrões de metilação em células em divisão. ^(48,49)

A descoberta do envolvimento dos membros da família de enzimas Ten Eleven Translocation (TET) na dinâmica do controle da metilação do DNA no SNC ampliou significativamente a compreensão da metilação do DNA na determinação da função neuronal e dos processos cognitivos. ⁽⁵⁰⁾ Estas enzimas são responsáveis pela oxidação do grupamento metil do carbono 5 do anel da citosina metilada, formando o intermediário 5

hidroximetilcitosina (5-hmeC).^(51,52) Após a oxidação e formação do intermediário 5-hmeC, este é posteriormente reconhecido para que o sistema de reparo possa fazer a substituição da citosina metilada por uma citosina não metilada.^(51,53–55)

A família de enzimas TETs é constituída por três membros, Tet1, Tet2 e Tet3, todos dependentes de α -cetoglutarato e Fe (II) como cofatores da reação.⁽⁵⁴⁾ Estruturalmente, as três enzimas TETs compartilham um domínio catalítico C-terminal conservado que contém os resíduos de ligação de metal indispensáveis para a oxidação.⁽⁵⁶⁾ Entretanto, apenas Tet1 e Tet3, apresentam um domínio N-terminal de cisteína-XX-cisteína de dedo de zinco (CXXC) que pode se ligar tanto a CpGs metilados quanto não metilados.⁽⁵⁷⁾ Estudos mostram que Tet1 e Tet3 podem ter funções semelhantes, apesar de possuírem padrões de expressão temporal distintos. Ambas regulam principalmente os níveis de 5-hmeC em regiões promotoras e locais de início da transcrição (TSSs), enquanto Tet2 regula principalmente os níveis de 5-hmeC nos corpos dos genes.⁽⁵⁸⁾

Os três membros já foram identificados no cérebro adulto, sendo a Tet3 a enzima mais abundante no cerebelo, córtex e hipocampo, seguido por Tet2 e Tet1,⁽⁵⁹⁾ as quais exibem forte co-localização com o marcador neuronal NeuN. Estes resultados sugerem que a expressão das TETs pode ser atribuída principalmente a células neuronais.⁽⁶⁰⁾ Embora os níveis de metilação (5-meC) sejam semelhantes no cérebro e outros órgãos, os níveis de 5-hmeC no SNC, pode ser até dez vezes maior do que nos tecidos periféricos.⁽⁶¹⁾ É interessante ressaltar que apesar dos níveis de 5-hmeC aumentarem expressivamente no cerebelo e regiões hipocámpais durante o desenvolvimento e gradativamente com o envelhecimento, este aumento não é acompanhado da concomitante diminuição de 5-meC.⁽⁶²⁾ Este fato têm sugerido uma ação direta das TETs na manutenção dinâmica dos níveis de 5-hmeC necessários para a manutenção da plasticidade neuronal,⁽⁶³⁾ principalmente a Tet3, que tem sido utilizada como um sensor de atividade sináptica por regular epigeneticamente as propriedades fundamentais e a meta-plasticidade dos neurônios por meio da desmetilação do DNA.⁽⁶⁴⁾

É importante ressaltar que o controle transcricional mediado pela metilação do DNA pode ocorrer de forma direta quando a metilação atua como uma barreira física ao reconhecimento dos fatores de transcrição de ilhas CpG (pares de Citosina-fosfato-Guanina) de regiões promotoras promovendo a inativação do gene; ou de forma indireta quando a interferência se dá pelo fato da metilação ocorrer em regiões que apresente domínios de ligação para a metilação (MBD), localizada normalmente em regiões próximas ao sítio de regulação da transcrição,

atraindo de forma indireta as proteínas de domínio de ligação de metilação que podem recrutar correpressores e desacetilases de histonas alterando a configuração da cromatina ao redor do fator de transcrição do gene e promovendo o silenciamento transcricional. Assim, a natureza dinâmica das modificações epigenéticas do DNA é crucial para regular a expressão gênica, e portanto, um potencial mediador da plasticidade neuronal. ^(65,66) Em relação ao controle transcricional dos membros da Via Hedgehog mediado por mecanismos epigenéticos, já foi demonstrado que a região promotora regulatória da proteína ativadora da via, Shh e seus demais membros, como a Gli1, Sufu e Ptch-1 possuem inúmeras ilhas CpG passíveis de metilação, ⁽⁶⁷⁾ porém ainda é limitado o número de estudos referente ao controle epigenético em condições normais no SNC. Entretanto, em condições patológicas inúmeros estudos tem relatado o envolvimento da metilação do DNA no controle repressivo transcricional de proteínas reguladoras negativas da via de sinalização Hedgehog. ^(68,69)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da metilação do DNA sobre o controle transcricional dos membros da via de sinalização Hedgehog no Sistema Nervoso Central.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil transcricional diferencial das enzimas DNMTs e TETs em diferentes regiões cerebrais (córtex, córtex pré-frontal, cerebelo, estriado e hipocampo);
- ✓ Avaliar o efeito da neuroinflamação na expressão gênica dos genes codificadores das enzimas DNMTs e TETs;
- ✓ Determinar o efeito da neuroinflamação no estado de metilação da região promotora dos genes da Via Hedgehog [*Sonic hedgehog (Shh)*; *Patched 1 (Ptch-1)*; *Supressor de Fusão (Sufu)* e *Oncogene homólogo associado ao glioma 1 (Gli1)*].
- ✓ Correlacionar os níveis transcricionais dos genes [*Sonic hedgehog (Shh)*; *Patched 1 (Ptch-1)*; *Supressor de Fusão (Sufu)* e *Oncogene homólogo associado ao glioma 1 (Gli1)*]. com o estado de metilação da região promotora.

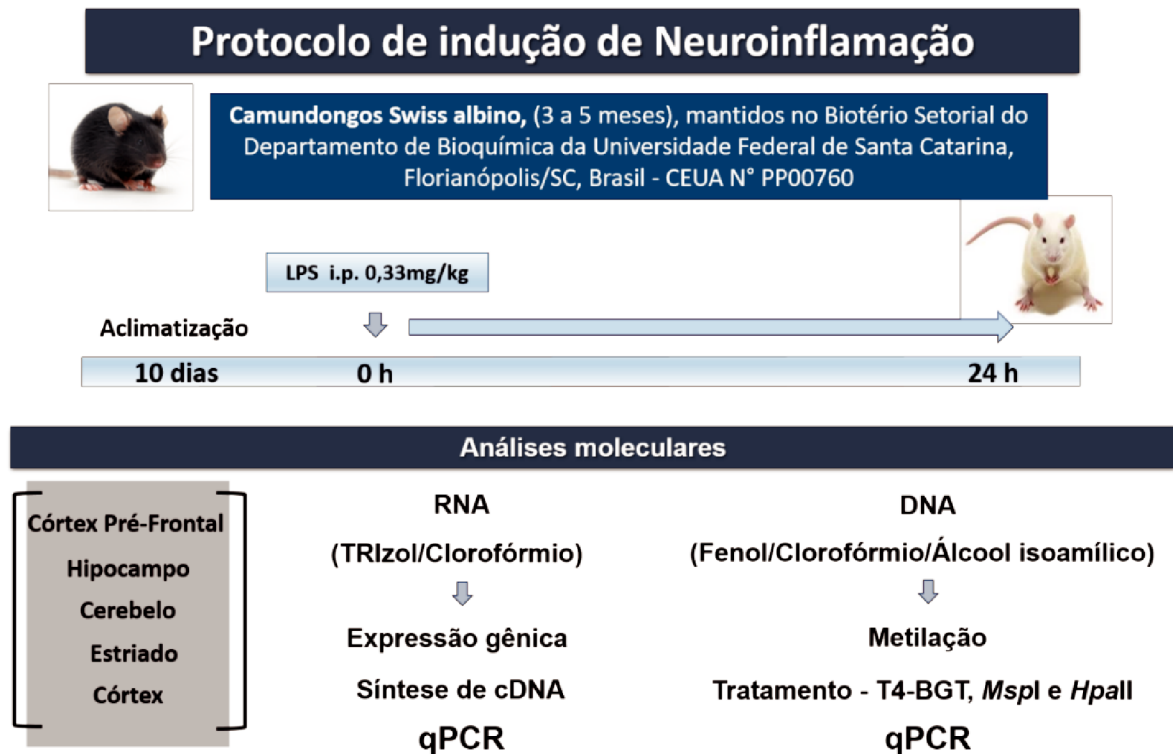
3 JUSTIFICATIVA

A perda lenta e progressiva dos neurônios em certas regiões do cérebro é a principal característica histopatológica presente nas doenças neurodegenerativas associadas principalmente à população da terceira idade. Apesar dos diferentes eventos desencadeantes, uma característica comum entre as doenças neurodegenerativas é a ativação microglial e astrocitária crônica no SNC. Mais recentemente, inúmeros estudos têm demonstrado a importância da sinalização mediada por Shh na resposta do cérebro a danos isquêmicos e neurodegeneração, além de promover a neurogênese e a quiescência da resposta imune em células endoteliais da barreira hematoencefálica pela diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios para o cérebro adulto. Frente a isso, os estudos relacionados ao ligante Shh têm ganhado destaque por se tratar de um modulador importante em tecidos neurais adultos. Desta forma, acreditamos que a identificação do padrão de metilação gene específico dos membros da Via Hedgehog possa contribuir para uma melhor compreensão do real envolvimento dos mecanismos epigenéticos subjacentes ao controle transcricional frente ao fenótipo inflamatório do cérebro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A representação gráfica do modelo experimental utilizado neste trabalho é apresentada na **Figura 2**, como também a indicação das técnicas de biologia molecular utilizadas.

Figura 2. Representação gráfica do modelo experimental



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

4.1 Protocolo de indução de Neuroinflamação *in vivo* – O protocolo de neuroinflamação foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo (LABOX) da Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis/SC com prévia autorização do Comitê de ética e pesquisa em animais (número de protocolo CEUA N° PP00760). Para indução da neuroinflamação foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (3 a 5 meses), os quais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Após 10 dias para aclimatização, a neuroinflamação foi induzida pela administração de injeção única de lipopolissacarídeo (LPS) (0,33mg/kg) na região intraperitoneal (i.p.). Após 24 horas as estruturas cerebrais (córtex, córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo) foram coletadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em Biofreezer (-80°C). As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Taubaté em gelo seco para

preservação da condição térmica e novamente armazenadas em Biofreezer (-80°C) para análises moleculares posteriores.

4.2 Extração de RNA total – O RNA total foi isolado de estruturas cerebrais utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das estruturas em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados e a fase precipitada desprezada. Em seguida o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após a incubação por 10 minutos à temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em 20 µL de água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC), utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a -80°C.

4.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) – O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/µl e armazenado a -20°C.

4.4 Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR - Para o estudo do padrão de expressão gênica das enzimas implicada nos processos de metilação do DNA [DNA metiltransferase (Dnmt1), (Dnmt3a) e (Dnmt3b)] e desmetilação do DNA [dioxigenases dependentes de 2-oxoglurato (2OG) e ferro II (Tet1), (Tet2) e (Tet3)], as reações foram realizadas com iniciadores

específicos (**Tabela 1**) e tiveram como controle endógeno os genes Gapdh e β -actina. Todas as reações tiveram volume final de 10 μ L; contendo 5 μ L de SYBR Green I Master, 0,4 μ M de iniciadores específicos, 1 μ L do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em triplicata. Os valores absolutos foram utilizados para caracterização do perfil transcricional entre as diferentes estruturas cerebrais e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1) para avaliação do efeito da neuroinflamação.

Tabela 1. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequência	Condições de reação	Tamanho do produto (pb)
B-actin (11461)	Forward	TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTG	95°C - 15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	82
	Reverse	AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG		
Gapdh (14433)	Forward	CCG CAG CGA GGA GTT TCT C	95°C - 15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	530
	Reverse	GAG CTA AGC TCA GGC TGT TCC A		
Dnmt1 (13433)	Forward	CCT TTG TGG GAA CCT GGA A	95°C - 15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	178
	Reverse	CTG TCG TCT GCG GTG ATT		
Dnmt3a (13435)	Forward	GAG GGA ACT GAG ACC CCA C	95°C - 15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	216
	Reverse	CTG GAA GGT GAG TCT TGG CA		
Dnmt3b (13436)	Forward	AGC GGG TAT GAG GAG TGC AT	95°C - 15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	72
	Reverse	GGG AGC ATC CTT CGT GTC TG		
Tet1 (52463)	Forward	GAG CCT GTT CCT CGA TGT GG	95°C - 15s; 65°C - 30s; 72°C - 30s	202
	Reverse	CAA ACC CAC CTG AGG CTG TT		
Tet2 (214133)	Forward	AAC CTG GCT ACT GTC ATT GCT CCA	95°C - 15s; 65°C - 30s; 72°C - 30s	182
	Reverse	ATG TTC TGC TGG TCT CTG TGG GAA		
Tet3 (193348)	Forward	GTC TCC CCA GTC CTA CCT CCG	95°C - 15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	136
	Reverse	GTC AGT GCC CCA CGC TTC A		

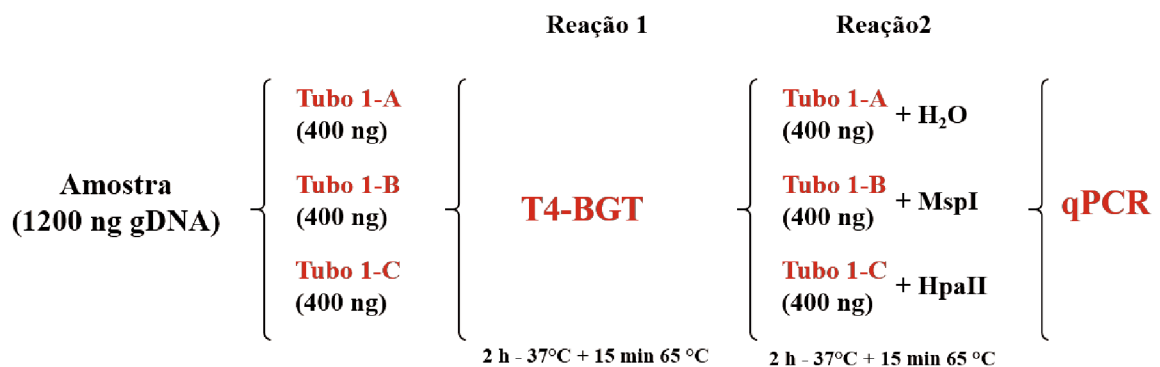
Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

4.5 Obtenção do gDNA – Para obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA) as estruturas foram homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3.0; 0,5% de SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteínase K (20 mg/mL) por 16 h a 56°C. Em seguida o DNA foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ⁽⁷⁰⁾. A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

4.6 Tratamento do gDNA: Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37°C por 2 horas com 1X NE buffer, 40 mM de

glicose UDP e 1 unidade da enzima T4-β-glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μl. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina. Este produto bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo íntegras as regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promovem a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μl a 37°C por 2 horas (**Fig.3**).

Figura 3. Esquema do tratamento do DNA



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

4.7 Determinação do padrão de metilação: O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora dos genes da Via Hedgehog [*Sonic hedgehog (Shh)*; *Patched 1 (Ptch-1)*; *Supressor de Fusão (Sufu)* e *Oncogene homólogo associado ao glioma 1 (Gli1)*] foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (12,5 μl) 0,4 μM de iniciadores específicos (**Tabela 2**), 1,5 μl (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de

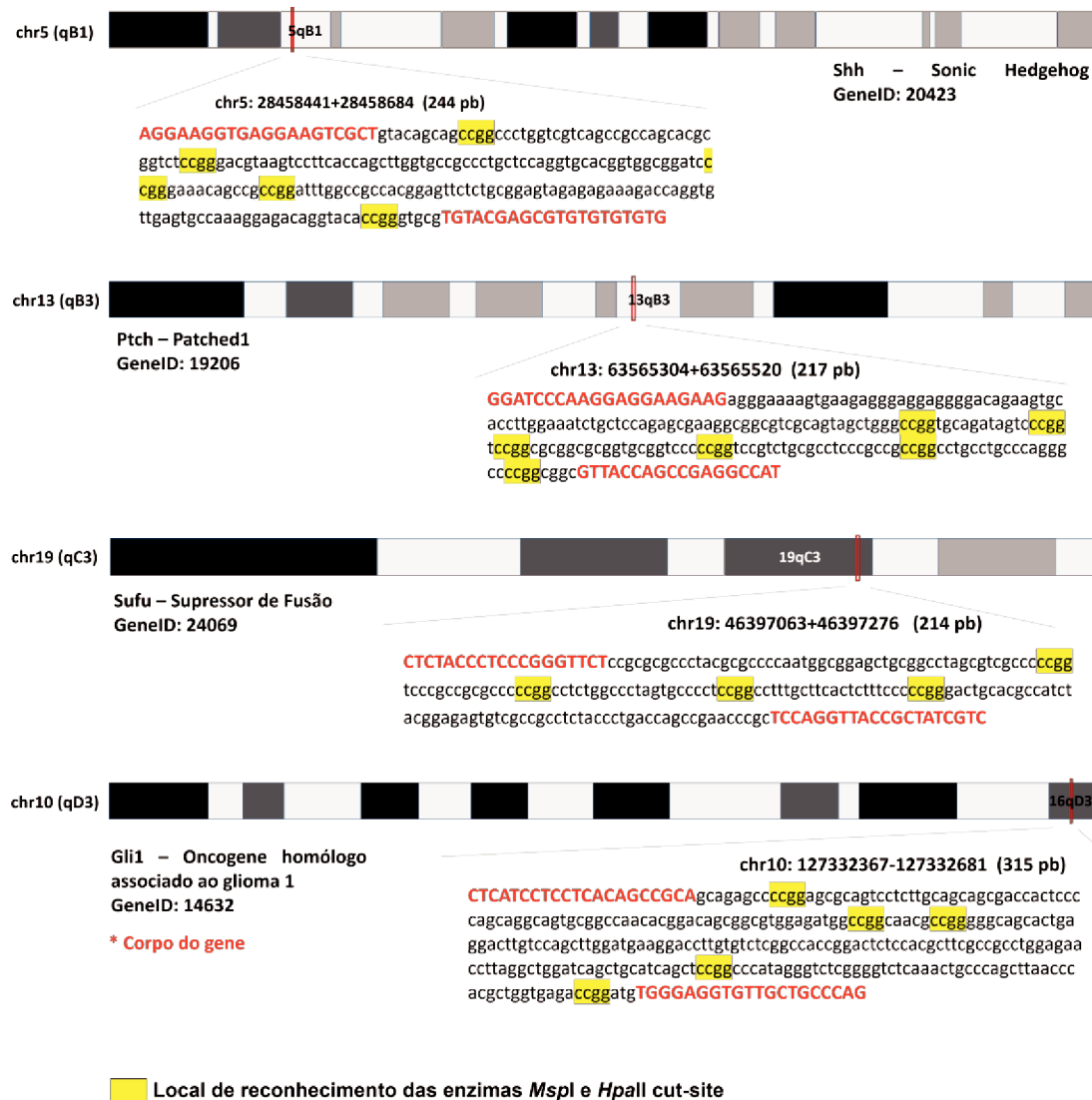
hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição (**Fig. 4**) utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0).⁽⁷¹⁾ A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foi analisada pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). A obtenção dos valores percentuais referentes a metilação e hidroximetilação foram calculados de acordo com Nestor et al., 2012 ⁽⁷²⁾.

Tabela 2. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo de metilação da região promotora

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequência	Condições de reação	Tamanho do produto (pb)	Localização da ilha CpG
Shh (20423)	Forward	AGG AAG GTG AGG AAG TCG CT	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	244	chr 4 28784319-28785746 (site 5)
	Reverse	CAC ACA CAC ACG CTC GTA CA			
Ptch1 (19206)	Forward	GGA TCC CAA GGA GGA AGA AG	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	217	chr 13 63664549-63667490 (site6)
	Reverse	ATG GCC TCG GCT GGT AAC			
Sufu (24069)	Forward	CTC TAC CCT CCC GGG TTC T	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	214	chr 19 46450187-46450655 (site 4)
	Reverse	GAC GAT AGC GGT AAC CTG GA			
Gli (14632)	Forward	CTC ATC CTC CTC ACA GCC GCA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	380	chr 10 127339344-127339723 (site 5)
	Reverse	CTG GGC AGC AAC ACC TCC CA			

Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

Figura 4. Representação gráfica da localização cromossômica e fragmento amplificado. Em vermelho sequências dos iniciadores (*Forward* e *Reverse*), em amarelo sítio de reconhecimento enzimático. **chr** = cromossomo, **pb** = pares de base.



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

4.8 Análise de resultados: Os dados obtidos dos perfis transcricionais para as diferentes estruturas cerebrais obtidas de cinco animais individuais foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. O teste *t-student* foi utilizado para análise dos resultados obtidos após a indução do protocolo de neuroinflamação (Controle *versus* LPS) utilizando o programa o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) com nível de significância de 5%. Todas as análises de qPCR (expressão e metilação) foram realizados em duplicata técnica. Para testar se as alterações epigenéticas promovidas pela neuroinflamação estavam diretamente relacionadas às alterações observadas na expressão gênica dos membros da Via Hedgehog foi aplicado o teste de Correlação de

Pearson (r) entre os valores obtidos para o estado de metilação da região promotora dos componentes da via e os valores de expressão gênica.

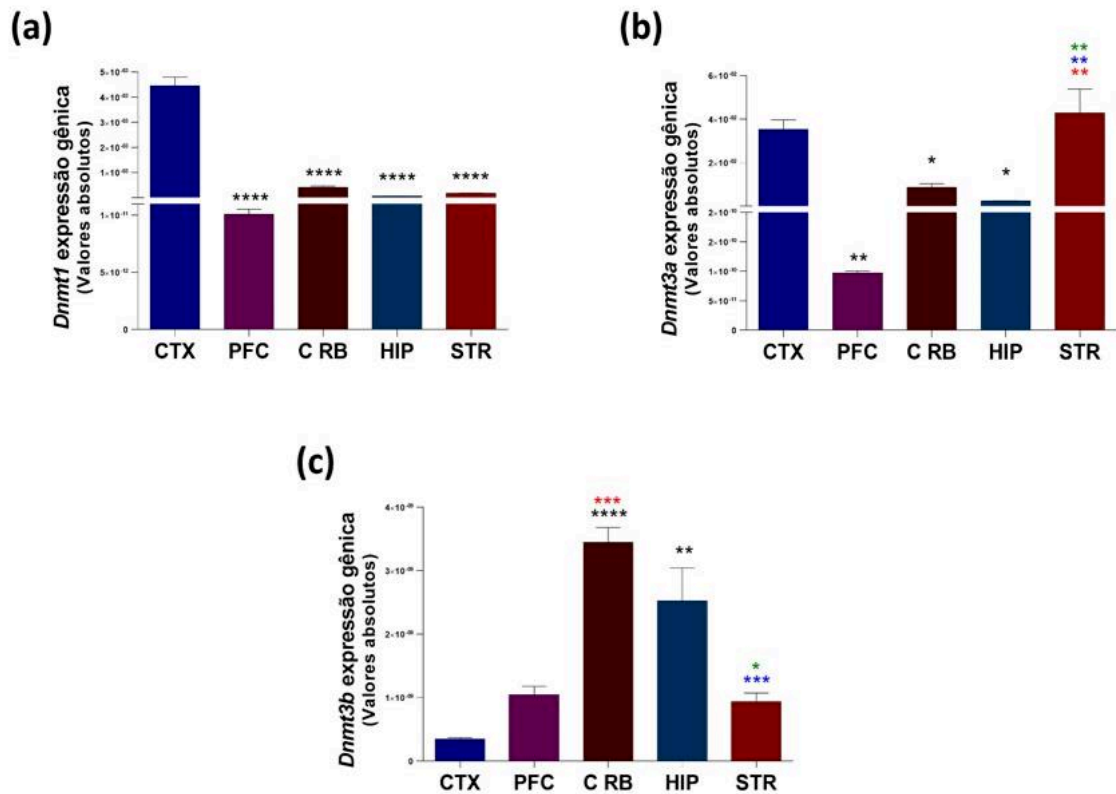
5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil transcricional das enzimas DNMTs e TETs

O perfil transcricional das enzimas DNMTs e TETs foi determinado por reações de RT-qPCR após extração de RNA total como descrito anteriormente na sessão “Material e métodos”. Os resultados da caracterização transcricional das DNMTs apresentados na **Figura 5** mostram que a expressão gênica absoluta da enzima *Dnmt1* do córtex se destaca por apresentar maior quantidade de transcritos em relação as demais estruturas (**Fig. 5a**). Para a *Dnmt3a*, os resultados da caracterização do perfil transcricional revelou que as regiões do córtex e estriado possuem perfil transcricional semelhante e possuem maior quantidade de transcritos que o córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo (**Fig. 5b**). Em relação ao perfil transcricional da *Dnmt3b*, diferenças significativas foram observadas apenas para o cerebelo e hipocampo com valores significativamente maiores em relação as demais estruturas (**Fig. 5c**).

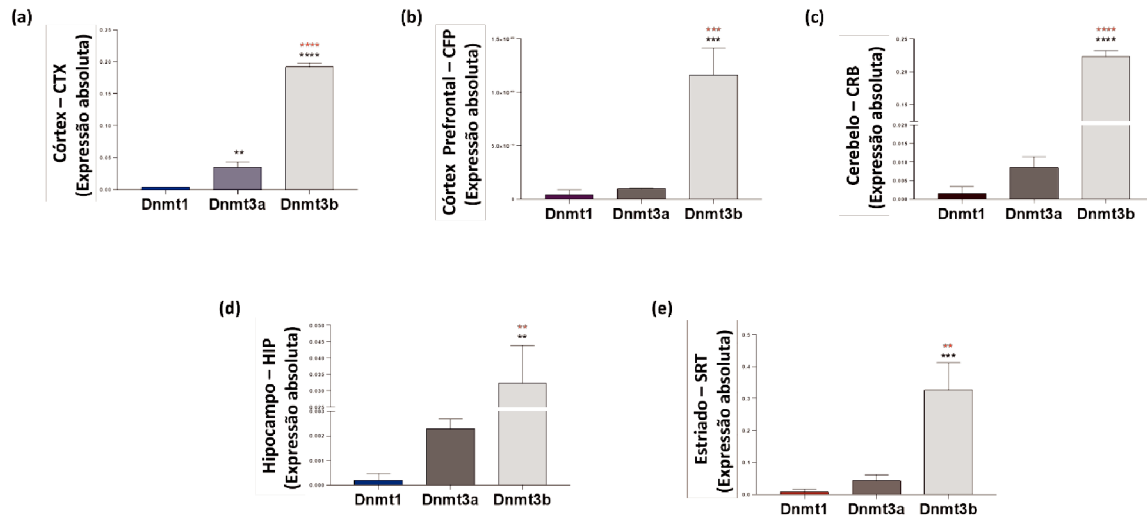
Para determinar se a expressão absoluta basal das DNMTs era diferente em uma mesma região cerebral, os valores da expressão absoluta dos membros da família das DNMTs foram representados graficamente agrupados pelas estruturas cerebrais. Os resultados apresentados na **Figura 6** mostram que a expressão gênica enzima *Dnmt3b* apresenta maior expressão gênica basal em todas as regiões do encéfalo avaliada (**Fig. 6a-e**). Também foi possível observar diferença significativa da expressão gênica basal da *Dnmt3b* no córtex, com maior quantidade de transcritos em relação a expressão basal da *Dnmt1* (**Fig. 6a**).

Figura 5. Determinação do perfil transcricional dos membros da família das DNA metiltransferases no Sistema Nervoso Central. Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional das DNA metiltransferase: *Dnmt1* (a), *Dnmt3a* (b) e *Dnmt3b* (c) foi avaliado por reações de RT-qPCR nas diferentes regiões cerebrais. Os genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. Diferenças estatísticas significantes * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao CTX (Córtex); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao PFC (Córtex Pré-frontal); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao CRB (Cerebelo); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao HIP (Hipocampo)



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

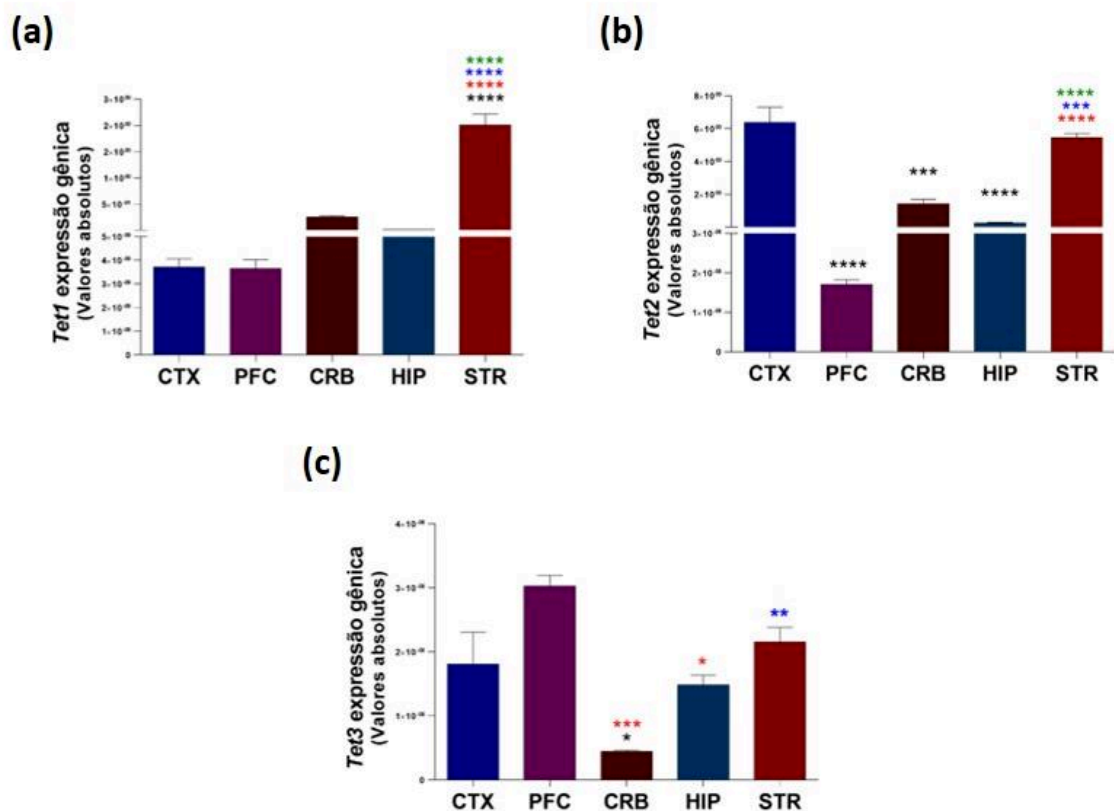
Figura 6. Expressão diferencial entre os membros das DNMTs nas diferentes regiões cerebrais. Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional basal dos membros da família das DNA metiltransferase (*Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*) foi determinado por reações de RT-qPCR no Córtex (a), Córtex Pré-frontal (b), Cerebelo (c); Hipocampo (d) e Estriado (e). Os genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. Diferenças estatísticas significantes * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação a *Dnmt1*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação a *Dnmt3a*



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

Em relação à caracterização do perfil transcricional das DNA desmetilases foi observado diferença significativa apenas na expressão absoluta da enzima *Tet1* no estriado com maior quantidade de transcritos em relação as demais regiões cerebrais (Fig. 7a). A caracterização mostrou que o perfil transcricional da enzima *Tet2* no córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo são semelhantes e possuem menor expressão basal absoluta quando comparado ao córtex e estriado (Fig. 7b). Diferença significativa do perfil transcricional da enzima *Tet3* foi observada apenas na região do cerebelo com menor expressão gênica absoluta em relação as demais regiões cerebrais (Fig. 7c).

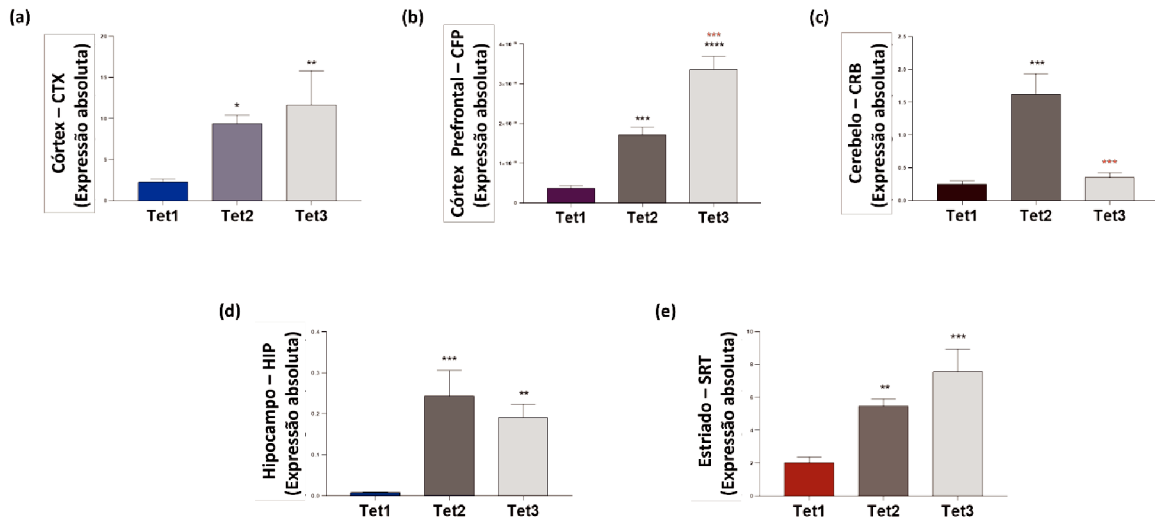
Figura 7. Determinação do perfil transcricional dos membros da família *Ten Eleven Translocation* (TET) no Sistema Nervoso Central. Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional das DNA desmetilases; *Tet1* (a), *Tet2* (b) e *Tet3* (c) foi avaliado por reações de RT-qPCR nas diferentes estruturas cerebrais. Os genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. Diferenças estatísticas significantes * p<0,05; ** p<0,001 e *** p<0,0001 em relação ao CTX (Córtex); * p<0,05; ** p<0,001 e *** p<0,0001 em relação ao CFC (Córtex Pré-frontal); * p<0,05; ** p<0,001 e *** p<0,0001 em relação ao CRB (Cerebelo); * p<0,05; ** p<0,001 e *** p<0,0001 em relação ao HIP (Hipocampo)



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

A representação gráfica dos valores absolutos da expressão basal dos membros da família das TETs em uma mesma região cerebral revelou que *Tet1* é a enzima menos expressa no SNC. Por outro lado, o perfil transcricional basal das DNA desmetilases *Tet2* e *Tet3* possuem perfil transcricional semelhante e são significativamente mais expressas tendo em relação a expressão basal da enzima *Tet1* (Fig. 8a,b - d,e), exceto no cerebelo onde a expressão basal de *Tet2* se destaca por possuir maior quantidade de transcritos em relação a *Tet1* e *Tet3* (Fig. 8c).

Figura 8. Expressão diferencial entre os membros da família das TETs nas diferentes regiões cerebrais. Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional dos membros da família das *Ten Eleven Translocation* (*Tet1*, *Tet2* e *Tet3*) foi determinado por reações de RT-qPCR no Córtex (a), Córtex Pré-frontal (b), Cerebelo (c); Hipocampo (d) e Estriado (e). Os genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. Diferenças estatísticas significantes * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação a *Dnmt1*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação a *Dnmt3a*.



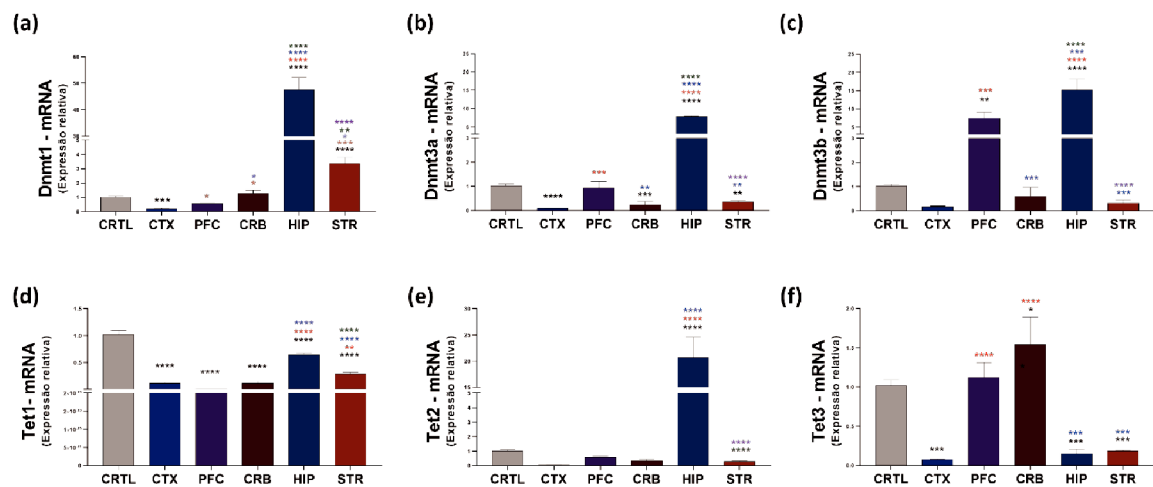
Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

5.2 Avaliação do efeito da neuroinflamação no perfil transcricional das enzimas DNMTs e TETs

Para avaliar se a neuroinflamação influencia o perfil transcricional das enzimas modificadoras do DNA, a expressão gênica dos membros das DNMTs e TETs foi avaliada após 24 horas da administração intraperitoneal de LPS. Conforme mostrado na **Figura 9**, a expressão dos genes reguladores epigenéticos respondeu de forma distinta à neuroinflamação. Em particular, o córtex foi a única região cerebral que teve expressão reduzida de todos os genes modificadores epigenéticos avaliados (**Fig. 9a-f**) e o hipocampo a região que teve a expressão aumentada para todos os membros da família das DNMTs (**Fig. 9a-c**).

Para DNMTs, diferenças significativas ainda foram observadas no estriado (regulação positiva de *Dnmt1*) (**Fig. 9a**); no cerebelo e estriado (regulação negativa de *Dnmt3a*) (**Fig. 9b**) e no córtex pré-frontal (regulação positiva de *Dnmt3b*) (**Fig. 9c**). Em adição, a administração intraperitoneal do LPS afetou a expressão do gene *Tet1* que foi regulada negativamente em todas as regiões cerebrais (**Fig. 9d**). Por outro lado, a expressão de *Tet2* foi aumentada apenas no hipocampo (**Fig. 9e**) e a expressão de *Tet3* diminuiu no córtex, hipocampo e estriado, e aumentou apenas no cerebelo (**Fig. 9f**).

Figura 9. Efeito da neuroinflamação no perfil transcricional dos membros da família das DNMTs e TETs no Sistema Nervoso Central. Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional das DNA metiltransferase; *Dnmt1* (a), *Dnmt3a* (b) e *Dnmt3b* (c) e das DNA desmetilases; *Tet1* (a), *Tet2* (b) e *Tet3* (c) foi avaliado por reações de RT-qPCR nas diferentes estruturas cerebrais após 24 h de administração de LPS (0,33 mg/kg). Os genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. Diferenças estatísticas significantes quando comparadas ao grupo Controle (CRTL) e CTX (Córtex). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao PFC (Córtex Pré-frontal); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao CRB (Cerebelo); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao HIP (Hipocampo); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao STR (Estriado)



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

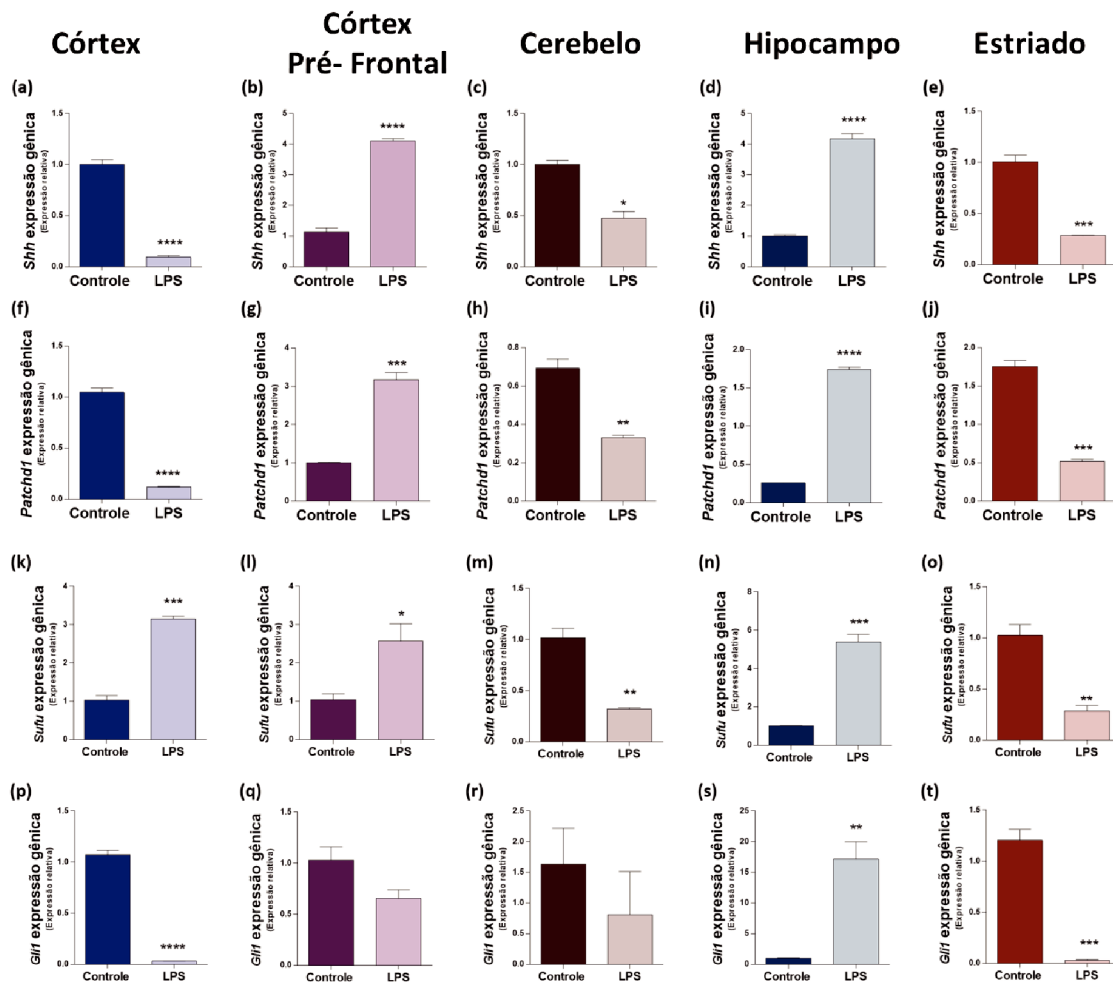
5.3 Avaliação do efeito da neuroinflamação no perfil transcricional dos componentes da Via Hedgehog

A influência da neuroinflamação no controle transcricional dos componentes da Via Hedgehog em diferentes áreas do encéfalo foi avaliada por qPCR. Para isso a expressão dos genes *Shh*, *Ptch1*, *Sufu* e *Gli1* foi avaliada 24 horas após a administração intraperitoneal de LPS. Os resultados apresentados na **Figura 10** mostram que as diferentes regiões cerebrais respondem de forma diferente à neuroinflamação. Foi observado que a expressão dos genes *Shh* e *Ptch1* foi regulada negativamente no córtex cerebral (**Fig. 10a, f**), cerebelo (**Fig. 10c, h**) e estriado (**Fig. 10e, j**) e positivamente no córtex pré-frontal (**Fig. 10b, g**) e hipocampo (**Fig. 10d, i**).

Para o gene *Sufu* nossos resultados mostram que a neuroinflamação promoveu uma regulação negativa da expressão gênica no cerebelo e estriado (**Fig. 10m, o**) e positiva no córtex (**Fig. 10k**), córtex pré-frontal (**Fig. 10l**) e hipocampo (**Fig. 10n**). Ainda diferenças significativas na expressão de *Gli1* foram observadas apenas no córtex, hipocampo e estriado (**Fig. 10p, s, t**).

E uma regulação positiva da expressão do gene *Gli1* foi observado apenas para o hipocampo (Fig. 10s).

Figura 10: Efeito da neuroinflamação na expressão gênica dos componentes da Via Hedgehog. A expressão gênica de Sonic Hedgehog - gene *Shh* (a, b, c, d, e), Patched 1 - gene *Ptch-1* (f, g, h, i, j), Supressor de Fusão - gene *Sufu* (k, l, m, n, o), Oncogene homólogo associado ao glioma 1 - gene *Gli1* (p, q, r, s, t) foram avaliados por reações de RT-qPCR nas diferentes estruturas cerebrais após 24 h de administração de LPS (0,33 mg / kg). Os genes *Gapdh* e β -actina foram usados como normalizadores. Os resultados foram calculados usando o método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica e expressos em relação ao controle (atribuído valor 1)



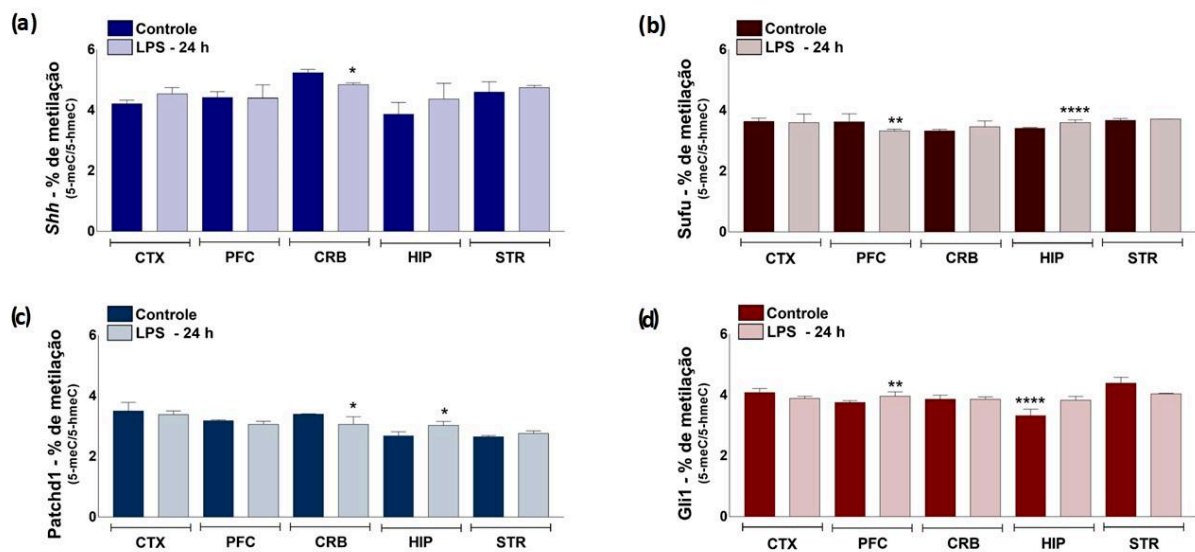
Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

5.4 Impacto da neuroinflamação no estado de metilação da região promotora dos membros da Via Hedgehog

Para avaliar se os componentes da via de Hedgehog foram modificados epigeneticamente em resposta à neuroinflamação, o DNA genômico foi previamente digerido por endonucleases sensíveis à metilação e posteriormente amplificado com iniciadores específicos flanqueados em

regiões regulatórias gênicas contendo sítios de reconhecimento enzimático. Nossos resultados mostram que a neuroinflamação promoveu mudanças significativas no estado de metilação da região promotora dos componentes da via, sendo observado hipometilação da região promotora do gene *Shh* (Fig. 11a) e *Ptch1* (Fig. 11c) no cerebello e do gene *Sufu* no córtex pré-frontal (Fig. 11b). Por outro lado, hipermetilação da região promotora dos genes *Ptchd1* (Fig. 11c), *Sufu* (Fig. 11b) e *Gli1* (Fig. 11d) foi observado no hipocampo.

Figura 11: Determinação do estado de metilação da região promotora dos componentes da Via Hedgehog no Sistema Nervoso Central após 24 horas de indução de protocolo de neuroinflamação. O estado de metilação da região promotora (5-meC/5-hmeC) dos membros Hedgehog [Sonic Hedgehog – gene *Shh* (a), Supressor de fusão - gene *Sufu* (b), Patched 1 - gene *Ptch-1* (c) e Oncogene homólogo associado ao glioma 1 - gene *Gli1* (d)] foram investigados por digestão enzimática com as endonucleases T4-BGT, *MspI* e *HpaII* seguida por análise de qPCR com primers específicos. Os níveis relativos de metilação foram determinados por qPCR usando o método do limiar de ciclo (Ct). Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo $Ct [HpaII] - Ct [MspI] / Ct [SE]$ e os valores de hidroximetilação (5-hmeC) pelo $Ct [MspI] / Ct [SE]$. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão da razão 5-meC/5hmeC de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao controle específico

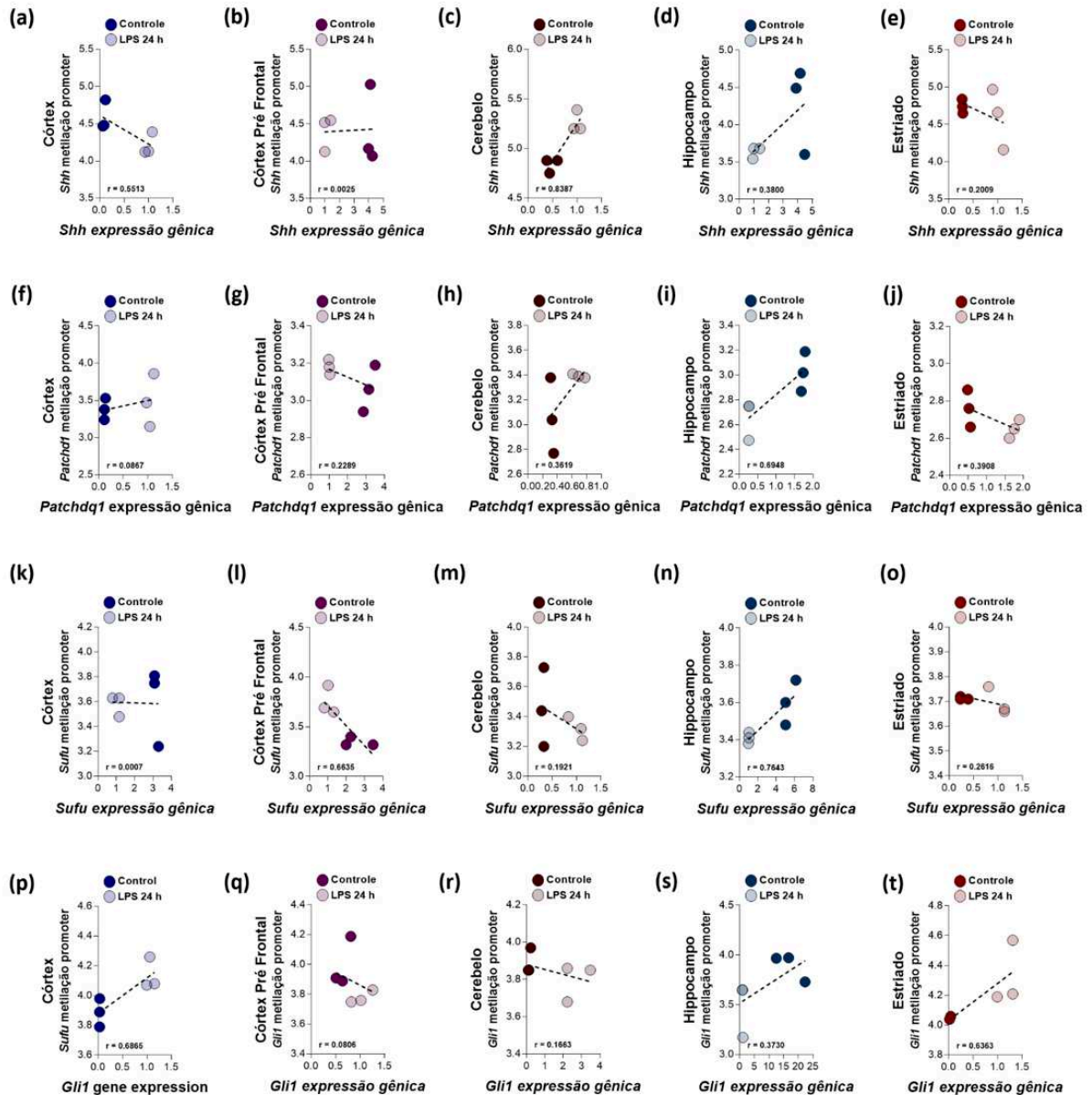


Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

Para testar se as alterações epigenéticas promovidas pela neuroinflamação estavam diretamente relacionadas às alterações observadas na expressão gênica dos membros da Via Hedgehog foi aplicado o teste de correlação de Pearson entre os valores obtidos para o estado de metilação da região promotora dos componentes da via e os valores de expressão gênica. Correlações de Pearson acima de $r \geq 0,6$ foram observadas para *Shh* no cerebello (Fig. 12c), *Ptch1* no hipocampo (Fig. 12i), *Sufu* no córtex pré-frontal (Fig. 12l) e hipocampo (Fig. 12n), e *Gli1* no córtex (Fig. 12p) e estriado (Fig. 12t). No entanto, apenas para o gene *Sufu* no córtex pré-frontal os níveis de mRNA são inversamente proporcionais à metilação da região

promotora, sugerindo que a hipometilação do DNA promovida pela neuroinflamação é um dos mecanismos responsáveis pela regulação transcricional positiva do gene *Sufu* (Fig. 12).

Figura 12: Representação gráfica da correlação entre o estado de metilação da região promotora e a expressão dos componentes da Via Hedgehog: *Shh* (a-e), *Ptch1* (f-j), *Sufu* (k-o) e *Gli1* (p-t). Os níveis de metilação relativos foram apresentados como uma razão 5-mec/5-hmec e determinados usando o método do limiar de ciclo (Ct). Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão da razão 5-mec/5hmec de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao controle específico. Correlação de Pearson positiva significativa entre $r = 0,6$ e $r = 1$



Fonte: Rodrigo Augusto da Silva e Mariana Ribeiro Costa

6 DISCUSSÃO

Primeiramente, é importante dizer que os resultados deste trabalho complementam um outro projeto intitulado “Efeitos de Neuroinflamação sobre a Sinalização mediada por Sonic Hedgehog no Sistema Nervoso Central de camundongos adultos” desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Neuroinflamação do Laboratório CEPEO da Universidade de Taubaté. Cabe ressaltar que a caracterização do efeito neuroinflamatório da administração intraperitoneal do LPS foi realizada anteriormente e os resultados encontrados confirmam o efeito neuroinflamatório da administração periférica do LPS e corroboram com os resultados da literatura de que a administração intraperitoneal do LPS de 0,33 mg/kg promove o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC. ⁽⁷³⁾

Na última década cresceu significativamente o número de trabalhos publicados a respeito dos mecanismos neuroepigenéticos, principalmente no que diz respeito à função do SNC em adultos. ⁽⁷⁴⁾ Estes estudos têm contribuído substancialmente para o entendimento da fisiologia neuronal básica e revelado importantes associações entre as alterações neuroepigenéticas e o desenvolvimento de distúrbios neurológicos, ⁽⁷⁵⁾ relacionando neuroinflamação como fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. ⁽¹⁰⁾ Neste sentido se faz de grande relevância a caracterização transcricional dos genes das enzimas modificadoras do DNA como também avaliar o efeito da neuroinflamação em sua expressão.

A caracterização transcricional dos genes das enzimas modificadoras do DNA realizado neste estudo revelou um perfil transcricional basal diferencial entre as diferentes regiões cerebrais entre a maioria das enzimas avaliada. Entretanto, a *Dnmt3b* foi a enzima mais expressa em todas as regiões cerebrais. Estes resultados nos faz acreditar que a elevada expressão basal observada esteja relacionada principalmente com sua capacidade de metilação *de novo*, necessária para a rápida regulação transcricional dos genes neuronais durante a maturação neuronal e plasticidade sináptica, ⁽⁴⁵⁾ uma vez que já foi demonstrado que sua atividade é necessária para ativação dos programas de neurogênese e gliogênese no cérebro adulto. ^(45,47) Em relação ao perfil transcricional semelhante encontrado para *Dnmt1* entre as estruturas e a baixa expressão da enzima *Dnmt3a*, nossos resultados, corroboram com estudos publicados que mostraram que o fato do cérebro estar em um constante estado pós-mitótico, a expressão do gene *Dnmt1* permanece detectável e com poucas variações em sua expressão no cérebro adulto devido a sua função crítica para manutenção dos padrões de metilação do DNA em células em divisão. ^(48,49) Já a expressão de *Dnmt3a* é elevada durante as fases pós-natais

iniciais e drasticamente reduzida nos neurônios corticais na fase adulta. ⁽⁴⁶⁾

Um crescente corpo de evidências tem sugerido que o equilíbrio dinâmico entre a metilação do DNA no cérebro adulto é crucial para manutenção das funções cerebrais. ⁽⁷⁶⁾ Neste cenário, a ação das enzimas TETs, responsáveis pela conversão da 5-meC em 5-hmeC, tem adquirido cada vez mais destaque em estudos relacionados aos processos neurais. ⁽⁷⁷⁾ Neste estudo a enzima Tet3 se destacou por ser a enzima mais expressa em todas as regiões cerebrais. Nosso resultado está de acordo com estudo de Szwagierczak e colaboradores publicado em 2010, que demonstrou que no cérebro adulto a enzima Tet3 é o membro da família das TETs mais abundante no cerebelo, córtex e hipocampo. ⁽⁵⁹⁾ Estudos mostram que Tet1 e Tet3 possuem funções semelhantes no controle dos níveis de 5-hmeC de regiões promotora gênica, o que poderia justificar em parte, a baixa expressão observada nas estruturas cerebrais neste estudo para *Tet1*, tendo em vista a elevada expressão de *Tet3*.

Por outro lado, a elevada expressão de Tet2 no cerebelo ainda é um campo que deve ser melhor estudado, pois até o momento sua função no cérebro adulto ainda não foi descrita. Entretanto, estudos mecanísticos já relataram que Tet2 diferentemente de Tet1 e Tet3, regula principalmente os níveis de 5-hmeC no corpo dos genes e não em região promotora. ⁽⁵⁸⁾ Também foi relatado que Tet2 parece proteger o SNC do declínio relacionado à idade contribuindo para a manutenção da neurogênese hipocampal e aumentando a cognição de camundongos adultos. ⁽⁷⁸⁾ Frente às informações expostas, nossas conclusões referentes ao perfil transcricional de Tet2 no cerebelo são limitadas devido principalmente ao reduzido número de estudo a respeito de sua função nesta região.

Após a caracterização do perfil transcricional dos genes modificadores do DNA a próxima etapa deste estudo foi avaliar se a neuroinflamação poderia modular o perfil transcricional destas enzimas. Em relação às DNMTs, a região do hipocampo foi a estrutura mais sujeita às alterações da expressão gênica após a indução do processo neuroinflamatório, respondendo com um expressivo aumento para os três membros desta família. Estudos já mostram que a expressão de *Dnmt3a* e *Dnmt3b* é aumentada na região dorso-ventral do hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos em resposta a quadros de neuroinflamação ⁽⁷⁹⁾ e que a inibição de *Dnmt1* contribui para a recuperação de déficits cognitivos relacionados à consolidação da memória pelo aumento da expressão de genes de plasticidade sináptica como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). ⁽⁸⁰⁾ Desta forma, acreditamos que o aumento da expressão das DNMTs, em especial da *Dnmt1* observado no hipocampo e estriado em nossos resultados, está relacionado aos déficits cognitivos promovidos pela neuroinflamação relatados em inúmeros

trabalhos na literatura. ^(81,82)

A descoberta da família de enzimas DNA demetilases (TETs) possibilitou um grande avanço na compreensão das modificações epigenéticas do DNA. Sua associação, assim como a marca 5-hmeC com regiões regulatórias ativas do genoma tem sido estudada extensivamente. ⁽⁸³⁾ Curiosamente, nosso estudo revelou que dentre os três membros da família das TETs estudado, apenas a expressão gênica da *Tet2*, no hipocampo e *Tet3* no cerebelo foram reguladas positivamente pela neuroinflamação. Neste sentido, é importante destacar que já foi demonstrado que *Tet2* regula a resposta pró-inflamatória na microglia de camundongos injetados intraperitonealmente com LPS ⁽⁸⁴⁾ e *Tet3* está intimamente relacionada com as alterações moleculares que governam as funções dependentes do hipocampo. ⁽⁸⁵⁾ Por outro lado, a neuroinflamação promoveu redução da expressão gênica de *Tet1* em todas as regiões cerebrais e de *Tet3* somente no córtex, hipocampo e estriado. Acreditamos que a diferença de resposta observada na expressão de *Tet3* entre o córtex, hipocampo e estriado em relação ao cerebelo possa ser devido às funções específicas de cada região cerebral, visto que um estudo mostrou que *Tet3* é altamente expressa no cérebro, principalmente em neurônios maduros e oligodendrócitos e ausentes em astrócitos. ⁽⁶⁴⁾ Ainda não podemos ignorar o fato de que os elevados níveis de expressão das TETs observados no SNC tem sido relacionado ao aumento dos níveis de 5-hmeC observados no cerebelo e regiões hipocampais durante o envelhecimento parece estar relacionado à manutenção da plasticidade neuronal ^(62,63) e regulação de diferentes vias neuroprotetoras. ⁽⁸⁶⁾

Dentre inúmeras vias neuroprotetora a Via Hedgehog se destaca por atuar como um sinal antienvelhecimento, protegendo os neurônios contra EROs e citocinas pró-inflamatórias ⁽³⁰⁾ e também tem sido associada à manutenção da integridade da barreira hematoencefálica no cérebro adulto. ⁽⁸⁷⁾ Uma descoberta particularmente interessante deste estudo foi que além da neuroinflamação promover mudança no perfil transcricional das enzimas modificadoras de DNA foi a constatação de que a expressão gênica dos diferentes membros da via responderam de forma semelhante à neuroinflamação independente da região do cérebro. Acreditamos que o aumento na expressão gênica dos membros da via e sua possível ativação observada no córtex pré-frontal e hipocampo após a indução da neuroinflamação faça parte do mecanismo neuroprotetor uma vez que já foi demonstrado que a ativação da via pelo uso de purmorfamina funcionou como um mecanismo protetor do SNC em um modelo de Acidente Vascular Cerebral isquêmico. ⁽⁸⁸⁾ Por outro lado, a redução na expressão gênica dos membros da via e sua inibição no córtex, cerebelo e estriado poderia contribuir para o bloqueio dos mecanismos

neuroprotetores deixando estas regiões cerebrais mais suscetíveis aos danos neurotóxicos da neuroinflamação. ⁽⁸⁹⁾ Estes resultados, em especial, são inéditos e merecem mais atenção, principalmente no que se diz respeito aos mecanismos subjacentes ao controle transcricional dos membros da via.

Em relação aos possíveis mecanismos moleculares envolvidos no controle transcricional dos membros da Via Hedgehog, a metilação do DNA se destaca por atuar como uma barreira física na região promotora gênica ao reconhecimento dos fatores de transcrição. Curiosamente não podemos afirmar que toda mudança no perfil transcricional das enzimas modificadoras de DNA promovida pela neuroinflamação refletiu diretamente em mudanças significativas no estado de metilação da região promotora dos membros da Via Hedgehog. Os eventos de hipo e hipermetilação observados nas regiões promotoras dos genes dos membros da via não correlacionaram inversamente a expressão gênica. Exceto para o gene *Sufu* no córtex pré-frontal onde a neuroinflamação promoveu uma hipometilação acompanhada pelo aumento da expressão gênica. Repressão transcricional dos membros da via mediado pela metilação da região promotora regulatória da proteína Shh e seus demais membros já foi relatada e diferentes artigos relacionados a progressão tumoral. ^(67,68,69) Contudo, o fato deste estudo ter sido pioneiro, tanto no que diz respeito a caracterização do perfil transcricional das enzimas moduladoras epigenéticas, quanto a determinação do efeito da neuroinflamação no controle transcricional dos membros da Via Hedgehog no Sistema Nervoso Central, limita nossas conclusões e reforça ainda mais a importância da realização de estudos futuros.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o perfil transcricional basal das enzimas modificadoras do DNA é diferente entre as regiões cerebrais e que a neuroinflamação influencia de forma distinta a expressão gênica das DNMTs e TETs das estruturas encefálicas estudadas. Em relação ao efeito da neuroinflamação no controle transcricional dos membros da Via Hedgehog, as semelhanças de resposta observadas entre a expressão gênica dos quatro membros sugerem que o efeito da neuroinflamação está associado à região encefálica específica e que a metilação do DNA foi responsável apenas pelo controle transcricional do gene *Sufu* na região do córtex pré-frontal. Desta maneira, este estudo apresenta resultados inéditos e relevantes cientificamente, pois é o primeiro a caracterizar o perfil transcricional basal das enzimas DNMTs e TETs no SNC e o efeito da neuroinflamação mediando o controle transcricional dos membros da Via Hedgehog no cérebro adulto, contribuindo de forma abrangente para o conhecimento da neuroepigenética. Além disso, a caracterização molecular do efeito da neuroinflamação no perfil transcricional dos membros da Via Hedgehog e a realização de estudos mecanísticos futuros possibilitarão a busca por novos alvos biológicos para o desenvolvimento de tratamentos neuroprotetores.

REFERÊNCIAS

1. Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, et al. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. *J Biol Chem.* 2004 Sep;279(36):37982–96.
2. Ren P, Mestrado R, Celular B. INSTITUTO OSWALDO CRUZ Centro de Pesquisa René Rachou Mestrado em Biologia Celular e Molecular. *Biologia (Bratisl).* 2005;
3. Lima RR, Costa AMR, Souza RD de, Gomes-Leal W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev Para Med.* 2007;21(2):29–34.
4. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000 Sep;62(1):63–88.
5. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011 Jan;7(1):31–40.
6. Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol.* 2017 Dec;54(10):8071–89.
7. Norris GT, Kipnis J. Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *J Exp Med.* 2019 Jan;216(1):60–70.
8. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014 Apr;508(7494):55–60.
9. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* 2009;132(2):288–95.
10. Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ.* 2009 Feb;338:b158.
11. Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012 Feb;36(2):764–85.
12. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 2010 Feb;129(2):154–69.
13. Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:674987.
14. Toyoda Y, Erkut C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Muller DJ, et al. Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biol Open.* 2014 Jul;3(8):777–84.
15. Alvarez-Buylla A, Ihrie RA. Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Sep;33:105–11.
16. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008 Sep;22(18):2454–72.
17. Fattahi S, Pilehchian Langroudi M, Akhavan-Niaki H. Hedgehog signaling pathway:

- Epigenetic regulation and role in disease and cancer development. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):5726–35.
18. Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(38):14134–9.
 19. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001 Dec;15(23):3059–87.
 20. Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 1997 Jan;13(1):14–21.
 21. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development.* 2002 Oct;129(20):4753–61.
 22. Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, Yoshida M, Hui C. Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation.* 2005 Oct;73(8):397–405.
 23. Tukachinsky H, Lopez L V, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J Cell Biol.* 2010 Oct;191(2):415–28.
 24. Bambakidis NC, Petrullis M, Kui X, Rothstein B, Karampelas I, Kuang Y, et al. Improvement of neurological recovery and stimulation of neural progenitor cell proliferation by intrathecal administration of Sonic hedgehog. *J Neurosurg.* 2012 May;116(5):1114–20.
 25. Traiffort E, Charytoniuk DA, Faure H, Ruat M. Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothed mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem.* 1998 Mar;70(3):1327–30.
 26. Dashti M, Peppelenbosch MP, Rezaee F. Hedgehog signalling as an antagonist of ageing and its associated diseases. *Bioessays.* 2012 Oct;34(10):849–56.
 27. Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo J-M, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2008 Mar;11(3):277–84.
 28. Singh PK, Marzo A, Howard B, Rufenacht DA, Bijlenga P, Frangi AF, et al. Effects of smoking and hypertension on wall shear stress and oscillatory shear index at the site of intracranial aneurysm formation. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010 May;112(4):306–13.
 29. Yao PJ, Petralia RS, Mattson MP. Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity. *Trends Neurosci.* 2016 Dec;39(12):840–50.
 30. Lauth M. Sonic the Hedgehog: A game about aging? Emerging evidence for anti-geriatric effects of Hedgehog signaling (retrospective on DOI 10.1002/bies.201200049). *Bioessays.* 2014 Dec;36(12):1128.
 31. Dai R-L, Zhu S-Y, Xia Y-P, Mao L, Mei Y-W, Yao Y-F, et al. Sonic hedgehog protects cortical neurons against oxidative stress. *Neurochem Res.* 2011 Jan;36(1):67–75.
 32. Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, et al. Persistent

- sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron*. 2011 Jul;71(2):250–62.
33. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011 Dec;334(6063):1727–31.
 34. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, et al. Interleukin-1beta induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One*. 2014;9(10):e110024.
 35. Tang W, Ho S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Jun;8(2):173–82.
 36. Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan;98(2):392–4.
 37. Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:229–49.
 38. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 May;123(19):2145–56.
 39. Szyf M. The Dynamic Epigenome and its Implications in Toxicology. 2007;100(1):7–23.
 40. Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*. 1997;270(3):385–95.
 41. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23–38.
 42. Cui D, Xu X. Dna methyltransferases, dna methylation, and age-associated cognitive function. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
 43. Tiedemann RL, Putiri EL, Lee J-H, Hlady RA, Kashiwagi K, Ordog T, et al. Acute depletion redefines the division of labor among DNA methyltransferases in methylating the human genome. *Cell Rep*. 2014 Nov;9(4):1554–66.
 44. He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011 Sep;333(6047):1303–7.
 45. Feng J, Chang H, Li E, Fan G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2005 Mar;79(6):734–46.
 46. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem*. 1987 Jul;262(21):9948–51.
 47. Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu R-H. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics*. 2012 Jan;7(1):71–82.
 48. Edwards JR, Yarychkivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*. 2017;10:23.

49. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2011 Jan;12(2):206–22.
50. Antunes C, Sousa N, Pinto L, Marques CJ. TET enzymes in neurophysiology and brain function. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019 Jul;102:337–44.
51. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011;145(3):423–34.
52. Kaas GA, Zhong C, Eason DE, Ross DL, Vachhani R V., Ming G li, et al. TET1 controls CNS 5-Methylcytosine Hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*. 2013;79(6):1086–93.
53. Cadet J, Wagner JR. TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;764–765:18–35.
54. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011 Sep;333(6047):1300–3.
55. Zhang P, Huang B, Xu X, Sessa WC. Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(3):368–73.
56. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013 Oct;502(7472):472–9.
57. Xu Y, Xu C, Kato A, Tempel W, Abreu JG, Bian C, et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*. 2012 Dec;151(6):1200–13.
58. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen J V, Cloos PAC, Rappsilber J, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*. 2011 May;473(7347):343–8.
59. Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*. 2010 Oct;38(19):e181.
60. Mi Y, Gao X, Dai J, Ma Y, Xu L, Jin W. A Novel Function of TET2 in CNS: Sustaining Neuronal Survival. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep;16(9):21846–57.
61. Münzel M, Globisch D, Brückl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakis S, et al. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Jul;49(31):5375–7.
62. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song C-X, Wu H, Dai Q, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*. 2011 Oct;14(12):1607–16.
63. Davis T, Vaisvila R. High sensitivity 5-hydroxymethylcytosine detection in Balb/C brain tissue. *J Vis Exp*. 2011 Feb;(48).
64. Yu H, Su Y, Shin J, Zhong C, Guo JU, Weng Y-L, et al. Tet3 regulates synaptic transmission and homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair. *Nat Neurosci*.

- 2015 Jun;18(6):836–43.
65. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul;18(13):3975–82.
 66. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998 May;393(6683):386–9.
 67. Wils LJ, Bijlsma MF. Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Jan;121:23–44.
 68. Shahi MH, Afzal M, Sinha S, Eberhart CG, Rey JA, Fan X, et al. Regulation of sonic hedgehog-GLI1 downstream target genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and their epigenetic status in medulloblastoma and astrocytoma. *BMC Cancer.* 2010 Nov;10:614.
 69. Shahi MH, Zazpe I, Afzal M, Sinha S, Rebhun RB, Melendez B, et al. Epigenetic regulation of human hedgehog interacting protein in glioma cell lines and primary tumor samples. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2383–91.
 70. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000 Jun;18(1):6–9.
 71. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e115.
 72. Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, et al. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* 2012 Mar;22(3):467–77.
 73. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, Haes P De, et al. Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice. 2013;(July).
 74. Sweatt JD. The emerging field of neuroepigenetics. *Neuron.* 2013 Oct;80(3):624–32.
 75. Christopher MA, Kyle SM, Katz DJ. Neuroepigenetic mechanisms in disease. *Epigenetics Chromatin.* 2017 Oct;10(1):47.
 76. Tognini P, Napoli D, Pizzorusso T. Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:331.
 77. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell.* 2011 Sep;146(6):866–72.
 78. Gontier G, Iyer M, Shea JM, Bieri G, Wheatley EG, Ramalho-Santos M, et al. Tet2 Rescues Age-Related Regenerative Decline and Enhances Cognitive Function in the Adult Mouse Brain. *Cell Rep.* 2018 Feb;22(8):1974–81.
 79. Sales AJ, Joca SRL. Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 2018;343(October 2017):8–15.
 80. Singh P, Konar A, Kumar A, Srivas S, Thakur MK. Hippocampal chromatin-modifying enzymes are pivotal for scopolamine-induced synaptic plasticity gene expression

- changes and memory impairment. *J Neurochem.* 2015 Aug;134(4):642–51.
81. Imbeault S, Goiny M, Liu X, Erhardt S. Effects of IDO1 and TDO2 inhibition on cognitive deficits and anxiety following LPS-induced neuroinflammation. *Acta Neuropsychiatr.* 2020 Feb;32(1):43–53.
 82. Peyton L, Oliveros A, Tufvesson-Alm M, Schwieler L, Starski P, Engberg G, et al. Lipopolysaccharide Increases Cortical Kynurenic Acid and Deficits in Reference Memory in Mice. *Int J Tryptophan Res.* 2019;12:1178646919891169.
 83. Melamed P, Yosefzon Y, David C, Tsukerman A, Pnueli L. Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Front cell Dev Biol.* 2018;6:22.
 84. Carrillo-Jimenez A, Deniz Ö, Niklison-Chirou MV, Ruiz R, Bezerra-Salomão K, Stratoulas V, et al. TET2 Regulates the Neuroinflammatory Response in Microglia. *Cell Rep.* 2019 Oct;29(3):697-713.e8.
 85. Antunes C, Da Silva JD, Guerra-Gomes S, Alves ND, Ferreira F, Loureiro-Campos E, et al. Tet3 ablation in adult brain neurons increases anxiety-like behavior and regulates cognitive function in mice. *Mol Psychiatry.* 2020 Feb;
 86. Morris-Blanco KC, Chokkalla AK, Bertogliati MJ, Vemuganti R. TET3 regulates DNA hydroxymethylation of neuroprotective genes following focal ischemia. *J Cereb blood flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2020 May;271678X20912965.
 87. Bohannon DG, Ko A, Filipowicz AR, Kuroda MJ, Kim W-K. Dysregulation of sonic hedgehog pathway and pericytes in the brain after lentiviral infection. *J Neuroinflammation.* 2019 Apr;16(1):86.
 88. Liu D, Bai X, Ma W, Xin D, Chu X, Yuan H, et al. Purmorphamine Attenuates Neuro-Inflammation and Synaptic Impairments After Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Mice via Shh Signaling. *Front Pharmacol.* 2020;11:204.
 89. Yin S, Bai X, Xin D, Li T, Chu X, Ke H, et al. Neuroprotective Effects of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Ischemic Injury through Promotion of Synaptic and Neuronal Health. *Neural Plast.* 2020;2020:8815195.