

UNIVERSIDADE PAULISTA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO E
TRATADOS COM RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ALADIM GOMES LAMEIRA JÚNIOR

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE PAULISTA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO E
TRATADOS COM RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Carleto Andia

ALADIM GOMES LAMEIRA JÚNIOR

São Paulo

2017

Lameira Júnior, Aladim Gomes.

Regulação epigenética em ratos expostos à fumaça do cigarro e tratados com resveratrol. / Aladim Gomes Lameira Júnior. - 2017.

18 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilofacial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Denise Carleto Andia.

1. Epigenoma. 2. Metilcitosina dioxigenase. 3. Expressão genética. 4. Ratos. I. Andia, Denise Carleto (orientadora). II. Título.

ALADIM GOMES LAMEIRA JÚNIOR

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO E
TRATADOS COM RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof(a). Dr(a). Denise Carleto Andia.

Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof(a) Dr(a) Suzana Peres Pimentel

Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof(a). Dr.(a) Gabriela Giro

Universidade de Guarulhos – UNG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família: minha esposa Ligia Buarque e Silva e minhas filhas, Isabela Buarque e Silva e Laura Buarque e Silva Lameira, por terem me acompanhado e apoiado nessa jornada difícil e cheia de contratempos. Por conta disso, elas têm toda a minha gratidão e meu amor eternos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado forças suficientes para suportar essa jornada, pois por diversas vezes pensei em desistir devido às dificuldades enfrentadas.

Agradeço aos meus pais, Vera Lúcia Pacheco Lameira e Aladim Gomes Lameira, pela educação e dedicação integral para que a minha formação fosse a melhor.

Agradeço a todos os mestres e profissionais que tive o privilégio de conhecer e de atuar como cirurgião buco-maxilo-facial, os quais contribuíram imensamente para a minha formação.

Agradeço aos amigos e colegas da pós-graduação, Danilo Pino, Felipe Franck Calile, Felipe Fonseca, Renata Moura, Nancy Peçanha, Roberto Piteri, Daniel Galafasi, Juliana Lisboa, Rodrigo Salazar e Fernanda Kabadayan, pelo prazer de tê-los conhecido e pela amizade cultivada. Ainda agradeço à Michele Sanchez pela paciência que teve comigo no laboratório e pela disposição ao ajudar, para que o trabalho tivesse os resultados obtidos.

Agradeço à todos os alunos da graduação que fizeram parte do trabalho, através do projeto de iniciação científica. Aos funcionários do biotério que realizaram um trabalho de dedicação oferecendo as melhores condições para que o trabalho tivesse sucesso.

Agradeço, imensamente aos professores da disciplina de Periodontia, Prof(a) Dr(a) Fernanda Ribeiro, Prof(a) Dr(a) Suzana Pimentel, Prof. Dr. Márcio Cassati, Prof. Dr. Fabiano, Prof. Dr. Renato Casarin. Eles foram os idealizadores do projeto de pesquisa que deu origem ao meu trabalho. Sem a permissão deles não seria possível concluir meu mestrado.

Agradeço à Prof. (a). Cintia Saraceni, coordenadora do programa de pós-graduação, por sempre estar disposta a conversar ouvir os anseios e a necessidades dos alunos, além de gerir com sucesso o programa de pós-graduação da UNIP-SP.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora, Profa. Dra. Denise Carleto Andia, pela extrema paciência que teve comigo durante estes dois anos. Sem ela não teria conseguido concluir o trabalho por ela proposto, por isso serei eternamente grato.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 PROPOSIÇÃO.....	10
3 CONCLUSÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS.....	12
ANEXOS	16

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é considerado uma epidemia global, atingindo cerca de 1,1 bilhão de pessoas. Em 2013, sua prevalência era de 25% nos adultos dos países de alta renda, 21% nos adultos dos países de média renda e 16% nos adultos dos países de baixa renda (World Health Organization, 2015).

A fumaça do cigarro tem milhares de componentes que são impactantes à saúde de modo geral, e esses elementos nocivos alteram a fisiologia do osso. Foi sugerido que o tabagismo aumenta a remodelação óssea e diminui a densidade do osso (Gao *et al.*, 2011).

Os componentes da fumaça do cigarro exercem essa influência nociva sobre a fisiologia óssea porque muitos deles se ligam a um receptor denominado hidrocarboneto arilo (Ahr) (Ilvesaro *et al.*, 2005; Iqbal *et al.*, 2013), que é um fator de transcrição expresso em osteoblastos e osteoclastos (Ilvesaro *et al.*, 2005). Culturas celulares Ahr -/- demonstram haver menos osteoclastos em comparação com culturas celulares do tipo selvagem, sugerindo que o Ahr seja fundamental à ativação da osteoclastogênese induzida pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-B (RANKL). Nessas culturas de células, o efeito de RANKL foi cessado e a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) apresentou níveis suprimidos (Iqbal *et al.*, 2013). Devido aos efeitos adversos da fumaça do cigarro, a busca de mediadores biológicos que poderiam atuar como平衡adores é um tema de investigação em curso.

O resveratrol, um polifenol usado na medicina complementar, é encontrado em cascas de uva, amoras, amendoins e plantas medicinais. Tem sido evidenciado pela comunidade científica que o resveratrol apresenta potente efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório. Além disso, o resveratrol parece ter a capacidade de inibir os efeitos deletérios causados pela fumaça do cigarro em diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo (Andreou *et al.*, 2004; Kuruş *et al.*, 2009; Arcand *et al.* 2013). Recentemente, Bo *et al.* (2013) avaliaram, em estudo clínico, que o resveratrol promoveu efeitos séricos benéficos nos marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo em indivíduos fumantes. Foi demonstrado que o tratamento com resv reduziu as concentrações de proteína c-reativa e triglicérides e aumentou os níveis de antioxidantes totais em pacientes fumantes, sugerindo seu papel terapêutico anti-inflamatório e antioxidante nesses pacientes. No metabolismo

ósseo, ele é capaz de induzir a formação óssea e inibir processos de perda óssea (Casarin *et al.* 2011; Uysal *et al.*, 2011; Casati *et al.*, 2013).

O resveratrol foi identificado como um ativador direto da regulação das proteínas Sirtuínas (Sirt). A Sirt1 pertence à família das desacetilases de histonas (HDACs), proteínas capazes de catalisar a desacetilação dos resíduos de lisina nas histonas (Stünkel *et al.*, 2011; Tanner *et al.*, 2000), provocando efeitos sobre a regulação epigenética e a transcrição de genes. Publicações recentes evidenciam seu papel na regulação dos sinais e sintomas de doenças, tais como a artrite, por exemplo, além de fazer parte da regulação da função endotelial dos vasos sanguíneos (Arunachalam *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2015). No tecido ósseo, o resveratrol está envolvido na regulação das atividades osteoclástica e osteoblástica, promovendo equilíbrio durante a diferenciação osteogênica e contribuindo para a formação e função do osso (Shakibaei *et al.*, 2011; Zang *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2016). Como a Sirt1 é uma HDAC, o resveratrol pode ter influência na modulação dos mecanismos epigenéticos envolvidos no tecido ósseo.

A epigenética consiste na promoção da estabilidade e diversidade do fenótipo celular através das marcas da cromatina, que afetam o processo transcrecional e que são transmitidas através do processo de divisão celular, mas sem promover alterações da sequência do DNA (Tang *et al.*, 2009; Laird *et al.*, 2010). Esse fenômeno biológico funciona por meio de modificações químicas no DNA e nas proteínas histonas, como a metilação e a hidroximetilação do DNA e desacetilação de histonas. A metilação do DNA é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). As enzimas de Ten-Eleven Translocation (TET) foram descobertas como implicadas na catalisação da oxidação da metilcitosina (5mC) em hidroximetilcitosina (5hmC), participando da desmetilação do DNA (Tahiliani *et al.*, 2009). A desacetilação de histonas é uma modificação promovida pelas enzimas HDACs, que culmina com a condensação da cromatina e a regulação da transcrição do DNA (Goldberg *et al.*, 2007). No entanto, as modificações da cromatina são mecanismos epigenéticos dinâmicos que atuam orquestradamente para promover a regulação da expressão do gene.

A regeneração do tecido ósseo é regulada em vários níveis, e a regulação epigenética pode adicionar outra camada regulatória a essa complexa cascata de eventos. No entanto, os mecanismos epigenéticos e as moléculas acionados pelo consumo do cigarro e do resveratrol na reparação do tecido ósseo ainda não foram

determinados completamente. Além disso, a hipótese de que o resveratrol pode agir como mediador biológico, equilibrando os efeitos nocivos da fumaça do cigarro, precisa ser investigada. Portanto, o objetivo deste estudo é desvendar padrões de expressão gênica de genes essenciais da maquinaria epigenética e do metabolismo ósseo sob a ação da inalação da fumaça do cigarro e da ingestão de resveratrol. Além disso, a hipótese de que a inalação da fumaça do cigarro e a ingestão do resveratrol podem provocar mudanças nos níveis de metilação e hidroximetilação do gene RANKL também foi avaliada.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os padrões de expressão dos genes da maquinaria epigenética sob o impacto que a fumaça do cigarro e a ingestão do resveratrol causam ao metabolismo ósseo e observar se eles foram capazes de desencadear alterações nos níveis de metilação / hidroximetilação do gene RANKL.

3 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apontam, de forma antagônica, que a fumaça do cigarro e o resveratrol modulam os padrões de expressão das enzimas da maquinaria epigenética e do metabolismo ósseo. A fumaça do cigarro e o resveratrol, de maneira contrastante, foram capazes de desencadear alterações no padrão de metilação do gene RANKL. Os resultados chamam a atenção para o resveratrol, que executou um papel de modulador biológico para os ratos que inalaram a fumaça do cigarro.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (2015) WHO report on the global tobacco epidemic: raising taxes on tobacco. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. <http://www.who.int>. Accessed 22 August 2016.
2. Ilvesaro J, Pohjanvirta R, Tuomisto J, Viluksela M, Tuukkanen J (2005) Bone resorption by aryl hydrocarbonreceptor-expressingosteoclasts is not disturbed by TCDD in short term cultures. *Life Sci.* 77:1351–1366.
3. Kung MH, Yukata K, O'Keefe RJ, Zuscik MJ (2012) Aryl hydrocarbon receptor-mediated impairment of chondrogenesis and fracture healing by cigarette smoke and benzo(a)pyrene. *J Cell Physiol.* 227:1062-1070. doi: 10.1002/jcp.22819.
4. Iqbal J, Sun L, Cao J, Yuen T, Lu P, Bab I, Leu NA, Srinivasan S, Wagage S, Hunter C, et al (2013) Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:11115-11120.
5. Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 5:493–506. doi: 10.1038/pnas.1220919110.
6. Allard JS, Perez E, Zou S, de Cabo R. Dietary activators of Sirt1 (2009) *Mol Cell Endocrinol.* 299:58-63. doi: 10.1016/j.mce.2008.10.018.
7. Singh SU, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, Girard B Jr, Savouret JF, Tenenbaum HC 2000. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol.* 167:183-195.
8. Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP, Tenenbaum HC. 2004. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol.* 75:939-948.
9. Edwards JR, Perrien DS, Fleming N, Nyman JS, Ono K, Connelly L, Moore MM, Lwin ST, Yull FE, Mundy GR et al (2013) Silent Information Regulator (Sir) T1 Inhibits NF- κ B Signaling to Maintain Normal Skeletal Remodeling. *J Bone Miner Res.* 28:960–969. doi: 10.1002/jbmr.1824.
10. Shakibaei M, Buhrmann C, Mobasher A (2011) Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF- κ B Ligand

- (RANKL) activation of NF- κ B signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J Biol Chem.* 286:11492–11505. doi: 10.1074/jbc.M110.198713.
11. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV (2014) 43:900-6. doi: 10.1016/j.ijom.2014.01.009.
 12. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lau S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL et al (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425:191-196.
 13. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM (2000) Silent Information Regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14178–14182.
 14. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002) Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol.* 14:763-772.
 15. Stünkel W, Campbell RM (2011) Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC. *J Biomol Screen.* 16:1153-1169. doi: 10.1177/1087057111422103.
 16. Lei M, Wang JG, Xiao DM, Fan M, Wang DP, Xiong JY, Chen Y, Ding Y, Liu SL (2012) *Eur J Pharmacol.* 674:73–79. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.10.015.
 17. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, Xu (2012) Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis.* 71:129–135. doi: 10.1136/ard.2011.149831.
 18. Engler A, Tange C, Frank-Bertonelej M, Gay RE, Gay S, Ospelt C (2015) Regulation and function of SIRT1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Mol Med (Berl).* 94:173-82. doi: 10.1007/s00109-015-1332-9.
 19. Zhang QB, Cao W, Liu YR, Cui SM, Yan YY (2016) Effects of Sirtuin 1 on the proliferation and osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells and stem cells from apical papilla. *Genet Mol Res.* 15(1). doi: 10.4238/gmr.15015234.
 20. Qu B, Ma Y, Yan M, Gong K, Liang F, Deng S, Jiang K, Ma Z, Pan X (2016) Sirtuin1 promotes osteogenic differentiation through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:439-445. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.154.

21. Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R (2009) Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Curr Genomics*. 10:336-352. doi: 10.2174/138920209788920994.
22. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930–935. doi: 10.1126/science.1170116.
23. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 128:635–638.
24. Casati MZ, Algayer C, da Cruz GC, Ribeiro FV, Casarin RCV, Pimentel SP, Cirano FR (2013) Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *J Periodontol*. 84:e58-e64. doi: 10.1902/jop.2013.120746.
25. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr (2010) Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 110:447-452. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.02.029.
26. Zou D, Zhang Z, He J, Zhu S, Wang S, Zhang W, Zhou J, Xu Y, Huang Y, Wang Y et al (2011) Repairing critical-sized calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor-1 α and a phosphate cement scaffold. *Biomaterials*. 32:9707–9718. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.005.
27. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 40:e115.
28. Edwards TM, Myers JP (2007) Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect*. 115:1264-1270.
29. Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 17:487-500. doi: 10.1038/nrg.2016.59.
30. Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Giannobile WV (2016) Regenerative medicine for periodontal and peri-implant diseases. *J Dent Res*. 95:255-266. doi: 10.1177/0022034515618887.
31. Rutledge KE, Cheng Q, Jabbarzadeh E (2016) Modulation of inflammatory response and induction of bone formation based on combinatorial effects of resveratrol. *J Nanomed Nanotechnol*. 7(1):pii:350.

32. Coulter JB, O'Driscoll CM, Bressler JP (2013) Hydroquinone increases 5-hydroxymethylcytosine formation through Ten Eleven Translocation 1 (Tet1) 5-methylcytosine dioxygenase. *J Biol Chem.* 288:28792–28800. doi: 10.1074/jbc.M113.491365
33. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, Viñuela A, Grundberg E, Nelson CP, Meduri E et al (2014) Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics.* 9:1382-96. doi: 10.4161/15592294.2014.969637.
34. Ambatipudi S, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Ghantous A, Le Calvez-Kelm F, Kaaks R, Barndahl M, Boeing H, Aleksandrova K, Trichopoulou A et al (2016) Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics.* 8:599-618. doi: 10.2217/epi-2016-0001.
35. Zhu X, Li J, Deng S, Yu K, Liu X, Deng Q, Sun H, Zhang X, He M, Guo H et al (2016) Genome-wide analysis of DNA methylation and cigarette smoking in chinese. *Environ Health Perspect.* 124:966-973. doi: 10.1289/ehp.1509834
36. Huang T, Chen X, Hong Q, Deng Z, Ma H, Xin Y, Fang Y, Ye H, Wang R, Zhang C et al (2015) Meta-analyses of gene methylation and smoking behavior in non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep.* 5:8897. doi: 10.1038/srep08897.
37. Gao X, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H (2016) Tobacco smoking and methylation of genes related to lung cancer development. *Oncotarget* [Epub ahead of print] doi: 10.18632/oncotarget.10007.

ANEXOS



São Paulo, 01/06/2015

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIP – ICS

Encaminho um adendo ao Projeto aprovado: "Impacto do resveratrol em condições de risco: Avaliação dos processos de reparo ósseo e da periodontite experimental induzida em ratos diabéticos e expostos à fumaça do cigarro" (226/14) para ser avaliado por este Comitê de Ética em Pesquisa. O título do Projeto é "*Metilação no DNA de genes envolvidos no reparo ósseo e na regulação epigenética em ratos diabéticos, submetidos ao tratamento com resveratrol*" e será desenvolvido pelo aluno de Mestrado em Odontologia Aladim Gomes Lameira Junior, sob minha supervisão.

Agradeço antecipadamente.

Denise Carleto Andia

Docente do Programa de Mestrado em Odontologia

Instituto de Ciências da Saúde – UNIP

Denise @andia.com.br



Metilação no DNA de genes envolvidos no reparo ósseo e na regulação epigenética em ratos diabéticos, submetidos ao tratamento com resveratrol

Adendo ao projeto intitulado “Impacto do resveratrol em condições de risco: Avaliação dos processos de reparo ósseo e da periodontite experimental induzida em ratos diabéticos e expostos à fumaça do cigarro (226/14) ”.

Pesquisador responsável: Denise Carleto Andia

Docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Universidade Paulista

denise@andia.com.br

Aluno de Mestrado: Aladim Gomes Lameira Junior

Aluno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado

Universidade Paulista

aladimjunior685@gmail.com

São Paulo

2015

Introdução: Durante o reparo do tecido ósseo, genes específicos precisam ser modulados para que o reparo ósseo aconteça. Esta regulação pode ocorrer via mecanismos epigenéticos, sendo a metilação do DNA um dos mecanismos epigenéticos envolvidos.

Objetivo: Este projeto se propõe a investigar o padrão de metilação de genes envolvidos no reparo ósseo e na regulação epigenética.

Material e Métodos: Como este projeto é um adendo a um projeto aprovado (226/14), os genes avaliados serão os correspondentes aos mRNAs que sofreram alteração na expressão com o tratamento. Assim, poderemos inferir se essas mudanças ocorreram pela regulação epigenética, via metilação do DNA.

Extração e purificação do DNA genômico: Poderão ser realizadas ou por fenol/clorofórmio e precipitação com etanol ou por kits comerciais de várias marcas existentes. A concentração será estimada utilizando-se o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

Conversão do DNA pelo Bissulfito de sódio: Será realizada com o kit Methyl SEQR™ Bisulphite Conversion Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ou similar. Esta metodologia converte as citosinas não metiladas em uracila enquanto as citosinas metiladas permanecem como citosinas. Os tubos com volume final de 50 µL serão armazenados a -20°C, obtendo-se, portanto, 6ng/µL de DNA convertido.

Avaliação do padrão de metilação dos genes: Dependendo da qualidade e quantidade do DNA obtido, custo e tempo disponíveis, poderão ser realizadas ou por MSP-PCR (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction), qMSP-PCR (quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) ou COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis). Nos dois primeiros casos, serão desenhados 2 sets de primers, 1 set (Forward e Reverse) para a condição metilada e o outro set para a condição não metilada. No MSP-PCR, as reações serão conduzidas em Termociclador comum, as amostras serão corridas em gel e as bandas quantificadas em programa de imagem. Os controles 100% metilado e 0% metilados para comparação estarão presentes em cada gel e serão comercialmente adquiridos. No qMSP-PCR, as reações serão conduzidas no Termociclador Roche 96, com uma curva padrão de porcentagem de metilação, construída a partir dos controles 100% e 0% metilados. Esta metodologia já proporciona a quantificação final. No caso do COBRA, serão utilizadas enzimas de restrição que reconhecem sequências originalmente metiladas, clivando-as ou não, gerando fragmentos de DNA com diferentes tamanhos, que serão observados em forma de banda em géis, que serão quantificadas em programa de imagem, à semelhança do MSP-PCR. Os controles 100% metilado e 0% metilados para comparação estarão presentes em cada gel.