

FLÁVIA GERELLI GHIRALDINI

**“EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO DIABETES
MELLITUS DO TIPO I SOBRE A ESTRUTURA DA
CROMATINA DE HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGOS”**

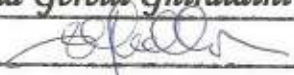
Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIA GERELLI GHIRALDINI

**“EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO DIABETES
MELLITUS DO TIPO I SOBRE A ESTRUTURA DA
CROMATINA DE HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGOS”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Flávia Gerelli Ghiraldini</i>  e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G345e Ghiraldini, Flávia Gerelli, 1986-
Efeitos do envelhecimento e do diabetes mellitus do tipo I sobre a estrutura da cromatina de hepatócitos de camundongos / Flávia Gerelli Ghiraldini. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Luiza Silveira Mello.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Cromatina. 3. Envelhecimento. 4. Sirtuínas. 5. Hepatócitos. I. Mello, Maria Luiza Silveira, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Aging and diabetes mellitus type I effect over mouse hepatocytes chromatin

Palavras-chave em Inglês:

Type 1 diabetes mellitus

Chromatin

Aging

Sirtuins

Hepatocytes

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Mateus Mondin

Luís Fernando Barbisan

Roger Frigério Castilho

Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 18 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

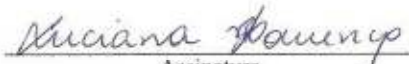
Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini


Assinatura

Prof. Dr. Mateus Mondin


Assinatura

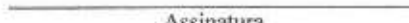
Prof. Dr. Roger Frigério Castilho


Assinatura

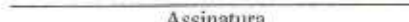
Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro


Assinatura

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que me iluminou e deu coragem para seguir em frente mesmo em momentos difíceis.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por sempre me incentivar quando me faltava ânimo, me ensinar o caminho certo quando eu me frustrava e por se orgulharem de mim mesmo quando meus passos eram tão pequenos. Ao meu irmão e grande companheiro André. Ao meu novo anjinho, Nala.

Ao meu amor Klaus, por ser tão companheiro, por me amar mesmo nos meus piores dias, por me ouvir, me entender e me aceitar do jeito que eu sou.

Aos meus avós Ângela, Santos (*in memorian*) e Edgard, aos meus tios, tias e primos por sempre me apoiar e incentivar em qualquer coisa que eu decidisse fazer.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza S Mello por acreditar em mim quando tudo o que eu podia oferecer era a vontade de pesquisar; por me guiar não só profissionalmente como pessoalmente, pelos vários conselhos, pelo grande carinho e por ser, além de orientadora, minha amiga.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pelos vários ensinamentos, por torcer e me incentivar tanto pessoalmente como profissionalmente.

À Profa. Dra. Maria Silvia V. Gatti, pelos conselhos e ensinamentos; pelas conversas, pelos cafés, pelas risadas e preocupações, por confiar em mim e por ser uma grande amiga.

Ao Dr. Nick Gilbert por ter me recebido e me ensinado. Ao pessoal do ECRC Jayne, Sam, Jing, Ben, Jacqueline, Mariantonieta, Sophie e Elaine, pelo acolhimento e bons momentos juntos.

Ao Prof. Dr. Alberto Moraes pela paciência e dedicação em me ensinar as rotinas e técnicas do laboratório, pelas discussões e grandes colaborações com meu trabalho e pela amizade.

Aos Profs. Drs. membros desta Banca pela disponibilidade e contribuição à qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À Liliam Panagio, secretária do programa de Pós-graduação, pela atenção, paciência e ajuda durante todos esses anos de pós-graduação.

À FAPESP, CNPq, CAPES/PROEX e CAPES/PROAP e PED/Unicamp pelo apoio financeiro para a minha formação e elaboração dessa tese.

À Sociedade europeia para o Estudo de Diabetes (EASD) pelo financiamento concedido em 2010 e 2012 para que eu participasse da reunião anual da Sociedade.

À minha amiga Luciana G. Malta por todas as ajudinhas, ótimas conversas, risadas e trabalhos.

À Dra. Maria Clara F. Alves, ao Prof. Dr. Domingos Leite e à Ana Lúcia Soledade pela valiosa amizade.

À todos os meus amigos do laboratório de Biopolímeros e Supraorganização Cromatínica. Tantos os antigos, Flávia Paoli, Isabela, Luana, Letícia, Felipe, Meire, como os novos Eli, Mayara, Natália, Juliana e especialmente Elenice Alvarenga e Marina Felisbino pelas boas conversas e risadas.

Às minhas amigas do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional Dras. Taíze e Andrea.

À minhas amigas da graduação Isabela, Ana, Milena, Mari e Rafaela Trad que apesar da vida corrida sempre têm um tempo para mim.

*“Portanto, a tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda, mas pensar
o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer).*

Sumário

Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Cromatina e modificações epigenéticas.....	1
1.1.1. Metilação do DNA.....	2
1.1.2. Metilação de histonas.....	2
1.1.3. Acetilação de histonas.....	3
1.1.4. Territórios cromossômicos e regulação transcricional.....	5
1.1.5. Regiões gênicas e as marcações epigenéticas.....	7
1.1.6. Sirtuínas.....	9
1.1.7. Sirt1.....	11
1.1.8. Sirt6.....	12
1.1.9. Sirt7.....	13
1.2. O Diabetes mellitus.....	14
1.2.1. Generalidades.....	14
1.2.2. O modelo de camundongos NOD.....	15
1.2.3. O modelo de cultura de células HepG2.....	16
1.2.4. Diabetes e a cromatina de hepatócitos.....	17
1.3. O envelhecimento.....	18
1.3.1. Cromatina e envelhecimento.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e métodos.....	22
3.1. Hepatócitos de camundongos.....	22
3.1.1. Animais.....	22
3.1.2. Fixação e citoquímica.....	23
3.1.3. Análise de imagem por sistema de vídeo.....	23
3.1.4. Preparação dos fígados para ensaios moleculares.....	24
3.1.4.1. Isolamento de núcleos de hepatócitos.....	24
3.1.4.2. Quantificação das amostras.....	24
3.1.5. Teste da nuclease microcócica.....	25

3.1.6. Análise de proteínas modificadoras de cromatina, das histonas modificadas e do fator de transcrição PGC-1 α	25
3.1.6.1. Anticorpos.....	25
3.1.6.2. Imunofluorescência.....	25
3.1.6.3. Western Blotting.....	26
3.1.7. Análise da atividade enzimática de Sirt1.....	26
3.1.8. Medidas da razão NAD ⁺ /NADH.....	27
3.1.9. Teste do Cometa.....	28
3.1.10. Técnica de AgNOR.....	29
3.1.11. Extração de RNA de hepatócitos de camundongos para ensaios de expressão gênica.....	30
3.1.12. <i>Microarray</i> de expressão.....	31
3.1.13. <i>Primers</i> para análise de expressão gênica e imunoprecipitação cromatínica (ChIP) dos genes <i>Apoe</i> , <i>Igfbp1</i> e <i>Foxo1</i>	31
3.1.14. Preparação de amostras de hepatócitos de camundongo para avaliação da expressão gênica por qPCR.....	32
3.1.15. <i>Native</i> -ChIP em hepatócitos de camundongos.....	33
3.1.16. qPCR.....	36
3.2. Cultura celular de hepatocarcinoma humano.....	37
3.2.1. Cultura celular.....	37
3.2.2. <i>Primers</i> para ChIP e reação de qPCR.....	39
3.2.3. Preparação de amostras de HepG2 para avaliação da expressão gênica por qPCR.....	39
3.2.4. <i>Native</i> -ChIP em células HepG2.....	40
3.2.5. Análise de imagem por microespectrofotometria de varredura.....	41
4. Resultados.....	43
4.1. Animais NOD hiperglicêmicos apresentam invasão linfocitária nas ilhotas pancreáticas.....	43
4.2. Hepatócitos mononucleados de animais adultos hiperglicêmicos atingem grau de poliploidia mais elevado do que animais adultos normoglicêmicos.....	44
4.3. O diabetes mellitus promove maior acessibilidade da cromatina do que o envelhecimento.....	44

4.4.	O diabetes mellitus e o envelhecimento afetam a atividade e a abundância de Sirt1.....	44
4.5.	Abundância de PGC-1 α e histonas-alvos de Sirt1 em hepatócitos de camundongos adultos diabéticos e idosos normoglicêmicos.....	45
4.6.	Hiperglicemia, porém não envelhecimento, induz aumento na abundância de Sirt6 e danos ao DNA em hepatócitos de camundongo.....	49
4.7.	Hiperglicemia e envelhecimento promovem diminuição na razão área AgNOR+/área nuclear, mas apenas o envelhecimento promove decréscimo na abundância de Sirt7.....	51
4.8.	Análise de expressão gênica diferencial em hepatócitos de camundongos.....	54
4.8.1.	Diabetes mellitus.....	54
4.8.2.	Envelhecimento.....	67
4.9.	Hiperglicemia provoca aumento na expressão gênica, porém diminuição de marcadores epigenéticos.....	78
4.10.	Análise de imagem.....	83
4.11.	As marcas epigenéticas nos genes Apoe, Foxo1 e Igfbp1 em hepatócitos de camundongo e em células HepG2 não mostraram o mesmo perfil.....	92
5.	Discussão.....	94
5.1.	Poliploidia e remodelação cromatínica.....	94
5.2.	Sirtuínas e marcações epigenéticas.....	95
5.3.	Expressão gênica diferencial.....	99
5.4.	Mecanística epigenética no <i>diabetes mellitus</i>	103
5.5.	Fenótipo nuclear de células HepG2.....	107
6.	Conclusões gerais.....	110
7.	Referências Bibliográficas.....	113
8.	Anexo I.....	128
9.	Anexo II.....	139
10.	Anexo III.....	141
11.	Anexo IV.....	143
12.	Anexo V.....	145

Abreviaturas

ADP – adenosina difosfato

AgNOR – método de impregnação por prata, que revela proteínas acumuladas em NORs recentemente ativas.

ApoE – Apolipoproteína E

BER – *Base excision repair*

CBP/p300 - *p300-CREB-binding protein*

ChIP – Imunoprecipitação de cromatina

CoA – Coenzima A

Ct – *Threshold cycle*

Cxcl11 – *Chemokine (C-X-C motif) ligand 11*

DAPI – *4,6- diamidino-2-phenylindole*

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes mellitus do tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus do tipo 2

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

Dnmt – DNA metil transferase

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

FoxO1 – *Forkhead Box O 1*

FT – Fator de transcrição

FXR – *Farnesoid X receptor*

GNAT - *GCN5-related family of N-acetyltransferases*

H1K26Ac – Histona H1 acetilada na lisina 26

H2BK5me – Histona H2B metilada na lisina 5

H3K4me3 – Histona H3 trimetilada na lisina 4

H3K9Ac – Histona H3 acetilada na lisina 9

H3K9me2 – Histona H3 dimetilada na lisina 9

H3K14Ac – Histona H3 acetilada na lisina 14

H3K27me2 – Histona H3 dimetilada na lisina 27

H3K36me3 – Histona H3 trimetilada na lisina 36
 H4K16Ac – Histona H4 acetilada na lisina 16
 H4K20me3 – histona H4 trimetilada na lisina 20.
 HAT – Histona acetiltransferase
 HDAC – Histona deacetilase
 HepG2 – Células de hepatoma G2
 HP1- α – *heterochromatin protein 1 alpha*
 HS – *sítios hipersensíveis*
 IAC – índice de acessibilidade da cromatina
 IDD – índice de dano no DNA
 IGF-1 – *Insulin growth factor -1*
 Igfbp1 – *insulin growth factor binding protein 1*
 IL1r12 – *Interleukin-1 receptor like 2*
 IL12rb – *Interleukin 12 receptor beta*
 LPS-1 – Lipopolissacarídeo 1
 LSD1 – *Lysine specific demethylase 1*
 MNase – Nuclease microcócica
 NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo
 NF- κ B – *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
 NK – *Natural Killers*
 NMN - nicotinamida mononucleotídeo
 NOD – *Non-obese diabetic*
 NOR – região organizadora do nucléolo
 PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*
 PCR – *Polimerase chain reaction*
 PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase
 PGC-1 α – *peroxisome proliferator- activated receptor γ coactivator 1 alpha*
 PMSF – *phenylmethanesulfonylfluoride*
 Pol II – RNA polimerase II
 PXR – *Pregnane X receptor*
 rDNA – DNA ribossômico
 Regiões HS – Regiões hipersensíveis à DNase I
 RNA – ácido ribonucleico

RIN – *RNA integrity number*
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SAHFs – *senescence-altered heterochromatin foci*
SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
Sir2 – *Silent Information regulator 2*
Sirt - Sirtuína
SN - Sobrenadante
SUV39H1 – *supressor of variegation 3-9 homolog 1*
TFIID – Fator de Transcrição II D
Tlr11 – receptor *Toll-like*
TR – Receptor da tireóide
TSS – *Transcription start site*
WB – Western Blot

Resumo

O *diabetes mellitus* do tipo I (DM1) caracteriza-se pela ocorrência de insulite com consequente hiperglicemia e poliúria. Alterações celulares estruturais e metabólicas decorrentes do aumento da glicemia podem provocar fenótipos de envelhecimento precoce. O envelhecimento celular é resultado de fatores intrínsecos e extrínsecos, que alteram a estrutura e a organização da cromatina e que, consequentemente, afetam a expressão gênica. As sirtuínas, deacetilases NAD⁺-dependentes, estão envolvidas na transcrição gênica, reparo de DNA, transcrição do rDNA, regulação metabólica e remodelação cromatínica. As sirtuínas nucleares, especialmente Sirt1 e Sirt6 estão envolvidas com o envelhecimento precoce, no metabolismo de glicose e na resposta à inflamação.

O presente trabalho teve como objetivo geral comparar os processos de remodelação cromatínica em hepatócitos sob o efeito da hiperglicemia e do envelhecimento, usando-se modelo animal (camundongos). Um modelo de cultura celular (HepG2) foi também utilizado para estudo de efeitos da hiperglicemia, utilizando-se como metodologias análises morfológicas e moleculares.

Foi observado um aumento em conteúdo de DNA e em acessibilidade da cromatina à MNase mais acentuado em hepatócitos de animais DM1 do que de idosos. O aumento na abundância de Sirt1 em animais hiperglicêmicos não refletiu em sua maior atividade, enquanto em idosos houve um decréscimo generalizado nesses parâmetros e aumento da acetilação de sítios histônicos. Em animais DM1, Sirt6 apresentou abundância semelhante à de Sirt1, possivelmente devido à alta fragmentação de DNA observada nesses animais, diferente do ocorrido em idosos. Ambos os animais DM1 e idosos apresentaram baixa relação área AgNOR+/área nuclear. Em animais diabéticos isto foi devido ao aumento na área nuclear, enquanto nos idosos, foi devido à diminuição na área AgNOR+ e aumento na área nuclear. O aumento na metilação de rDNA na porção 18S e a baixa abundância de Sirt7 confirmam diminuição no metabolismo celular no envelhecimento.

Em hepatócitos de camundongos DM1 e idosos foi observado genes diferencialmente expressos relacionados à inflamação. Admite-se que no primeiro caso este achado seja devido à natureza auto-imune da doença, enquanto no segundo possa ser um indício de inflamação naturalmente encontrada em processos de envelhecimento. Em animais DM1, a expressão diferenciada de genes envolvidos com metabolismo de lipídios poderia contribuir para com a peroxidação lipídica e produção de ROS levando à esteatose hepática.

Nas células HepG2, alterações na expressão dos genes *Apoe*, *Igfbp1* e *Foxo1*, ocorridas em meio de cultura hiperglicêmico, tornaram-se revertidas quando as células foram retornadas à normoglicemia. Contudo, as abundâncias das marcações epigenéticas nos promotores desses genes decresceram progressivamente, indicação de uma memória hiperglicêmica, dado não observado em modelo animal. A análise do fenótipo nuclear dessas células indicou possível indução da proliferação celular quando retornadas à normoglicemia. A inibição de sirtuínas aumentou o conteúdo Feulgen-DNA e o contraste entre cromatina condensada e não-condensada, indicativo de atuação na proliferação celular e na remodelação cromatínica.

DM1 e envelhecimento, portanto, não podem ser considerados fenômenos idênticos, pois enquanto no primeiro há um mecanismo compensatório que promove alterações genéticas, epigenéticas e remodelação cromatínica, no segundo há um decréscimo generalizado no metabolismo celular levando a modificações diferentes nos mesmos parâmetros.

Abstract

Diabetes mellitus type I (DM1) is characterized by insulinitis and consequent hyperglycemia and polyuria. Structural and metabolic changes in the cell caused by hyperglycemia might induce an early-ageing phenotype. Both intrinsic and extrinsic agents might contribute to cellular ageing thus leading to chromatin structural changes and differential gene expression. Sirtuins, NAD⁺-dependent deacetylases, play a role in cell metabolism, transcription, DNA repair and chromatin remodeling. Sirt1 and Sirt6, especially, are nuclear proteins related to early-ageing, glucose metabolism and inflammatory response.

The general purpose of the present work was to compare processes of chromatin remodeling in hepatocytes under the effects of hyperglycemia and aging, using mouse models. A model using cells in culture (HepG2) was also used to study the effects caused by hyperglycemia. The methodology used involved morphological and molecular analysis.

An increase in DNA content and chromatin accessibility to MNase was found more pronounced in hepatocytes from DM1 than from aged mice. Despite the high abundance of Sirt1 in DM1 animals, its activity was not proportionally high, whereas in old animals there was a reduction in these parameters, increasing the acetylation of Sirt1-histonic sites. In DM1 mice, Sirt6 presented similar abundance as Sirt1, possibly due to the high DNA fragmentation, different to what was found in aged animals. Both DM1 and normoglycemic old mice presented a decrease in AgNOR+ area/nuclear area ratio. While in DM1 animals it was a result from the increase in nuclear area, in old animals it was a combination of increased nuclear areas and decreased AgNOR+ areas. The DNA methylation increase in the 18S rDNA region and the decrease in Sirt7 abundance in the hepatocytes from old mice support the hypothesis of diminished cellular metabolism.

Differential expression analysis for DM1 and old mouse hepatocytes presented a high number of genes involved in the inflammatory response. While in the former it could be an autoimmune characteristic of the disease, in the latter it

might be an evidence of inflammatory state naturally associated with aging. Moreover, DM1 mice also presented differential gene expression related to lipid metabolism, which could contribute to increase lipid peroxidation and ROS production leading to hepatic steatosis.

HepG2 cells showed changes in *Apoe*, *Igf1* and *Foxo1* expression in hyperglycemic medium and they were reverted when the cells returned to normoglycemic medium. The epigenetic marks, however, presented a progressive decrease in abundance, indicative of a hyperglycemic memory, which was not observed in DM1 animals. The nuclear phenotype in HepG2 cells under these same experimental conditions indicated a possible induction in cellular proliferation when the cells were returned to the normoglycemic medium. Inhibition of sirtuins increased the contrast between condensed and non-condensed chromatin and the Feulgen-DNA content, indicating a role in cell division and chromatin remodeling. Therefore, DM1 and ageing cannot be considered as identical processes, because while in DM1 there is a compensatory mechanism that induces changes in epigenetic marks, chromatin remodeling and differential gene expression, there is a general decrease in cell metabolism under aging that leads to different changes in the same parameters.

1. Introdução

1.1. Cromatina e modificações epigenéticas

Nos eucariotos, o DNA se encontra complexado com proteínas histônicas e não histônicas, formando a cromatina. A unidade fundamental de organização da cromatina é representada pelos nucleossomos que formam a fibra de 11-nm de espessura e são compostos por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 e 147 pares de base de DNA (Alberts et al, 2008). Nessa estrutura há ainda a adição de mais uma histona (H1), a qual contribui na ligação entre pares de nucleossomos, formando a fibra de 30-nm de espessura (Alberts et al, 2008).

A cromatina não é estruturalmente ou funcionalmente uniforme. Desde os trabalhos pioneiros de Heitz (1928; 1934) a cromatina vem sendo considerada como podendo se apresentar em uma de duas formas: eucromatina e heterocromatina. A eucromatina é definida tradicionalmente como sendo a cromatina descondensada, rica em genes e transcricionalmente ativa. A heterocromatina, por sua vez, é altamente condensada, podendo ter um caráter mais permanente, uma composição química diferenciada e contendo áreas extensas de DNA não codificador (heterocromatina constitutiva) (Elgin & Grewal, 2003; Gilbert et al, 2004; Black & Whetstine, 2011). A heterocromatina também pode se apresentar apenas durante algumas situações específicas do ciclo celular ou do desenvolvimento, como no caso de um dos cromossomos X de fêmeas de mamíferos placentários (heterocromatina facultativa) (Strome & Kelly, 2007). Essa supra-organização da cromatina é dinâmica e pode sofrer alterações, dependendo de estímulos externos e/ou internos.

Modificações pós-traducionais nas caudas de histonas e metilações de DNA são modificações epigenéticas que proporcionam níveis diferenciados de empacotamento da cromatina, facilitando ou dificultando o acesso de fatores de transcrição a sítios estratégicos (Allis et al, 2007).

A epigenética é um ramo do conhecimento que contempla mudanças na expressão gênica por modulação da cromatina que não são decorrentes de modificações na sequência de bases do DNA e que podem ser herdadas (Allis et al, 2007). De fato, com o descobrimento da ação de radicais acrescidos ao DNA (como o grupo metil) e em caudas de histonas (como, por exemplo, os grupos acetil e metil em resíduos de lisina e arginina, entre outros aminoácidos), foi possível um melhor entendimento sobre o funcionamento da regulação gênica e o seu envolvimento em diversos processos celulares como diferenciação, proliferação, envelhecimento, morte e surgimento de algumas doenças.

1.1.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação covalente na qual um radical metil é adicionado a uma citosina. Essa marcação epigenética é comumente observada em regiões do genoma ricas em citosinas e guaninas, chamadas “ilhas CpGs”. Em mamíferos, os padrões de metilação do DNA são definidos durante o desenvolvimento embrionário pelas DNA metiltransferases Dnmt3a e Dnmt3b e são mantidos e/ou modificados por um mecanismo de replicação, durante a divisão celular, pela metiltransferase Dnmt1 (Kouzarides & Berger, 2007).

A metilação de DNA é comumente associada com silenciamento gênico, pois esta marca é reconhecida por proteínas metil-DNA-ligantes, as quais recrutam complexos repressores para os promotores das regiões metiladas. Essa sinalização é fundamental em fenômenos importantes durante o desenvolvimento embrionário, como inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico (Kouzarides & Berger, 2007).

1.1.2. Metilação de histonas

A metilação de histonas é promovida por proteínas metiltransferases de histonas, como a SUV39H1 (*supressor of variegation 3-9 homolog 1*) e sua remoção é realizada por demetilases de histonas, como por exemplo, LSD1

(*lysine-specific demethylase 1*) (Scharf & Imhof, 2011). Essas modificações podem ocorrer tanto em resíduos de lisina quanto em resíduos de arginina e podem ter um efeito tanto ativador quanto repressor da transcrição, dependendo do posicionamento do resíduo modificado, mas também relacionado ao reparo de DNA e replicação (Kouzarides & Berger, 2007; Kouzarides, 2007). Por exemplo, metilações nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 (H3K4, H3K36 e H3K79) são ativadoras, enquanto metilações nas lisinas 9 e 27 da histona H3 (H3K9 e H3K27) e lisina 20 da histona H4 (H4K20) são repressoras da transcrição e contam com recrutamento da proteína *heterochromatin protein 1α* (HP1α) na região promotora de genes (Kouzarides, 2007). A complexidade da sinalização por metilação de histonas é aumentada quando mais de um radical metil for adicionado a um mesmo resíduo. Assim, lisinas podem ser mono, di ou trimetiladas, enquanto argininas podem ser mono ou dimetiladas (Kouzarides & Berger, 2007).

1.1.3. Acetilação de Histonas

As acetilações de histonas estão envolvidas essencialmente com a ativação da transcrição, pois permitem um afrouxamento da cromatina, uma vez que o grupo acetil anula a carga positiva do radical $-NH_3^+$ em lisinas, diminuindo a atração eletrostática entre DNA e histona. A acetilação de histonas, além de promover uma mudança na organização da cromatina também tem a função de servir como um sítio para a ligação de fatores de transcrição e outros complexos (Kouzarides & Berger, 2007). Desta forma, esta modificação desempenha um papel importante para o estabelecimento de um estado transcricionalmente competente da cromatina (Görisch et al, 2005). As proteínas reguladoras da acetilação de histonas são denominadas acetiltransferases e deacetilases de histonas. As acetiltransferases compreendem três grandes famílias: GNAT (*GCN5-related family of N-acetyltransferases*), MYST e CBP/p300 (*p300-CREB-binding protein*), baseadas em homologia a proteínas de levedura e apresentam sítios-alvos preferenciais. As deacetilases são divididas em Classes I, II, III e, mais

recentemente IV. Cada uma dessas classes foi denominada também em homologia com proteínas deacetilases encontradas em leveduras (Ruijter et al., 2003; Kouzarides & Berger, 2007).

As acetilações nas caudas de histonas podem ter como consequência alteração no arranjo das fibras de cromatina assim como na expressão gênica. De fato, foi observado que a acetilação de resíduos da lisina 16 da histona H4 não colabora com a formação da fibra cromatínica de 30 nm e prejudica a capacidade de interação entre fibras desse tipo (Shogren-Knaak et al, 2006). Tal função é importante no contexto do posicionamento gênico dentro do núcleo, pois essa marca está relacionada a uma associação diferencial de fatores de transcrição e promoveria uma barreira contra a expansão de heterocromatina. Perdas de H4K16Ac estariam também relacionadas ao desenvolvimento de alguns tumores humanos (Kurdistani et al, 2004; Fraga et al, 2005).

Contudo ainda existem diversas informações controversas com respeito à função das acetilações. A acetilação da lisina 9 de histonas H3 (H3K9Ac), por exemplo, poderia ter uma ação de ativadora transcrricional, pois serve de base para o acoplamento do fator de transcrição TFIID, o que indicaria um aumento na expressão dos genes que estivessem envolvidos por aquela histona modificada (Nakamura et al, 2010). Contudo, outros achados mostram haver marcas de H3K9Ac em sítios promotores de genes como o da ciclina B2 e PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) em seu estado reprimido, o que indica que nesse caso tal modificação epigenética não estaria atuando como ativadora da transcrição (Gatta & Mantovani, 2010).

Dessa forma, para se relacionar expressão gênica e modificações epigenéticas, precisa-se levar em conta desde a posição desse gene nos territórios cromossômicos até o tipo de modificação epigenética e sua posição em relação ao gene. As modificações pós-traducionais em histonas, particularmente, têm sido grande alvo de pesquisa para a busca e compreensão de um possível padrão de sinalização conhecido como “Código de Histonas” (Jenuwein & Allis, 2001).

1.1.4. Territórios cromossômicos e regulação transcricional

No núcleo interfásico de mamíferos os cromossomos se organizam como entidades, em determinadas regiões, sem forma regular, medindo aproximadamente de 1-2 μm e denominados de territórios cromossômicos (Cremer & Cremer, 2001; Vaquerizas et al, 2011). Territórios cromossômicos ricos em genes ativos situam-se normalmente no interior do núcleo, diferentemente daqueles que apresentam genes silenciados (Vaquerizas et al., 2011) (Figura 1). O padrão mostra-se inverso quando analisados genes dentro do próprio território cromossômico: genes ativos se encontram na periferia enquanto genes inativos se localizam no interior do mesmo (Vaquerizas et al., 2011). A existência de “fábricas de transcrição” (*transcription factories*) seria uma hipótese de como os territórios cromossômicos se organizam para promover a transcrição gênica (Figura 1). As fábricas de transcrição se localizariam nos espaços entre territórios cromossômicos (Chakalova & Fraser, 2010) e nelas haveria produção da maior parte dos mRNA produzidos pela célula, devido à grande concentração de RNA polimerase II (Pol II) (Iborra et al, 1996). Contudo, essas estruturas são dinâmicas e heterogêneas. Por exemplo, na periferia nuclear, onde supostamente se localizariam genes silenciados, foi recentemente observado haver atividade transcricional nas regiões próximas dos complexos de poro (Kind & Steensel, 2010) (Figura 1). Próximo aos complexos de poro se encontrariam também maiores concentrações de RNA polimerase II e histonas acetiladas em comparação à cromatina diretamente em contato com a lâmina nuclear, a qual apresenta marcadores de heterocromatina e silenciamento gênico (Kind & Steensel, 2010).

No entanto, mesmo com a existência de um padrão organizacional em territórios cromossômicos, é necessário ressaltar que a cromatina é uma estrutura dinâmica e há a necessidade de movimentação desta para que certos genes atinjam as fábricas de transcrição ou sejam internalizados. É nesse contexto que são encontradas as modificações de histonas que atuam a longa distância dos

domínios cromossômicos, como por exemplo, a interação da H3K27me3 com a lâmina nuclear e da H4K16Ac com os poros nucleares (Brown et al, 2008; Vaquerizas et al, 2011).

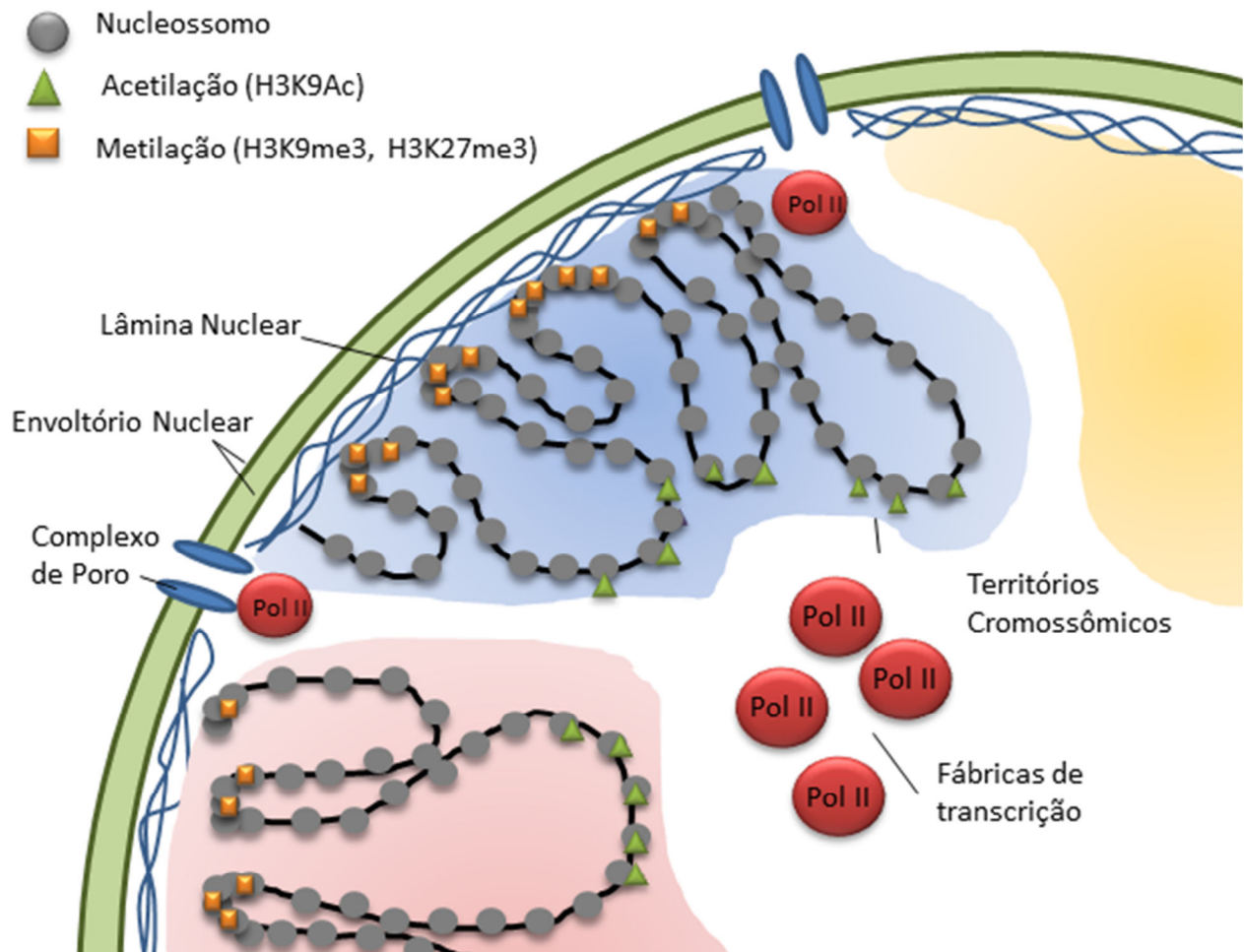


Figura 1 – Dinâmica de transcrição e organização da cromatina na periferia nuclear.

1.1.5. Regiões gênicas e as marcações epigenéticas

Sabe-se que um gene típico, além do seu promotor e região TSS (*transcription start site*), pode também apresentar *enhancers*, *insulators* e regiões HS. Os *enhancers* são formados basicamente por sequências de DNA que exercem efeito regulatório positivo sobre a transcrição de um gene. Este pode agir a longas distâncias atuando na maioria das vezes de forma *cis* dentro de um mesmo cromossomo, mas também em cromossomos diferentes (Bakel, 2011). Os *insulators*, por sua vez, são formados por sequência de DNA geralmente entre os *enhancers* e os promotores e têm como função a repressão da ação dos primeiros com o objetivo de não aumentar a transcrição. Os *insulators* também podem atuar como barreiras que delineiam diferentes domínios cromatínicos, evitando o espalhamento de sinais de repressão da heterocromatina (Bakel, 2011; Vogelmann et al, 2011). Regiões HS, por sua vez, são regiões hipersensíveis à DNase I, as quais indicam a presença de uma cromatina aberta na qual podem estar presentes os elementos regulatórios explicados aqui (Crawford et al, 2006). Cada um desses elementos encontram-se sob intensa e diferenciada regulação epigenética que no final vai determinar basicamente o momento e a intensidade da sua transcrição, entre outros aspectos. Os *enhancers* e *insulators*, por exemplo, apresentam marcações de H3K4me e H3K4me3 (Barski et al, 2007) (Figura 2).

Regiões promotoras, no entanto, apresentam uma gama mais diversificada de marcas epigenéticas, cada uma delas com alta intensidade quando comparada com outras regiões gênicas, no caso de genes ativos. Essas marcas podem ser ativadoras da transcrição (no caso de genes ativos) como H3K4Ac, H3K4me, H3K9me, H3K36me3, H3K79me3, entre outras (Barski et al, 2007) (Figura 2). No caso de genes inativos observa-se menor quantidade de marcas e elas são repressoras da transcrição, como H3K27me2 e H3K27me3 (Barski et al, 2007). Há marcas epigenéticas específicas também para o corpo de genes ativos, como é o

caso de H2BK5me, H4K20me, H3K36me3, H4K16Ac (Barskiet al, 2007; Wang et al, 2009).

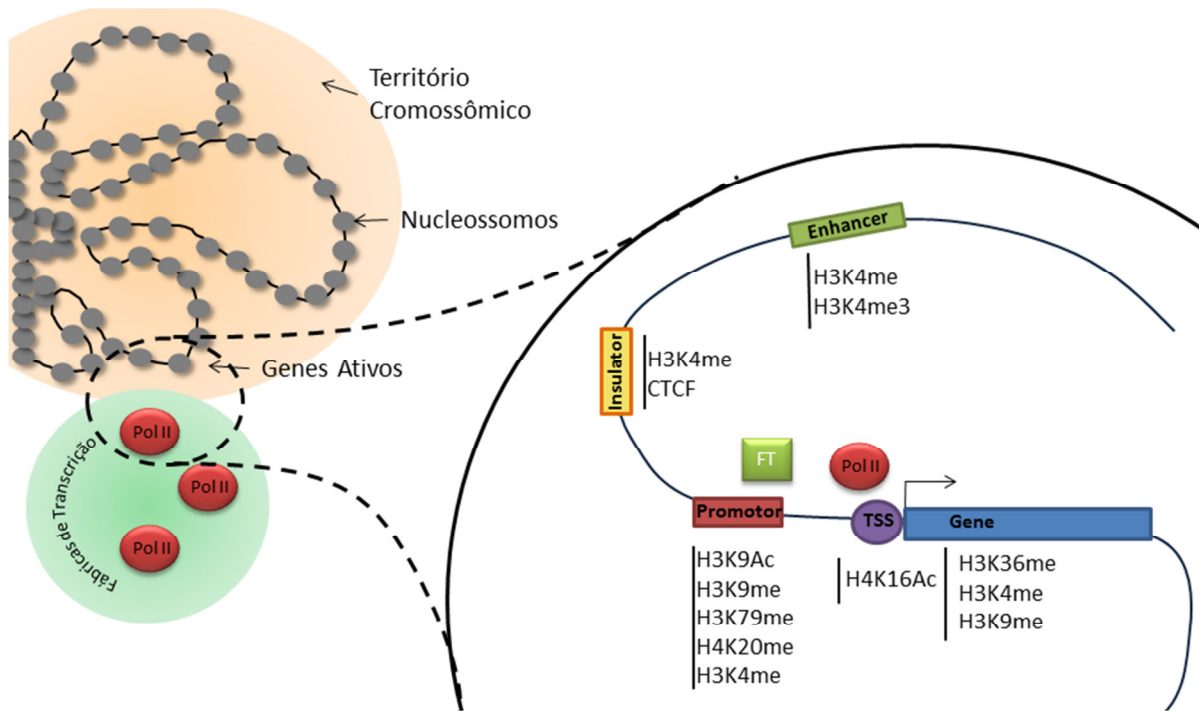


Figura 2 – Regulação epigenética da transcrição: esquema indicando genes ativos situados nas bordas de territórios cromossômicos com marcações epigenéticas específicas para cada elemento gênico.

As acetilações de histonas são comumente encontradas próximas a regiões TSS, uma vez que estão relacionadas com a estabilização da ligação de fatores de transcrição e desestabilização da estrutura nucleossômica (Wang et al, 2009). Toda essa regulação é estritamente regulada por histonas metiltransferases, demetilases, acetiltransferases e deacetilases. Essas últimas apresentam um papel fundamental para que a adição de marcadores não ocasione iniciação de transcrições promíscuas, sendo fundamental a remoção destas para o reestabelecimento da atividade transcrricional basal (Wang et al, 2009).

A análise de complexos DNA-proteína de interesse tornou-se facilitada com o aperfeiçoamento da técnica de imunoprecipitação de cromatina. Graças à especificidade de anticorpos, proteínas que se ligam ao DNA, como fatores de transcrição ou histonas, podem ser isoladas. Dessa forma, os sítios de ligação da proteína-alvo podem ser mapeados e sua frequência em determinado sítio gênico, quantificada. Tradicionalmente, os complexos DNA-proteína não estáveis são fragmentados por sonicação após fixação por para formaldeído, o qual forma ligações cruzadas (Solomon & Varshavsky, 1985). Como proteínas histônicas formam complexos estáveis com o DNA, a técnica de imunoprecipitação cromatínica (ChIP) foi adaptada para esse tipo de associação. *Native-ChIP* é uma variação desse procedimento na qual se efetua a fixação por paraformaldeído e a cromatina é fragmentada apenas por digestão com nuclease microcócica (MNase). Esta adaptação requer menos material inicial, apresenta maior sensibilidade, e diminui a interferência de ligações não sistemáticas (Cosseau & Grunau, 2011).

1.1.6. Sirtuínas

As deacetilases de histonas compreendem duas grandes famílias: as pertencentes às classes I, II e IV (compostas pela família das HDAC), e as NAD⁺-dependentes (classe III). As histonas deacetilases de classe III foram identificadas como um fator necessário para o silenciamento transcricional de telômeros e do *silent mating loci* de leveduras e então denominadas Sir2 (*Silent information regulator 2*) (Ivy et al, 1986). Posteriormente foi descrito que a Sir2 participaria do silenciamento de rDNA, contribuindo para a diminuição da recombinação e consequente aumento do tempo de vida dessas leveduras (Kaeberlein et al, 1999). Em mamíferos, as sirtuínas contêm o mesmo domínio catalítico de ligação ao NAD⁺ conservado da família Sir de leveduras, contudo os domínios N- e C-terminais apresentam diferenças. A família das sirtuínas é composta por sete

proteínas que apresentam localização e ações diferenciadas dentro da célula (Tabela 1).

A dependência de NAD^+ como cofator pelas sirtuínas permitiu o avanço de pesquisas sobre essa família de deacetilases, pois o uso de moléculas envolvidas na síntese de NAD^+ permitiriam a regulação específica da atividade dessas proteínas. A nicotinamida é uma forma ativa da vitamina B3, precursora da síntese de NAD^+ , sendo que em altas concentrações tem o papel de inibir sirtuínas (Surjana et al, 2010). O tratamento com nicotinamida, dessa forma, permitiria a observação do papel dessa classe de deacetilase na expressão gênica e em marcações epigenéticas. (Bitterman et al, 2002; Suchankova et al, 2009).

Tabela 1 – Localização e caracterização dos principais alvos e atividades enzimáticas das sirtuínas.

Sirtuína	Localização	Atividade	Alvos
Sirt1	Citoplasmática, Nuclear	Deacetilase	H1K26Ac, H3K9Ac, H3K14Ac, H4K16Ac. PGC-1 α , FOXO1, FOXO3a, FOXO4 NF- κ B, p53, p300, MyoD, TAF, MEF2, PCAF, entre outros.
Sirt2	Citoplasmática, Nuclear	Deacetilase	H4K16Ac, α -tubulina, FOXO1
Sirt3	Mitocondrial, Citoplasmática	Deacetilase	AceCS2, GDH, LCAD, NDUFA9, FOXO3a
Sirt4	Mitocondrial	ADP- ribosiltransferase	GDH, IDE, ANT2/3
Sirt5	Mitocondrial	Deacetilase	Cyt c, CPS1
Sirt6	Nuclear (heterocromatina)	ADP- ribosiltransferase, deacetilase	H3K9Ac DNA polimerase β , NF- κ B, HIF1 α
Sirt7	Nucleolar	Indefinido	RNA polymerase I, p53

Baseado em Sauve et al, 2006; Schwer & Verdin, 2008; Nakagawa & Guarente, 2011.

1.1.7. Sirt1

Diversas teorias têm sido propostas conectando a Sirt1 com o metabolismo celular, também devido ao uso de NAD^+ como co-fator. Sabe-se, por exemplo, que ocorre uma diminuição de acetilação de proteínas não-nucleares com o envelhecimento, mas essa característica é tecido-dependente (Nakamura et al, 2010). Enquanto nos hepatócitos ocorre intensa atividade metabólica como glicólise e beta-oxidação de ácidos graxos, em neurônios, por outro lado, não há a dependência da quebra de ácidos graxos, sendo assim, não se observa diminuição de acetilação em tecido nervoso (Nakamura et al, 2010). A beta-oxidação, neste contexto, muda significativamente o equilíbrio $[\text{Acetil-CoA}]/[\text{CoA}]$ e $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$. Isso irá influir na atividade de enzimas reguladoras do padrão epigenético. Acetiltransferases, por exemplo, têm como doador Acetil-CoA para realizar a acetilação de histonas, enquanto as sirtuínas utilizam NAD^+ como acceptor final (Imai, 2009a).

Desta forma, tal raciocínio pode ser usado em diversas condições experimentais. Em animais idosos ocorre uma diminuição da concentração de NAD^+ e, conseqüentemente, inibição da atividade da Sirt1 (Imai, 2009 a, b; Ghosh et al, 2010), o que leva à instabilidade genômica (Gonzalo, 2010). Em experimentos envolvendo restrição calórica, por outro lado, há abundância de NAD^+ , que por sua vez estimula a atividade da Sirt1 (Dominy Jr. et al, 2010). Porém, no caso de diabetes, esses resultados ainda são controversos, uma vez que foram verificadas diferenças não apenas entre diferentes órgãos, mas também entre modelos experimentais (Nakamura et al, 2010).

A existência de uma ponte entre o metabolismo celular e a transcrição gênica torna a Sirt1 e a PGC-1 α moléculas chaves no entendimento dos fenômenos celulares. Somado a isso, o fato de a Sirt1 ser modulada por uma molécula como o NAD^+ deu origem à teoria do “Mundo NAD”, na qual se diz que “moléculas reguladoras universais”, como a Sirt1, influenciariam na produção e/ou secreção de hormônios ou fatores humorais chaves. Um desses fatores seria o

metabólito precursor do NAD^+ , a nicotinamida mononucleotídeo (NMN). E uma vez que são suscetíveis às mudanças na síntese de NAD^+ , as células β - pancreáticas e neurônios são os maiores candidatos a um papel predominante na regulação da longevidade em mamíferos (Imai, 2009b).

1.1.8. Sirt6

Sirt6 é também uma sirtuína nuclear relacionada com o envelhecimento. Camundongos *knockout* para essa proteína apresentam grande instabilidade genômica, levando a um fenótipo de envelhecimento precoce e morte prematura (Mostoslavsky et al, 2006; Xiao et al, 2010; Nakagawa & Guarente, 2011). Diferente da proteína Sirt1, a Sirt6 atua preferencialmente como ADP-ribosiltransferase pela sua região N-terminal, enquanto a sua porção C-terminal é a principal responsável pelo seu posicionamento nuclear (Tennen et al, 2010). Foi observada, no entanto, uma pequena atividade de deacetilase apenas nos sítios H3K9Ac e H3K56Ac posicionados preferencialmente em regiões teloméricas ou onde haja quebra de DNA (Nakagawa & Guarente, 2011). Devido a isso, considera-se que a Sirt6 desempenhe papel no sistema de reparo de danos no DNA, uma vez que regula também a acessibilidade de enzimas reparadoras aos sítios danificados (Mostoslavsky et al, 2006; Lombard et al, 2008; McCord et al, 2009; Nakagawa & Guarente, 2011; Tennen & Chua, 2011).

Um dos principais causadores de danos no DNA são as espécies reativas de oxigênio (*“reactive oxygen species”*, ROS), as quais podem ser produzidas ou por resultado da auto-oxidação da glicose, ou pelo intenso metabolismo celular, ou mesmo pela presença de outros produtos glicosilados. Danos no DNA causados por stress oxidativo são extremamente comuns no diabetes, quando há alta concentração de glicose tanto intracelular quanto extracelular (Maiese et al, 2007).

Há evidência, também, da ação da Sirt6 no metabolismo celular, uma vez que a inibição dessa proteína provoca um aumento na sensibilidade de órgãos periféricos à insulina, levando camundongos à morte por hipoglicemia. No fígado a inibição de Sirt6 leva a um aumento na taxa de glicólise, na síntese de

triglicerídeos, e à diminuição da β -oxidação, enquanto sob restrição calórica observa-se um aumento na abundância dessa proteína, assim como de Sirt1 (Kim et al, 2010).

1.1.9. Sirt7

Sirt7, outra proteína da família das sirtuínas, localiza-se preferencialmente nas regiões nucleolares. Ela encontra-se expressa em todos os tecidos, com exceção do tecido muscular esquelético, e é especialmente abundante em tecidos de alta atividade metabólica, como o fígado (Ford et al, 2006). Diferente da Sirt1 e Sirt6, a Sirt7 não apresenta atividade de deacetilase ou de ADP-ribosilase (Voelter-Mahlknecht et al, 2006; Vakhrsheva et al, 2008), mas é dependente de NAD^+ , embora a participação deste nas atividades da Sirt7 ainda seja desconhecida (Ford et al, 2006). No nucléolo, há evidências de associação da Sirt7 tanto com o promotor e regiões transcritas do rDNA quanto com a proteína RNA-polimerase I, junto à qual Sirt7 exerceria uma ação ativadora da transcrição, diferentemente de Sirt1, a qual exerce um papel inibidor (Ford et al, 2006; Murayama et al, 2008; Grob et al, 2009).

O nucléolo é uma região nuclear onde RNA ribossomais são sintetizados, processados e organizados. A polimerase I sintetiza os RNAs ribossomais e sua atividade é regulada pelo ciclo celular (Grob et al, 2009). Com o envelhecimento há um desligamento do gene 45S da matriz nuclear, evidenciado por seu reposicionamento quando obtidos halos de fibras de cromatina estendida, indicando diminuição da transcrição, uma vez que em animais adultos-jovens esses genes se mantêm aderidos à matriz nuclear (Moraes et al, 2010). Somadas a isso, foram constatadas outras alterações na atividade e na estrutura do nucléolo durante o envelhecimento como, por exemplo, decréscimo na síntese de RNA (Park & Buetow, 1990; Ma & Nagata, 1990) e alterações no formato do nucléolo, indicando funcionamento alterado (Malatesta et al, 2003).

1.2. O Diabetes mellitus

1.2.1. Generalidades

A constatação do diabetes na humanidade data de 1500 A.C., embora sua denominação tenha sido atribuída por Aretaeus, médico romano dos anos 30-90 da era cristã e signifique “passar através”, em referência à poliúria apresentada pelos pacientes afetados. Cullen (1709-1790) acrescentou pela primeira vez o adjetivo mellitus a fim de distinguir o diabetes mellitus do insípido. Posteriormente, Claude Bernard (1837-1878) descobriu a função glicogênica do fígado e atribuiu ao diabetes um excesso de produção de açúcar por este órgão (Arduino, 1980a). Em 1869, Langerhans descobriu ilhotas celulares no tecido pancreático, contudo sua existência foi correlacionada com a doença apenas em 1900, por Opie. A descoberta da insulina em 1922 constituiu um marco na história do diabetes e a maior conquista no tratamento da doença, o que conferiu aos pesquisadores Banting e Macleod o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1923. Desde então, numerosas descobertas e avanços no campo têm sido realizados (Arduino, 1980b).

Existem dois tipos de diabetes: o insipidus (“sem-gosto”) e o mellitus (“doce”). O primeiro tipo tem como principal característica a excreção de uma urina diluída. Nela, o paciente apresenta perda de um grande volume de água diário, consequente à secreção desregulada do hormônio antidiurético (ADH) pela hipófise. O diabetes mellitus (DM), no entanto é relacionado com a deficiência ou resistência à insulina (Arduino, 1980c; NIH, 2010).

O DM consiste em uma doença metabólica crônica de natureza ambiental e/ou genética caracterizada por hiperglicemia e glicosúria, em que o paciente apresenta deficiência relativa ou absoluta de insulina, acompanhada de quadro de poliúria, polidipsia e polifagia. Existe a discussão de que não seja apenas uma doença única e sim uma síndrome (Arduino, 1980a). De acordo com a Federação Internacional do Diabetes, esta doença afeta hoje cerca de 246 milhões de pessoas em todo mundo e estima-se que em 2050 cheguem a 380 milhões. Os

principais países com incidência dessa doença são Índia, China e EUA, sendo que o Brasil figura na 8ª posição (IDF, 2012). Há diversos fatores que contribuem para o aumento da prevalência do diabetes no mundo, entre eles o aumento da expectativa de vida mundial, dietas não saudáveis, sobrepeso, obesidade e estilo de vida sedentário (IDF, 2012).

Um indivíduo é considerado diabético quando a concentração de glicose plasmática em jejum é maior que 126 mg/dL ou quando a concentração de glicose plasmática 2 h após a alimentação for maior que 200 mg/dL (IDF, 2012).

O diabetes mellitus do tipo I (DM1), também conhecido como diabetes insulino-dependente, juvenil ou imuno-mediado, apresenta herança poligênica e é considerado uma doença autoimune, pois é causado por destruição das células β das ilhotas pancreáticas mediada por linfócitos T (Zollner & Pavin, 1994; IDF, 2012). Dessa forma, a principal estratégia para controle do DM1 é a injeção de insulina exógena (IDF, 2012).

1.2.2. O Modelo de camundongos NOD

A linhagem de camundongos NOD (*Non-Obese Diabetic*) foi originada de um modelo para estudo de cataratas, sendo posteriormente selecionada por cruzamentos endogâmicos. Esta linhagem se revelou um modelo para o estudo do DM1, pois os animais apresentam infiltração linfomononuclear no pâncreas endócrino já nas primeiras semanas de vida. Há, também, o envolvimento da imunidade humoral, uma vez que foram constatados nesses camundongos, auto-anticorpos, como anti-ilhota e anti-insulina, entre outros (Signore et al, 1989).

A linhagem NOD caracteriza-se por apresentar hipoinsulinemia, hiperglucagonemia (indicando uma destruição seletiva das células β pancreáticas) e diferença marcante entre os sexos. Há uma prevalência de 80% nas fêmeas para o desenvolvimento da doença contra menos de 20% nos machos. O aumento da glicemia ocorre abruptamente, próximo da 30ª semana de vida do animal

(Makino et al, 1980; The Jacksons Laboratory, 2010). Contudo, a diminuição dos níveis de insulina pode iniciar-se já na 12^a semana de vida (The Jacksons Laboratory, 2010).

1.2.3. O modelo de cultura de células HepG2

As células HepG2 são originadas de um hepatocarcinoma humano proveniente de um adolescente de 15 anos. Essas células são hiperdiploides ($n = 50-60$ cromossomos) pela adição dos cromossomos 2, 14, 17, 20 entre outros fragmentos cromossômicos (Chandrasekaran et al, 2010; Iyer et al, 2010; Pang et al, 2011). Somado a isso, essas células apresentam um aumento nas taxas de divisões celulares conforme a composição do meio de cultura: em meio DMEM com 25 mM de glicose o período de divisão é de $19 \pm 0,8$ h, enquanto à 11 mM é $30,7 \pm 0,5$, mostrando uma resposta proliferativa glicose-dependente (Domenis et al, 2012)

Sabe-se que células tumorais apresentam uma utilização de glicose diferenciada de células normais, uma vez que exibem fermentação da glicose mesmo com quantidades suficientes de oxigênio. Isso é denominado efeito Warburg, o qual se caracteriza pela secreção de lactato por glicólise aeróbica ao invés da degradação da glicose em gás carbônico pela fosforilação oxidativa (Heiden et al, 2009). Isso ocorre principalmente porque a formação em lactato, devido ao excesso de glicose, permite uma incorporação mais rápida de carbono na biomassa celular, e uma vez que para a maioria das células proliferativas a disponibilização de nutrientes não se mostra como um fator limitante, não há pressão seletiva para a produção de mais ATP (Heiden et al, 2009). No entanto, apesar das células HepG2 apresentarem características tumorais, elas também são responsiva à insulina, a estímulos inflamatórios e a tratamentos com maiores concentrações de glicose, sendo utilizadas até para estudar os efeitos da hiperglicemia sobre o metabolismo de hepatócitos em situações de simulação de *diabetes mellitus* do tipo 2, mostrando-se assim, um modelo interessante de

estudo (Roth et al, 2001; Pivovarova et al, 2009; Iyer et al, 2010; Samanez et al, 2012).

1.2.4. Diabetes e a cromatina de hepatócitos

Apesar de o pâncreas ser o órgão de início do diabetes mellitus, o fígado tem um papel central no metabolismo geral do organismo e é um dos principais responsáveis pelo processamento da glicose. No fígado a insulina atua principalmente na regulação da degradação do glicogênio (glicogenólise), antagonizando as fosforilases responsáveis por essa reação, bem como a ação dos hormônios promotores da gliconeogênese. Dessa forma, a insulina exerce um efeito hipoglicemiante, aumentando a utilização periférica da glicose e diminuindo seu acúmulo no fígado (Milech, 1980). Em um quadro de diabetes onde haja falta da ação da insulina, as fosforilases responsáveis pela degradação do glicogênio são estimuladas e elevam a glicemia (Milech, 1980).

A hiperglicemia severa instalada em camundongos NOD provoca um aumento na ploidia dos hepatócitos e diminuição na compactação da sua cromatina (Mello et al, 2009; Ghiraldini et al, 2012). A poliploidia, em especial, tem sido considerada como uma ferramenta evolutiva eficaz na adaptação celular, metabólica, entre outros, atuando como mecanismo protetor contra apoptose, e a danos no DNA induzidos por estresses oxidativos (Anatskaya & Vinogradov, 2007). O maior conteúdo de DNA, neste caso, poderia vir a alterar o perfil de expressão de genes de interesse e prolongar a sobrevivência celular mesmo em condições desfavoráveis (Gorla et al, 2001). Observou-se também em camundongos NOD hiperglicêmicos, uma diminuição na produção de RNA, o que sugeriria diminuição na transcrição e na produção de proteínas neste material (Mello et al, 2009). Os dados de poliploidia, bem como de supraorganização cromatínica estimada por análise de imagem, obtidos para animais diabéticos mostravam um padrão semelhante, embora não idêntico, ao reportado para camundongos idosos (Moraes et al, 2007; Mello et al, 2009; Ghiraldini et al, 2012).

Essas evidências indicam que o *diabetes mellitus* poderia apresentar um fenótipo envelhecido precocemente.

A suspeita de um envelhecimento precoce se acentua quando é observado que a mesma sinalização promovida pelo IGF-1/insulina potencializa o crescimento e o desenvolvimento do indivíduo no início da vida, acelerando o processo de envelhecimento ao final desta. Estudos com camundongos *dwarf* mostraram que uma vez inibida essa sinalização, os animais apresentavam um aumento do tempo de vida de 20-70% (Salminen & Kaarmiranta, 2010) e semelhanças fisiológicas a animais sob restrição calórica (Cohen et al, 2004). Este fato poderia estar associado às mudanças na estrutura da cromatina de animais diabéticos e na expressão de genes chaves no metabolismo celular. *Igfbp1*, por exemplo, codifica a proteína IGF *binding factor* 1 e é regulado negativamente tanto de forma direta pela ação de Sirt1 como indireta, via FoxO1 (Lemieux et al, 2005; Li et al, 2008). FoxO1 é um fator de transcrição deacetilado por Sirt1, que atua como redutor da insensibilidade à insulina e como coativador de PGC1- α no fígado (Van der Vos & Coffey, 2008). *ApoE*, por sua vez, codifica a proteína Apolipoproteína E, a qual participa do metabolismo de lipídeos. Sua ausência em camundongos *knockout* aumentaria a susceptibilidade para o desenvolvimento do diabetes (Li et al, 2011).

1.3. O envelhecimento

O envelhecimento da população mundial tem sido alvo de constantes debates tanto nas esferas governamentais, quanto acadêmicas. Estima-se que atualmente a porcentagem de pessoas acima de 65 anos corresponda a 7,8% contra 26,5% de crianças na faixa de 0-14 anos. Estima-se também que em 2050 a porcentagem de indivíduos idosos se eleve para 16,7%, um aumento de 214% (US Census Bureau, 2010). As estatísticas brasileiras revelam a mesma tendência mundial com uma velocidade ainda maior: a faixa da população idosa saltará de 9,98% para 29,75% em 2050, representando um aumento de 298% (IBGE, 2010).

O aumento na expectativa de vida de 70,43 para 81,29 anos (IBGE, 2010), ocasionado pela queda combinada das taxas de fecundidade e mortalidade está se refletindo em políticas públicas de saúde para a terceira idade. Na academia, inúmeros são os trabalhos que visam tanto entender o processo e implicações do envelhecimento quanto mecanismos para retardá-lo.

1.3.1. Cromatina e envelhecimento

O processo de envelhecimento celular é resultado de vários fatores tanto intrínsecos, como diminuição telomérica e ação de moduladores epigenéticos, quanto extrínsecos, como formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ação de fatores mutagênicos e sinais endócrinos (Shin et al, 2010). Isso leva a alterações na cromatina, modificando sua estrutura e organização o que, consequentemente, afetará a expressão diferencial de genes.

Em células somáticas os fatores epigenéticos são fundamentais para a remodelação da cromatina. Durante o envelhecimento observa-se desde a perda da heterocromatina perinuclear, à formação de SAHFs (*senescence-altered heterochromatin foci*), ao aumento de H4K20me3 e à diminuição de Sirt1 (Sarg et al, 2002; Mehta et al, 2007; Nakamura et al, 2010; Shin et al, 2010). Ocorre também uma perda global da metilação de DNA, por diminuição da ação de Dnmt1. Contudo há um aumento na metilação regional de DNA em porções promotoras de genes, por ação de Dnmt3b (Sedivy et al, 2008; Shin et al, 2010). De fato, em fibroblastos humanos senescentes foi observado aumento na área nuclear e nucleolar além de mudanças na posição dos cromossomos: cromossomos ricos em genes, que em indivíduos jovens posicionavam-se no centro nuclear, passam a ter uma posição periférica (Mehta et al, 2007).

Em hepatócitos de camundongo nosso grupo de trabalho confirmou os achados de que a área nuclear e o conteúdo de DNA aumentam com o envelhecimento (Moraes et al, 2007), fenômeno natural consequente do processo de poliploidização que ocorre neste órgão. De fato, 80-90% dos hepatócitos de

ratos e camundongos idosos apresentam poliploidia em comparação à apenas 30-40% em humanos (Celton-Mourizur et al, 2010). Foi também observado que apesar da poliploidização levar ao aumento de cópias do gene 45S, essas não se encontram ativas, pois se destacavam da matriz nuclear com o envelhecimento (Moraes et al, 2010).

2. Objetivos

Embora algum conhecimento sobre a remodelação cromatínica em hepatócitos sob o efeito da hiperglicemia e do envelhecimento já tenha sido levantado, conforme relatos mencionados no capítulo anterior, há muitos pontos ainda não esclarecidos sobre esse assunto. O presente trabalho teve, portanto, os seguintes objetivos:

- 1- Investigar em maior profundidade a poliploidização e a remodelação cromatínica em camundongos em condições de hiperglicemia e envelhecimento, usando-se métodos de análise de imagem e ensaio por nuclease microcócica (MNase).
- 2- Avaliar comparativamente a abundância e a atividade da proteína Sirt1, assim como a disponibilidade de NAD^+ , relacionando-as com a abundância de modificações nas suas histonas-alvo e de PGC-1 α .
- 3- Determinar a abundância de Sirt6 e de Sirt7, relacionando-a com uma possível ocorrência de danos no DNA e alterações morfológicas no nucléolo, respectivamente, levando-se em conta os dados de disponibilidade de NAD^+ obtidos.
- 4- Avaliar e comparar a expressão gênica diferencial em hepatócitos nas condições propostas.
- 5- Avaliar a expressão gênica e as marcações epigenéticas dos genes *ApoE*, *Igfbp1* e *Foxo1* em modelo de cultura celular obtida de hepatocarcinoma (células HepG2) simulando hiperglicemia, após retorno à normoglicemia e com inibição de sirtuínas por nicotinamida, relacionando os achados com o fenótipo nuclear nessas células.

3. Materiais e Métodos

3.1. Hepatócitos de camundongo

3.1.1. Animais

Camundongos fêmeas das linhagens NOD e Balb/c obtidos do Cemib/UNICAMP foram mantidos em biotério climatizado recebendo ração extrusada (Nuvital®) e água *ad libitum* durante todo o período do experimento. Para os experimentos de expressão gênica, camundongos das linhagens NOD e Balb/c, foram mantidos no biotério Biomedical Research Facilities do Edinburgh Cancer Research Center (ECRC, UK) também recebendo ração e água *ad libitum*. Neste caso, a colônia de camundongos Balb/c já estava estabelecida, sendo que os animais NOD haviam sido importados do Instituto Charles Rivers (Itália).

Todos os camundongos NOD tiveram a glicemia monitorada pelo aparelho Accu Chek Performa (Roche Diagnostica® Indianapolis, USA) em dia e horário pré-determinados para acompanhamento da evolução do quadro do diabetes. Para verificação de infiltração linfocitária, foram preparadas lâminas histológicas de pâncreas de alguns animais NOD diabéticos.

Compuseram o grupo 1 (adulto-jovens) cinco animais de ambas as linhagens com oito semanas de vida com o objetivo de se obter animais adulto-jovens normoglicêmicos. O grupo 2 (diabetes moderado) foi constituído de cinco animais com glicemia oscilando entre 200-400 mg/dL por no mínimo três semanas, com idades oscilando entre 18 e 38 semanas. Neste grupo, além do controle composto por camundongos Balb/c de mesma idade, foram incluídos animais NOD de mesma idade e não diabéticos (glicemia <190 mg/dL). Dessa forma, dispusemos de um controle intra-linhagem para melhor comparação de dados entre NODs diabéticos e Balb/c normoglicêmicos. Para o grupo 3 (diabetes severo) foram utilizados cinco camundongos NODs com glicemia superior a 500 mg/dL por três semanas consecutivas. A idade desses animais oscilou entre 18 e

28 semanas. Controles de Balb/c e NODs não diabéticos de mesma idade foram incluídos. O grupo 4 foi composto por animais Balb/c envelhecidos de 56 semanas.

Para os experimentos de expressão gênica, compuseram o grupo 1 (adultos-jovens) três animais Balb/c com nove semanas de vida. O grupo 2 (diabetes severo) constituiu-se de dois animais com glicemia <500 mg/dL por no mínimo três semanas, sendo a idade desses animais de 16 semanas com a adição de uma replicata técnica para a obtenção de um “n” experimental de três. Neste grupo, foram incluídos animais NOD normoglicêmicos de mesma idade (glicemia <110 mg/dL) como controle. Camundongos Balb/c de 47 semanas constituíram o grupo 3.

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e imediatamente após, o fígado foi retirado e lavado em PBS a 4°C.

Os protocolos referentes ao uso e cuidados com os animais mantidos na Unicamp foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição e se acham de acordo com as diretrizes do Conselho Canadense de Cuidados aos Animais (Protocolo nº 1608-1). Os protocolos referentes ao uso e cuidados com os animais no biotério do ECRC foram realizados sob a licença PPL 60/3785 fornecida ao Dr. Dirk-Jan Kleinjan.

3.1.2. Fixação e Citoquímica

Para análise dos fenótipos nucleares, decalques de fígado de camundongos foram fixados e corados com a reação de Feulgen conforme descrição no artigo científico 1 (Anexo I).

3.1.3. Análise de imagens por sistema vídeo

Núcleos de hepatócitos corados pela reação de Feulgen tiveram seus parâmetros texturais e geométricos estabelecidos em analisador de imagem conforme descrito no artigo científico 1 (Anexo I).

3.1.4. Preparação dos fígados para ensaios moleculares

3.1.4.1. Isolamento de núcleos de hepatócitos

Fígados previamente picados foram homogeneizados manualmente em homogeneizador Braun (Alemanha) em tampão TKM (50 mM Tris HCl, pH 7,5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂) gelado suplementado com 0,25 M sacarose, 2 mM DTT, 10 mM butirato de sódio, 1 mM PMSF e 1 mM de aprotinina (tampão A) (Matunis, 2006). Posteriormente foi preparado gradiente com tampão TKM com 2,3 M de sacarose contendo os mesmos inibidores de proteases supracitados (tampão B) e as amostras então ultracentrifugadas (Beckman®, Brea, USA) a 105.000 g por 30 min. Os núcleos, posicionados na porção inferior dos tubos foram ressuspensos em tampão A, contendo 2% de Triton X-100, e centrifugados novamente a 800 g por 5 min para eliminação de resíduos de retículo endoplasmático (Blobel & Potter, 1966). O sobrenadante era descartado e o material era novamente ressuspensionado em tampão A, contendo 30% de glicerol para manutenção da integridade dos núcleos (Blobel & Potter, 1966). Todo o procedimento foi realizado à 4°C. A amostra era guardada a -20°C para posterior análise (Blobel & Potter, 1966).

3.1.4.2. Quantificação das amostras

Para a quantificação de DNA, alíquotas de cada amostra foram diluídas em água deionizada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com luz UV (Diode Array Spectrophotometer, HP®, USA), utilizando-se cubeta de quartzo e $\lambda = 260$ nm. Para a quantificação de proteínas, alíquotas das amostras foram diluídas em corante de Bradford (Bradford, 1976) e analisadas em espectrofotômetro de luz visível (Quimis®) em $\lambda = 590$ nm. Utilizando-se os valores de absorbância obtidos após tratamento com o corante de Bradford, foi realizada uma nova quantificação em gel SDS-PAGE 10% corado com Comassie Blue-R. Este foi escaneado e a quantidade de proteína foi determinada com o software ImageJ®.

3.1.5. Teste da nuclease microcócica

Para a avaliação de graus de acessibilidade da cromatina, os núcleos isolados foram submetidos à digestão com nuclease microcócica. A reação, assim como a extração de DNA e análise de seus produtos em gel de agarose acham-se descritos no artigo científico 1 (Anexo I).

3.1.6. Análise das proteínas modificadoras de cromatina, das histonas modificadas e do fator de transcrição PGC-1 α .

3.1.6.1. Anticorpos

Os anticorpos primários utilizados para as análises por Western Blotting e/ou imunofluorescência foram: anti-Sirt1 (Santa Cruz[®], Santa Cruz, USA), anti-PGC-1 α (Millipore[®], Billerica, USA), anti-Sirt6 (Abcam[®] Cambridge, UK), anti-Sirt7 (Abcam[®]), anti-acetyl-histone H3 (Ac-Lys⁹) (Abcam[®], Cambridge, UK), anti-acetyl-histone H4 (Ac-Lys¹⁶) (Abcam[®]), anti-acetyl-histone H1.4 (Ac-Lys²⁶) (Sigma[®], Saint Louis, USA), anti-acetyl-histone H3 (Ac-Lys¹⁴) (Millipore[®]). Como controle de carga, foi utilizado o anticorpo anti-histone H4 (Millipore[®]) para controle dos anticorpos para modificações na histona H3 e o anticorpo anti-histone H3 (Millipore[®]) para controle dos anticorpos para modificações na histona H4 e para Sirt1, Sirt6, Sirt7 e PGC-1 α . Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG mouse e anti-IgG rabbit com fluorocromos Texas Red e fluoresceína (Millipore[®]), para imunofluorescência, e anti-IgG mouse, anti-IgG goat e anti-IgG rabbit (Millipore[®]) com peroxidase para Western Blotting.

3.1.6.2. Imunofluorescência

Para avaliação da localização nuclear das proteínas Sirt1 e PGC-1 α e das modificações de histonas H3K9Ac e H4K16Ac por imunofluorescência, lâminas com decalques de fígado foram fixadas por 10 min em paraformaldeído a 4% em PBS. Após lavagem em PBS, permeabilização com Triton X-100 (Merck[®], Darmstadt, Germany) 0,2% por 10 min e bloqueio com soro fetal bovino a 5% por 30 min, as lâminas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários à 4°C.

Após lavagem em PBS, os preparados foram incubados com os anticorpos secundários por 2 h (25°C) e em seguida novamente lavados, contracolorados com DAPI e montados em Vectashield. As imagens foram captadas em câmera digital Axiocam em fotomicroscópio Zeiss Axiophot II (Oberkochen, Germany).

3.1.6.3. *Western Blotting*

Com o intuito de se analisar a abundância relativa das proteínas de interesse foram obtidos Western Blots. Para tal, os núcleos foram ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,06M pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0,025% azul de bromofenol), fervidos por 5 min e submetidos à eletroforese vertical em SDS-PAGE à 36 mA seguido por transferência para membrana de nitrocelulose (Applied Biosystem[®], Foster City, USA). Para a análise das proteínas PGC-1 α , Sirt1, Sirt6 e Sirt7, foram utilizados géis de poliacrilamida a 10% e a transferência ocorreu por 60 min à 250 mA a 4°C. Para a análise de histonas modificadas foi utilizado gel a 17% e a transferência ocorreu por 90 min à 250 mA a 4°C. As membranas foram, então, bloqueadas por 2 h com leite em pó desnatado (Molico[®]) diluído em tampão TBST (Tris-HCl 0,01M pH 8, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100). As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários em tampão de bloqueio, lavadas e novamente incubadas com os anticorpos secundários, também em tampão de bloqueio, por 2 h a 25°C. A revelação por quimioluminescência foi realizada como o kit “ECL Detection Reagents” (Amersham[®], Pittsburgh, USA), de acordo com protocolo do fabricante. Posteriormente as membranas foram reveladas com filme fotográfico Amersham Hyperfilm ECL (Amersham[®]) com reveladores e fixadores Kodak[®] (Kodak[®], Rochester, USA) (Kurien & Scofield, 2006). A análise dos resultados obtidos foi efetuada usando-se software ImageJ[®].

3.1.7. **Análise da atividade enzimática de Sirt1**

A atividade enzimática da deacetilase Sirt1 foi avaliada utilizando-se o kit “Sirt1 assay kit” (Sigma[®]) seguindo o protocolo do fabricante, com algumas

modificações. Para tal, os núcleos isolados de hepatócitos foram pipetados em placa preta de 96 concavidades respeitando-se a padronização por concentração de proteína previamente estabelecida pelo ensaio de Bradford. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada amostra. Foram também adicionados controles em cada placa. Após a adição dos reagentes, a placa foi incubada a 37°C por 30 min e posteriormente, após adição do revelador, seguiu-se nova incubação à 37°C por 10 min. A placa então era lida em fluorímetro de microplaca Fusion (Packard®, Meridien, USA).

Neste experimento e nos seguintes, não foi incluído o grupo de diabetes moderado, uma vez que as amostras desses animais não apresentaram diferença significativa em relação a seus controles na abundância dessa proteína durante os ensaios de Western Blotting.

3.1.8. Medidas da razão NAD^+/NADH

Para a avaliação da abundância de NAD^+ , foi utilizado o kit NAD^+/NADH Assay Kit (Abcam®, Cambridge, UK), seguindo-se o protocolo do fabricante. Em resumo, pequenos fragmentos de fígados armazenados à -80°C foram pesados para iniciar o processamento do material para o ensaio. Estes fragmentos, então, foram lavados e homogenizados em tampão de extração fornecido no kit. O material foi dividido em duas partes para realizar a detecção de NAD total (NADH e NAD^+) e NADH . Para a avaliação de NADH , as amostras foram deixadas em banho-maria a 60° C por 30 min. Posteriormente, os preparados, em duplicata, foram distribuídos em placas de 96 cavidades e a eles foram adicionados dois componentes do kit: *NAD cycling buffer* e *NAD cycling enzyme mix*. As amostras foram incubadas por 5 min e, então, foi adicionado revelador NADH em todos os poços. Após 3 h da adição do revelador, foi efetuada medida em leitor de ELISA com excitação a 450 nm (VersaMax™, Sunnyvale, USA). A razão NAD^+/NADH foi calculada com a seguinte fórmula: $[\text{NADt}-\text{NADH}]/\text{NADH}$.

3.1.9. Teste do Cometa

Para a avaliação de possível fragmentação de DNA pela hiperglicemia, fígados frescos foram homogeneizados em tampão de Hanks (0,137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃) e filtrados em gaze dupla. Parte do homogeneizado foi incubado com peróxido de hidrogênio (33 mM) por 30 min à 4°C, como controle positivo, uma vez que este causa danos oxidativos semelhantes aos provocados por espécies reativas de oxigênio (Wijeratne et al, 2005).

As amostras foram então diluídas em agarose de baixo ponto de fusão e pipetadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose a seguir deixadas em geladeira por 10 min para solidificação da agarose e incubadas em tampão de lise (NaCl 2.5M; EDTA 100 mM; Tris 1 mM; DMSO 10% e Triton X-100 1%; pH 10 ajustado com NaOH) por 24 h a 4° C.

As amostras foram lavadas em PBS gelado e deixadas em tampão de eletroforese à 4°C (300 mM NaOH; 1 mM EDTA, pH 13) por 30 min e posteriormente submetidas à eletroforese horizontal por 20 min à 25V, 300 mA, seguida por três banhos de 5 min em solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto.

Para análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,02 mg/mL) e observadas em microscópio de fluorescência com filtro de $\lambda = 560$ nm. Os nucleoides foram classificados visualmente em cinco categorias (níveis 0–4) com base na extensão da cauda (“cometa”), de modo que nucleoides sem cauda foram classificados como de nível 0, enquanto nucleoides com cauda longa e difusa e cabeça de tamanho reduzido foram classificados como de nível 4. Os nucleoides que apresentaram características de formação de cauda intermediárias foram classificados como de classes 1, 2 ou 3 (Jaloszynski et al, 1997, Ghiraldini & Mello, 2010). Para cada condição experimental foram contados 500 nucleoides para um total de cinco animais.

Para o cálculo do índice de Dano ao DNA foi utilizada a fórmula de Jaloszynski et al (1997):

Dano = $(1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / (\text{total de células analisadas} / 100)$, na qual N1–N4 representam o número de nucleoides de classes de dano 1 a 4 (Ghiraldini & Mello, 2010).

3.1.10. Técnica de AgNOR

Decalques de fígado fixados em etanol/ácido acético glacial (3:1 v/v) foram permeabilizados em solução de glicerol 4 M e 1% Triton X-100 por 20 min à 37° C, e a seguir tratados com solução contendo duas partes de solução aquosa de nitrato de prata 50% e uma parte de gelatina a 2% e solução aquosa de ácido fórmico a 1% por 10 min a 37°C (Mello et al, 2008).

Esta técnica promove a coloração específica de proteínas nucleolares que se encontravam ativas no momento de fixação das células, como a nucleolina, entre outras, necessárias para transcrição e processamento inicial do rDNA.

Para avaliação das áreas que apresentavam resposta AgNOR positivas, foram obtidas imagens em microespectrofotômetro de varredura automática Zeiss (Oberkochen, Alemanha) com interface a microcomputador com hardware e software adequados. As condições operacionais foram: movimento de varredura predominantemente monodirecional; objetiva Planapo 63/0,90; optovar 1,6, diafragma de medida com diâmetro 0,2 mm; lâmpada de halogênio 100 W/12V; fonte de luz estabilizada; modulador de luz compatível; $\lambda = 555 \text{ nm}$, obtido com régua monocromadora Schott; fotomultiplicador R-928; microcomputador Pentium III. Pontos individuais de medida com absorbância $\leq 0,020$ foram considerados *background* e removidos da imagem nuclear. O valor de *cutoff point* de 0,200 foi escolhido após teste preliminar para avaliação das áreas AgNOR positivas. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

1. S_T , área nuclear absorvente em μm^2
2. S_c , área em μm^2 com valores de absorbância acima do *cutoff point* escolhido.
3. $S_c\%$, área da imagem AgNOR+ em relação à área nuclear total.

Foram medidos 75 núcleos para um total de três animais diferentes para cada condição experimental.

3.1.11. Extração de RNA de hepatócitos de camundongos para ensaios de expressão gênica

Para análise de expressão gênica foi isolado o RNA total. Para tal, fígados de camundongos, congelados em nitrogênio líquido, foram triturados em recipiente estéril e resfriados em gelo seco. O material foi pesado e 0,5 g utilizados para realizar a extração de RNA seguindo o protocolo do fabricante do Tri-Reagent (Sigma®) com algumas modificações: após a primeira separação da amostra foi realizada nova separação com o mesmo volume de Tri-Reagent. A etapa extra foi necessária uma vez que a fase aquosa ainda apresentava-se turva. Após a extração, 100 µL da amostra foram purificadas utilizando-se RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha) adicionando-se à amostra 350 µL de tampão RLT (componente do kit) e 250 µL de etanol 100%. A mistura foi colocada em uma coluna do kit e centrifugada a 10.000 rpm por 15 s. Posteriormente, a amostra foi submetida a tratamento com DNase Turbo (Ambion®, Austin, USA) em tampão RDD (componente do kit RNase-Free DNase Set, Qiagen®) por 15 min, com a finalidade de extração de qualquer DNA genômico remanescente. Realizou-se então a quantificação em aparelho NanoDrop-100 (Thermo Scientific®, Waltham, USA). Para a avaliação da qualidade do RNA extraído, uma alíquota das amostras em tampão de amostra (0,05% azul de bromofenol, 4 mM EDTA, 2,64% formaldeído, 20% glicerol, 0,3% formamida) foi submetida à eletroforese em gel de agarose específico para RNA (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA, 0.66% formaldeído, pH 7,0) por 1 h a 60V e posteriormente analisado em transiluminador ultravioleta (UVP BioImaging Systems®, Upland, USA).

Após avaliação preliminar da qualidade do RNA extraído, as amostras destinadas à análise em micro-arranjo de expressão foram novamente analisadas em aparelho Agilent 2100 BioAnalyser (Agilent®, Santa Clara, USA) para a

obtenção de um valor “RIN” (*RNA Integrity Number*), indicativo da integridade do RNA extraído para posterior processamento.

3.1.12. *Microarray* de expressão

A transcrição reversa para produção de cDNA, sua amplificação e marcação por sonda com biotina foi realizada utilizando-se o kit Illumina TotalPrep RNA amplification Kit (Ambion®) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram armazenadas à -80 °C até análise.

O ensaio de expressão gênica por *microarray* foi realizado utilizando-se micro-arranjos Mouse WG – 6v2 (Illumina®, San Diego, USA) na Clinical Research Facility do Western General Hospital em Edinburgh (UK). A fim de se checar a qualidade do resultado final, foi analisado um total de sete controles incluídos no micro-arranjo de expressão, os quais cobriram todos os aspectos da técnica, desde replicatas biológicas, marcação com biotina, hibridização, até geração de sinal. Foram realizadas análises de expressão diferencial comparativa entre os grupos adultos-jovens *versus* idosos e normoglicêmicos *versus* hiperglicêmicos. Os dados foram normalizados e o *background* removido utilizando-se software GenomeStudio (Illumina®).

A análise estatística LIMMA da expressão gênica diferencial foi realizada com o software R (Bioconductor, Seattle, USA) e a análise posterior desses genes com expressão significativamente diferente (*Fold Change* > 1,6; $P_{<0,05}$) foi realizada usando-se o software IPA® (Ingenuity Systems, Redwood City, USA).

Os resultados gerados pelo microarranjo de expressão foram parcialmente validados pelos resultados de qPCR para os genes *Foxo1*, *ApoE* e *Igfbp1* das mesmas amostras de RNA de hepatócitos de camundongo.

3.1.13. *Primers* para análise de expressão gênica e imunoprecipitação cromatínica (ChIP) dos genes *ApoE*, *Igfbp1* e *Foxo1*.

Para os ensaios destinados a medir a expressão diferencial dos genes *ApoE*, *Igfbp1* e *Foxo1*, os *primers* foram desenhados no espaço entre exons. Para

analisar a presença de marcadores epigenéticos como H3K9Ac e H3K9me2 nos genes mencionados, foram desenhados *primers* nas regiões promotoras, levando-se em consideração o local de ligação de fatores de transcrição à região promotora e as modificações de histonas ali presentes (ENCODE Project, UCSC). Para marcação de 5-metil-citosina foi desenhado *primer* para o gene rDNA 45S, na região correspondente ao 18S (Tabela 2).

Tabela 2 – Primers para análise de expressão gênica e ChIP em hepatócitos de camundongo.

Ensaio	Gene	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
Expres- são	<i>ApoE</i>	AACCGCTTCTGGGATTACCT'	TTCCGTCATAGTGTCTCTCCA
	<i>Igfbp1</i>	AGCCCAGAGATGACAGAGGA	GTTGGGCTGCAGCTAATCTC
	<i>Foxo1</i>	GCTGGGTGTCAGGCTAAGAG	TTGCCAAGTCTGAGGAAAGG
	<i>B-Actin</i>	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	CCATCACAATGCCTGTGGTA
ChIP	<i>ApoE</i>	GTTCTCAGTGCCCCAGTACC	TGTTCTCTCCCCCTTCACAG
	<i>Igfbp1</i>	TAGCTCCTGTCCCAGTCCAT	GCTAGGACCCCAGTGTTCAA
	<i>Foxo1</i>	ACCGGTCCTCAGGAAAAAGT	ATCCTGAACCCCAGAGAGGT
	<i>rDNA 45S (18S)</i>	CGAAAGCATTTGCCAAGAAT	AGTCGGCATCGTTTATGGTC

3.1.14. Preparação de amostras de hepatócitos de camundongo para avaliação da expressão gênica por qPCR

cDNA das amostras de RNA foi preparado usando-se SuperscriptII transcriptase reversa (Invitrogen[®], Carlsbad, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, 2 µg de RNA foram adicionados a 1 µL de *primers* randômicos (hexâmetros) em 10 µL de água deionizada. A mistura foi aquecida por 10 min à 70° C e a ela foram adicionados 4 µL de 5X *1st strand buffer*, 2 µL de

0,1M DTT, 1 μ L de 10mM dNTP e então deixados à 25°C por 10 min e a 42°C por 2 min para equilíbrio dos *primers*.

Após este procedimento foi adicionado 1 μ L de SuperScriptII e a amostra deixada a 42°C por 50 min para transcrição, seguido de incubação à 70°C por 15 min para inativação da enzima. A amostra foi novamente quantificada em NanoDrop-100® (ThermoScientific, Wilmington, USA) e armazenada à -20°C para a reação de qPCR.

3.1.15. Native-ChIP em hepatócitos de camundongo

Para o ensaio de ChIP, núcleos de hepatócitos frescos foram ressuspendidos em tampão NB-R (85 mM KCl, 5,5% sacarose, 10 mM Tris pH 7,6, 1,5 mM CaCl_2 , 3 mM de MgCl_2 , 250 μ M PMSF).

Para o estabelecimento da concentração de núcleos, 5 μ L da amostra foram diluídos em 495 μ L de tampão de sonicação (5 M uréia, 2 M NaCl) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro de luz UV Ultrospec® (Amersham®, Piscataway, USA). As amostras foram igualadas a uma concentração de 10x A260 nm (1 A260 nm = 50 μ g/mL). Os núcleos foram, então, submetidos à digestão com MNase à 2, 5, 10, 20, 40 e 80 U por mL por 10 min para determinar a melhor concentração de enzima para o ensaio de ChIP (Figura 3).

A digestão foi interrompida pela adição de 15 mM de EDTA. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 s para a coleta do sobrenadante 1 (SN1) e incubadas *overnight* à 4°C em tampão TEEPEN com 5 mM de NaCl (10 mM Tris pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 250 μ M PMSF e 0,05% NP40) e novamente centrifugadas por 13000 rpm por 5 min para coleta do sobrenadante 2 (SN2). A concentração de MNase escolhida para os ensaios em hepatócitos de camundongos (60 U/ mL de amostra) foi determinada baseando-se no perfil dos fragmentos de DNA obtidos em SN1 e SN2 por corrida em gel de agarose a 1% em tampão TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA) (Figura 4).

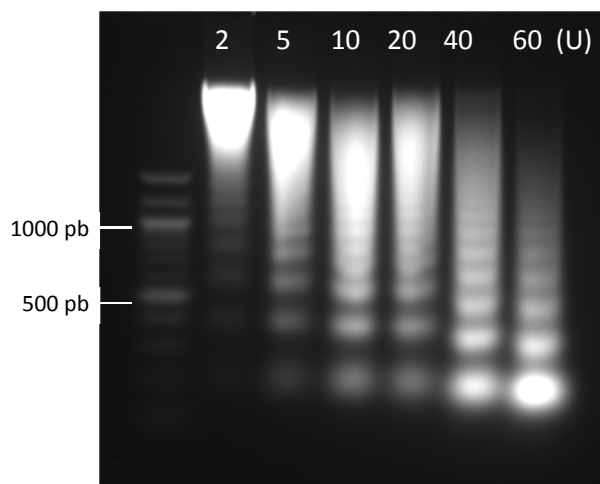


Figura 3 – Padronização da digestão por MNase. Gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato (TBE). pb, pares de base; Padrão 100 pb (New England Biolabs®).

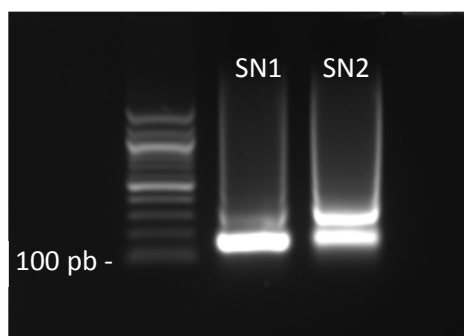


Figura 4 - Perfil de fragmentos de DNA em SN1 e SN2 obtidos após digestão com MNase (60U/mL, 10 min) em gel de agarose a 1%.

As concentrações de SN1 e SN2 para cada amostra foram medidas em tampão de sonicação, e então 2,5 µg de DNA de cada sobrenadante foram coletados e aliquotados em novo tubo com 1 mL de tampão TEEP (50 mM de NaCl). Para cada anticorpo foram preparados, um controle negativo (IgG) e um controle *input*, em alíquotas diferentes.

Para a imunoprecipitação de cromatina foram usados como carreadores *beads* magnéticos (Invitrogen®), limpos por três banhos de tampão TEEP_N com 50 mM NaCl, sendo ressuspensos e aliqotados neste mesmo tampão para ligação ao anticorpo. Os anticorpos utilizados foram anti-H3K9Ac (acetilada) (Millipore®), anti-H3K9me2 (dimetilada) (Millipore®) e anti-5-metil-citosina (Abcam®). Como controles negativos foram utilizados IgG anti-rabbit e IgG anti-mouse (Santa Cruz®). A ligação dos anticorpos aos *beads* magnéticos ocorreu em tampão TEEP_N com 50 mM NaCl *overnight* à 4°C, com agitação constante. Os *beads* ligados aos anticorpos foram adicionados nas alíquotas com cromatina e as amostras foram incubadas novamente à 4°C *overnight* com agitação constante.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 1 min e ressuspensas em tampão TEEP_N com 140 mM de NaCl, para nova centrifugação à 1500 rpm por 3 min. O precipitado foi ressuspendido em tampão TEEP_N com 200 mM de NaCl e incubado por 15 min à 4°C com agitação constante, com a finalidade de aumentar a estringência, gerando um produto mais purificado. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em tampão de eluição (TEEP com 50 mM NaCl; 1% SDS) e mantido sob agitação constante por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo para realização da extração de DNA.

O DNA das amostras foi extraído por dois ciclos de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), um ciclo de clorofórmio: álcool isoamílico (25:1) e precipitação alcóolica com 0,4 M de acetato de sódio pH 5,2 e 1 µg de glicogênio por 30 min em gelo seco ou *overnight* à -20°C.

As amostras foram lavadas em etanol a 70% e ressuspensas em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) e armazenadas a -20°C para reação de qPCR.

3.1.16. qPCR

Para cada reação foi preparada uma solução FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche®) com quantidades de cada *primer* já padronizadas previamente. Para análise de expressão diferencial, as amostras de cDNA foram diluídas em água deionizada a uma concentração de 25 ng/μL e em cada reação foram adicionados 2 μL de amostra para um total de 50 ng de cDNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata em termociclador Rotorgene 6000 Real-time Analyzer (Corbett™, Sydney, Australia). A reação de qPCR contava com 1 ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 15 s, 59°C por 30 s, 73°C por 30 s, finalizando com 94°C por 60 s para a fase de *melting*. Para análise dos resultados de ChIP, 4 μL de amostra foram adicionados à mistura de SYBR Green e *primers* totalizando 15 μL de solução final, e foram analisados em termociclador ABI 7500 Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA). A reação de qPCR contava com 1 ciclo de 95°C por 10 min, 50 ciclos de 94°C por 35 s, 59°C por 35 s, 73°C por 35 s, finalizando com 60-94°C por 60 s para a curva de dissociação (*melting*).

Para análise de expressão diferencial dos genes propostos, após reação de qPCR, foi definido o *threshold* o qual informava um valor de Ct (*thresholdcycle*) para cada amostra. De posse desses valores a expressão relativa foi quantificada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Exp = [(Ct\ controle - Ct\ experimento) - (Ct\ controle\ hk - Ct\ experimento\ hk)]^2$$

na qual:

Ct Controle: valor de Ct da amostra na condição controle (referência)

Ct experimento : valor de Ct de amostra em condição experimental

Ct controle *house-keeping* (*hk*): valor de Ct da amostra na condição controle de gene de expressão basal (β-actina).

Ct experimento *house-keeping* (*hk*): valor de Ct da amostra em mesma condição experimental do “Ct experimento” do gene de expressão basal (β-actina).

Para análise dos experimentos por ChIP, os resultados foram apresentados na forma de “% de *input*” utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de } input = [(Ct \text{ input} - Ct \text{ amostra})^2]100$$

3.2. Cultura celular de hepatocarcinoma humano

3.2.1. Cultura celular

Para o estudo da mecanística epigenética em situação de hiperglicemia, células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram obtidas do HPA Culture Collections (UK). Essas células foram cultivadas em meio D-MEM (Gibco®) com glicose (5,5 mM), suplementado com 10% SFB (Gibco®) e com adição de 1% de penicilina (10.000 UI) e glutamina (4 mM), mantidas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Durante os experimentos foi utilizado uma concentração inicial de ~5x10⁴ células/mL, levando à uma confluência de ~60%.

A fim de se observar a expressão gênica e as modificações epigenéticas em genes-alvos em uma situação de hiperglicemia mimetizando diabetes mellitus do tipo I foram utilizados os seguintes grupos experimentais (Figura 5):

- 1) **Com Insulina:** meio DMEM com 5,5 mM de glicose, 10% soro “*Charcoal dextran stripped*” (Thermo Cientific Hyclone®), 1% penicilina e glutamina com 7 µg/mL de insulina por 48 h.
- 2) **Com Glicose:** meio DMEM com 50 mM de glicose, 10% soro *stripped*, 1% penicilina e glutamina por 48 h.
- 3) **Glicose Menos:** meio DMEM com 50 mM de glicose, 10% soro *stripped*, 1% penicilina e glutamina por 48 h, seguido por retorno ao meio “com insulina” por 24 horas
- 4) **Insulina com Nicotinamida:** meio DMEM com 5,5 mM de glicose, 10% soro *stripped*, 1% penicilina e glutamina com 7 µg/mL de insulina por 48 h com adição de 5 mM de nicotinamida (Sigma®, St Louis, USA) nas últimas 6 h.

- 5) **Glicose com Nicotinamida:** meio DMEM com 50 mM de glicose, 10% soro *stripped*, 1% penicilina e glutamina por 48 h com adição de 5 mM de nicotinamida (Sigma®) nas últimas 6 h.

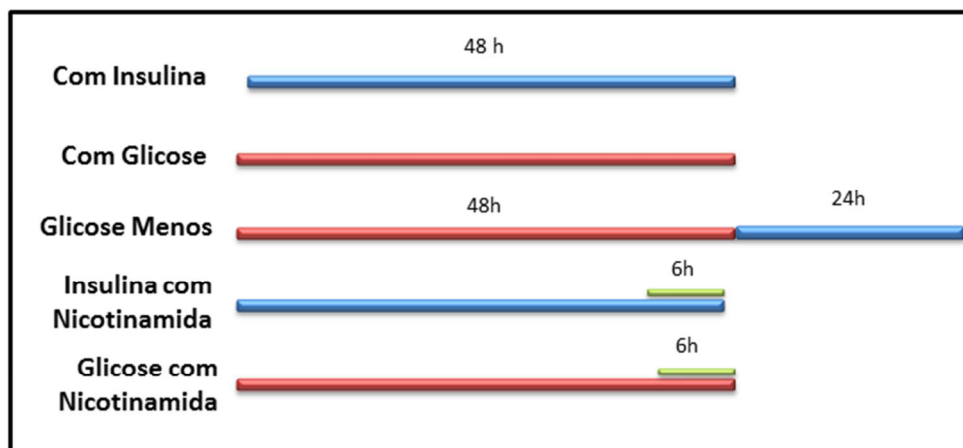


Figura 5 – Representação dos tratamentos em HepG2. Linha azul, meio normoglicêmico com insulina; linha vermelha, meio hiperglicêmico sem insulina; linha verde, tratamento com nicotinamida.

Todos os tratamentos foram realizados no mínimo em triplicata. A utilização de um soro “*stripped*” deve-se ao fato de ele ser desprovido de hormônios, incluindo a insulina (Herbet et al, 1965), o que propiciaria um meio de cultura que simularia a situação do diabetes mellitus do tipo I. Baseado no trabalho de Chandrasekaran e colaboradores (2010), a concentração e o tempo de exposição das células à glicose foram escolhidos de modo que o tratamento não afetasse a viabilidade celular.

3.2.2. Primers para ChIP e reação de qPCR

Foram desenhados *primers* para análise de expressão diferencial e ChIP com a mesma estratégia para os *primers* de hepatócitos de camundongo (Tabela 3).

Tabela 3 – *Primers* para análise de expressão gênica e ChIP em células HepG2.

Ensaio	Gene	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
Expres- são	<i>ApoE</i>	GGTCGCTTTTGGGATTACCT	TTCCTCCAGTTCCGATTTGT
	<i>Igfbp1</i>	CTGCCAAACTGCAACAAGAA	ATCCTCTTCCCATTCCAAGG
	<i>Foxo1</i>	AAGAGCGTGCCCTACTTCAA	TCCTTCATTCTGCACTCGAA
	<i>B-Actin</i>	CTACGTCGCCCTGGACTTCGA	GATGGAGCCGCCGATCCACACGG
ChIP	<i>ApoE</i>	GCCCCCTCTCCAGATTACAT	GGACACCTCGCCCAGTAATA
	<i>Igfbp1</i>	TGGATTCTAACCCCATCTCG	CTGGCCAGGCTCTTTAATTG
	<i>Foxo1</i>	AGTACTCGGCTCTGCTGCTCTGCTC	TCGCCTTCTCAGTGTTTTGA

3.2.3. Preparação de amostras de HepG2 para avaliação da expressão gênica por qPCR

A extração de RNA de células HepG2 foi realizada usando-se o kit RNeasy (Qiagen®) de acordo com protocolo do fabricante, sendo em etapa especificada; também foi realizada a limpeza On-Column de DNA genômico por digestão com DNase (Ambion®, Austin, USA).

A produção de cDNA e posterior reação de qPCR, assim como sua análise seguiram o mesmo procedimento experimental realizado para hepatócitos de camundongo.

3.2.4. Native-ChIP em células HepG2

Para o ensaio de ChIP, aproximadamente 4×10^5 células HepG2 em cultura foram tripsinizadas e centrifugadas por 4 min à 1200 rpm. Depois, as amostras foram ressuspensas em 4,5 mL de tampão NB-A (85 mM KCl, 5,5% sacarose, 10 mM Tris pH 7,6, 0,5 mM espermidina, 0,2 mM EDTA, 250 μ M PMSF) e 1,5 mL de tampão NB-B (85 mM KCl, 5,5% sacarose, 10 mM Tris pH 7,6, 0,5 mM espermidina, 0,2 mM EDTA, 250 μ M PMSF, 0,1% NP40) e misturadas por inversão. Foram então posteriormente incubadas à 4°C por 3 min e centrifugadas a 2000 rpm por 4 min. Os núcleos foram lavados em 10 mL de tampão NB-R (85 mM KCl, 5,5% sacarose, 10 mM Tris pH 7,6, 1,5 mM CaCl_2 , 3 mM de MgCl_2 , 250 μ M PMSF) e novamente centrifugados à 2000 rpm por 4 min. O precipitado foi então ressuspendido em 500 μ L de tampão NB-R.

Para o estabelecimento da concentração de núcleos, as amostras foram diluídas em tampão de sonicação, como previamente mencionado, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro Eppendorf® (Hamburg, Alemanha). As amostras foram igualadas a uma concentração de $10 \times \text{A}_{260 \text{ nm}}$. Os núcleos foram, então, submetidos à digestão com MNase à 10, 20, 50, U por mL por 10 min para se determinar a melhor concentração de enzima para o ensaio de ChIP (Figura 6).

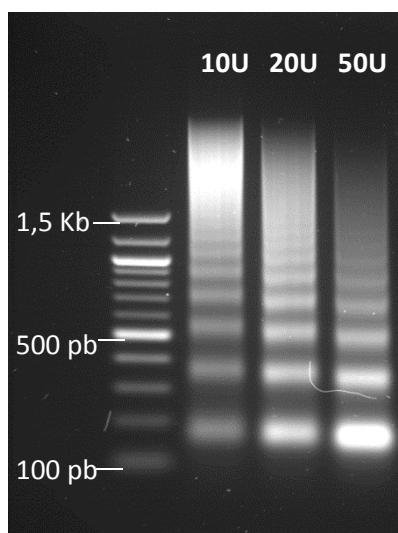


Figura 6 – Padronização da digestão por MNase. Gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato (TBE). Kb, kilobase; pb, pares de base; Padrão 100 pb (New England Biolabs®).

A concentração de MNase escolhida para os ensaios em HepG2 (50 U/ mL de amostra) foi determinada baseando-se nos mesmos critérios escolhidos para hepatócitos de camundongo.

A reação de qPCR contou com 1 ciclo de 95°C por 10 min, 50 ciclos de 94°C por 15 s, 59°C por 30 s, 73°C por 30 s, finalizando com 60-94°C por 60 s para a curva de dissociação (*melting*). As análises dos produtos da reação foram realizadas conforme a descrição feita para os hepatócitos de camundongos. Os resultados foram apresentados em porcentagem do total de cromatina usada e não imunoprecipitada (*input*).

3.2.5. Análise de imagem por microespectrofotometria de varredura

Para análise do fenótipo nuclear, células HepG2 foram cultivadas em lamínulas de vidro nas situações experimentais já mencionadas. Os preparados foram fixados em etanol:ácido acético glacial (3:1 v/v), lavados em etanol 70%, secadas ao ar e submetidos à reação de Feulgen conforme descrito no artigo científico 1 (Anexo I).

As imagens nucleares obtidas foram avaliadas em microespectrofotômetro de varredura automática Zeiss (Oberkochen, Alemanha) com interface a microcomputador com hardware e software adequados. As condições operacionais foram as mesmas utilizadas para hepatócitos de camundongo submetidos ao teste de AgNOR com as seguintes modificações: optovar 2.0 e $\lambda = 565$ nm, obtido com régua monocromadora Schott.

Pontos individuais de medida com absorbância $\leq 0,020$ foram considerados *background* e removidos da imagem nuclear. O *cutoff point* escolhido após teste preliminar foi igual a 0,140. Este *cutoff point* permitiu avaliar áreas de cromatina condensada para as células controle. Foram estabelecidos valores para os seguintes parâmetros:

1. A_T , valores Feulgen-DNA para cromatina total
2. A_C , valores Feulgen-DNA para cromatina considerada “condensada”.
3. S_T , área nuclear (μm^2).
4. S_C , área nuclear coberta por cromatina “condensada” (μm^2).
5. Sc %, área coberta por cromatina condensada em relação à área nuclear.
6. AAR, razão de absorção média, que expressa quantas vezes a absorção média da cromatina “condensada” excede a absorção do total do núcleo, pela seguinte fórmula: $AAR = (A_C / S_C) / (A_T / S_T)$ (Vidal et al, 1973).

Utilizando-se esses parâmetros foi possível plotar um gráfico de dispersão como proposto por Vidal (1984), relacionando $Sc\%$ *versus* AAR. O diagrama de dispersão de Vidal permite a discriminação de diferentes fenótipos nucleares de acordo com o seu posicionamento no gráfico (Vidal, 1984; Vidal et al, 1998; Felisbino et al, 2011). Foram medidos pelo menos 165 núcleos para um total de três replicatas biológicas para cada condição experimental analisada.

4. Resultados

4.1. Animais NOD hiperglicêmicos apresentam invasão linfocitária nas ilhotas pancreáticas

Para confirmação da ocorrência de invasão linfocitária nas Ilhotas de Langerhans em camundongos NOD hiperglicêmicos, foram obtidos preparados histológicos de pâncreas de todos os grupos estudados. Pâncreas de animais Balb/c e NOD normoglicêmicos apresentaram ilhotas de Langerhans íntegras, sem invasão linfocitária (Figura 7 - A). No grupo diabético, foi encontrada invasão parcial (Figura 7 – B) ou total (Figura 7- C) nas Ilhotas de Langerhans.

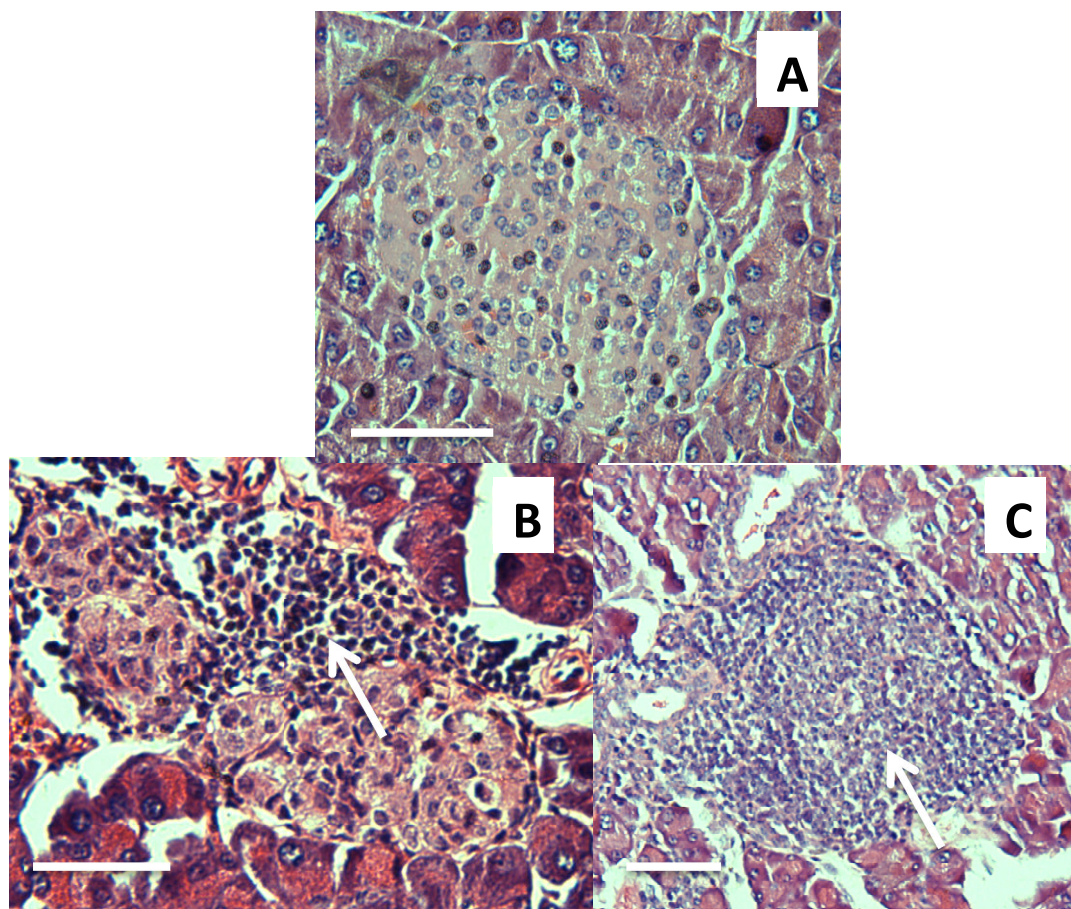


Figura 7 – Ilhotas de Langeharns de camundongos NOD fêmeas sem invasão linfocitária (A), com invasão parcial (B) e já estabelecida (C). As setas indicam os linfócitos; barra, 50 µm.

4.2. Hepatócitos mononucleados de animais adultos hiperglicêmicos atingem grau de poliploidia mais elevado do que animais idosos normoglicêmicos

Determinaram-se o conteúdo de DNA e outros parâmetros geométricos e densitométricos em núcleos de hepatócitos de camundongo Balb/c e NOD, por análise de imagem. Constatou-se que o aparecimento de graus mais elevados de poliploidia está associado com níveis aumentados de glicemia. Animais idosos também apresentaram altos níveis de poliploidia, contudo não na mesma magnitude do que em animais com hiperglicemia severas. A descrição detalhada e análise dos resultados obtidos está reportado no artigo científico 1 (Anexo I).

4.3. O diabetes mellitus promove maior acessibilidade da cromatina do que o envelhecimento

Graus de acessibilidade da cromatina de hepatócitos de camundongos NOD e Balb/c foram determinados pelo ensaio da MNase. Animais adultos com diabetes severo e idosos normoglicêmicos apresentaram aumento nos níveis de acessibilidade da cromatina, contudo, estes níveis foram maiores nos animais hiperglicêmicos. A descrição detalhada dos resultados e análise estão reportados no artigo científico 1 (Anexo I).

4.4. O diabetes mellitus e o envelhecimento afetam a atividade e a abundância de Sirt1

A abundância em Sirt1 mostrou-se aumentada em hepatócitos de camundongos com hiperglicemia severa, quando em comparação com seus controles normoglicêmicos. Com o envelhecimento, por outro lado, os níveis de Sirt1 mostraram-se diminuídos em relação aos animais adulto-jovens (Figura 8- A, E). A distribuição de Sirt1 permaneceu semelhante em todas as condições experimentais: preferencialmente em áreas eucromáticas, no centro nuclear (Figura 8 – D).

A atividade de Sirt1 também foi avaliada e não diferiu entre animais com hiperglicemia severa e animais normoglicêmicos. Em camundongos idosos foi observado decréscimo nos níveis de atividade dessa sirtuína os quais se assemelharam aos resultados referentes à sua abundância (Figura 8 – B). Como a atividade de Sirt1 obtida para camundongos diabéticos não correspondeu os níveis de abundância esperados, a razão NAD^+/NADH foi medida a fim de se avaliar se seu cofator estaria em quantidades limitantes. Para animais diabéticos, de fato, a razão NAD^+/NADH apresentou valores semelhantes aos dos animais normoglicêmicos, indicando uma possível razão da baixa atividade. Em animais idosos, como esperado, houve um decréscimo da razão NAD^+/NADH em relação aos animais adulto-jovens (Figura 8 – C).

4.5. Abundância de PGC-1 α e histonas-alvos de Sirt1 em hepatócitos de camundongos adultos diabéticos e idosos normoglicêmicos

A abundância de PGC-1 α para camundongos diabéticos e idosos apresentou o mesmo perfil daquele encontrado para Sirt1: aumento da abundância de PGC-1 α em animais adultos hiperglicêmicos e diminuição em idosos normoglicêmicos em relação aos animais normoglicêmicos e adulto-jovens, respectivamente (Figura 9 – A,C). PGC-1 α , assim como Sirt1, estava presente em todas as condições experimentais em áreas eucromáticas e na região central dos núcleos de hepatócitos (Figura 10 - B).

À exceção para a modificação H3K9Ac, que se apresentou mais abundante, não foram observadas diferenças significativas nas abundâncias dos alvos-histônicos de Sirt1 (H1K26Ac, H4K16Ac e H3K14Ac) em camundongos adultos hiperglicêmicos em relação aos controles normoglicêmicos de ambas linhagens. A marcação H3K14Ac apresentou abundância elevada em camundongos NODs hiperglicêmicos apenas em relação aos camundongos Balb/c normoglicêmicos (Figura 10 – A-E).

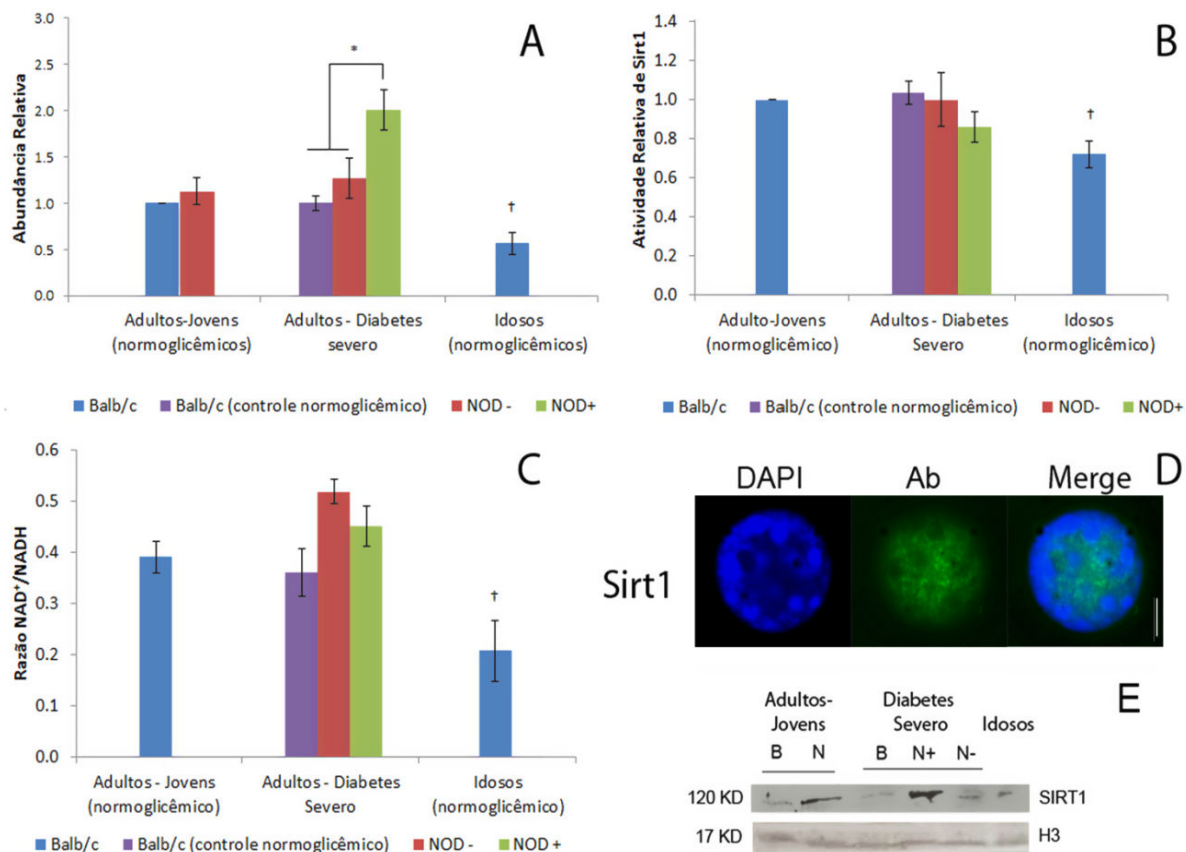


Figura 8 – Sirt1 é afetada de forma diferente entre hepatócitos de camundongos adultos hiperglicêmicos e idosos normoglicêmicos. (A) Abundância de Sirt1 em núcleos de hepatócitos de camundongos determinada por WB. **(B)** Atividade de Sirt1. **(C)** Razão NAD^+/NADH de hepatócitos de camundongos. **(D)** Distribuição de Sirt1 determinada por imunofluorescência. Barra, 10 µm. **(E)** *Imunoblotting*. A histona H3 foi usada como controle de carga. B, Balb/c; N, NOD; + hiperglicemia; - normoglicemia; * diferença significativa à $P < 0,05$ (ANOVA); †, diferença significativa em relação aos animais Balb/c adultos-jovens ($P < 0,05$; teste T-Student). $n = 5$.

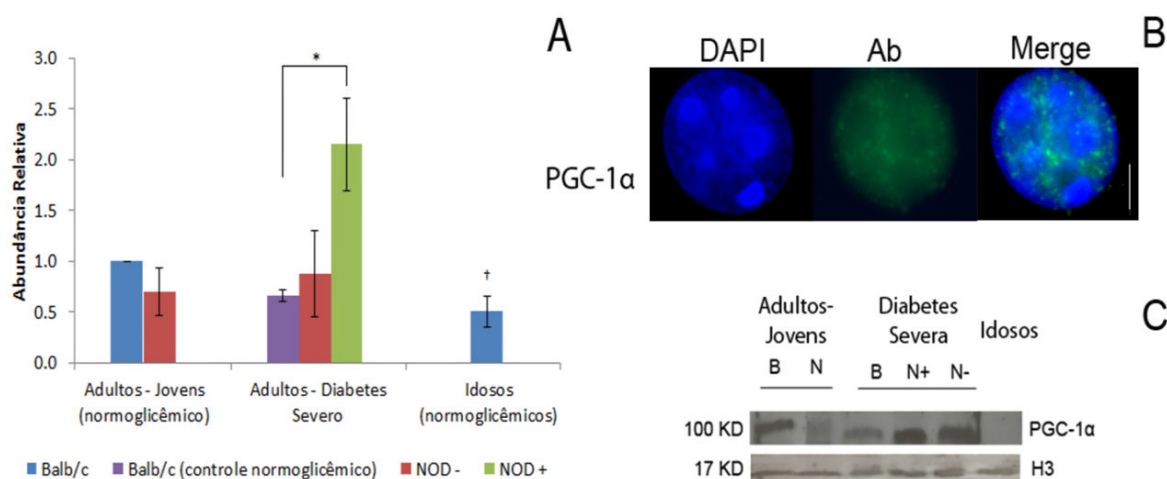


Figura 9 - PGC-1α está localizada em regiões eucromáticas e apresenta o mesmo perfil de abundância de Sirt1. (A) Abundância de PGC-1α. +, hiperglicemia; - normoglicemia; *, diferença significativa à ($P < 0,05$; ANOVA); †, diferença significativa em relação aos animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; Teste T-Student). **(B)** Distribuição de PGC-1α determinada por Imunofluorescência. Barra, 10 μm. **(C)** Imunoblotting. B, Balb/c; N, NOD. A histona H3 foi usada como controle de carga. n=5.

Em idosos, todos os alvos-histônicos de Sirt1 mostraram-se significativamente mais abundante em relação aos seus controles adulto-jovens, à exceção da modificação H1K26Ac (Figura 10 – A - E).

Para determinar se a localização de algumas marcas epigenéticas se alteravam em diferentes condições experimentais, foi investigada a ocorrência de H3K9Ac e H4K16Ac por imunofluorescência (Figura 10 – F). Estas duas modificações foram selecionadas por se apresentarem em alta concentração em hepatócitos de camundongo e por sua localização já estar estabelecida (Vaquero et al, 2007). Como esperado, ambas as marcas epigenéticas localizaram-se em regiões eucromáticas do núcleo inteiro em todas as condições experimentais.

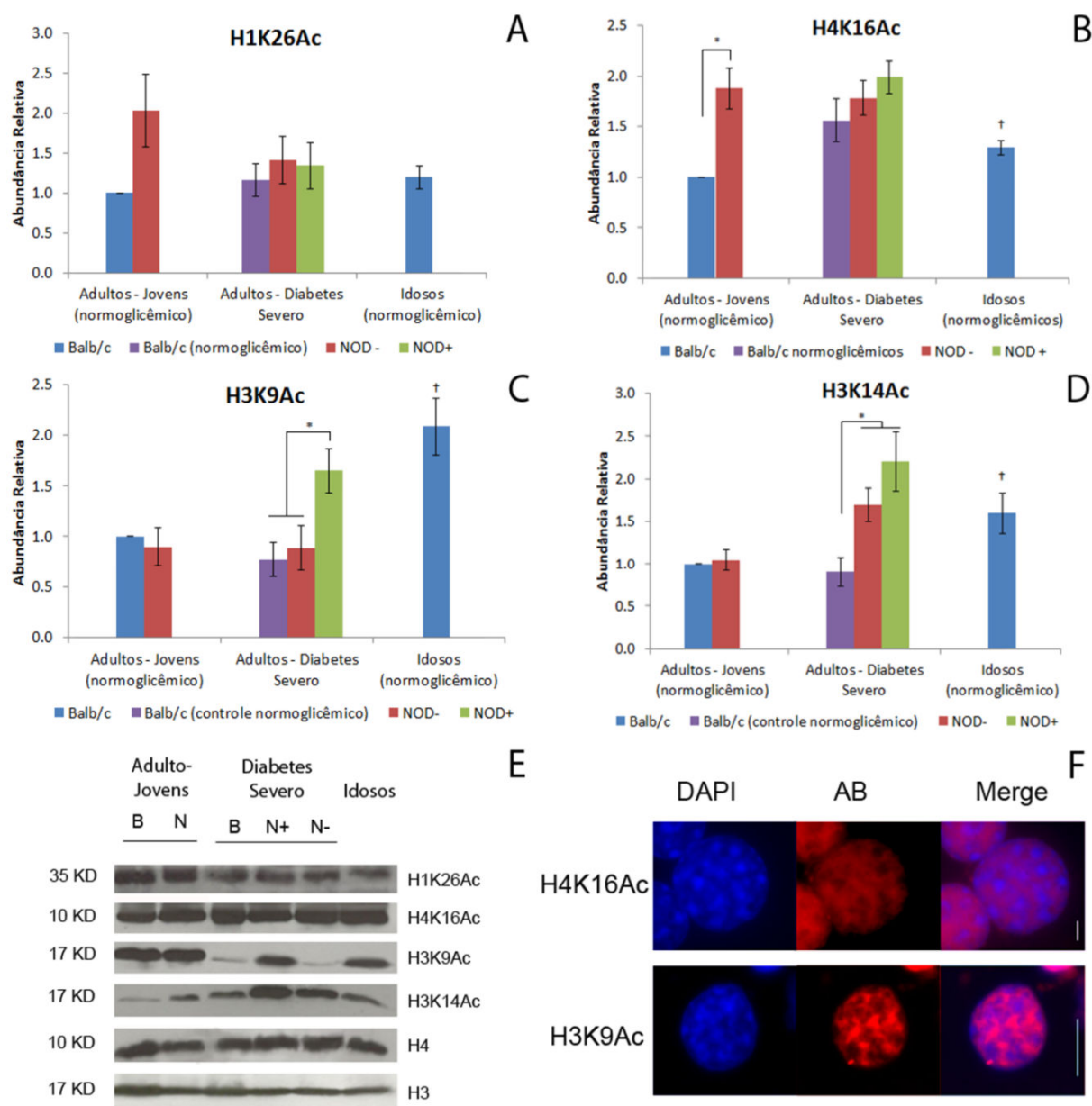


Figura 10 – Abundância de alvos histônicos de Sirt1 em hepatócitos de camundongos adultos diabéticos e idosos normoglicêmicos. Abundância relativa de **(A)** H1K26Ac, **(B)** H4K16Ac, **(C)** H3K9Ac, **(D)** H3K14Ac. **(E)** *Imunoblotting* de H1K26Ac, H4K16Ac, H3K9Ac and H3K14Ac. As histonas H3 e H4 foram usadas como controle de carga. B, Balb/c; N, NOD. **(F)** Distribuição das marcas epigenéticas H3K9Ac e H4K16Ac determinada por imunofluorescência. Barra, 10 μ m. +, hiperglicemia; - normoglicemia; *, diferença significativa ($P < 0,05$; ANOVA); †, diferença significativa em relação aos animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; Teste T-Student). $n = 5$.

4.6. Hiperglicemia, porém não envelhecimento, induz aumento na abundância de Sirt6 e danos ao DNA em hepatócitos de camundongo

Camundongos hiperglicêmicos mostraram uma abundância relativa maior de Sirt6 enquanto camundongos idosos apresentaram abundância relativa reduzida dessa sirtuína quando comparados com animais normoglicêmicos e adulto-jovens, respectivamente (Figura 11 – A, C). Para se estabelecer uma relação entre níveis de Sirt6 e danos ao DNA, foi realizado o ensaio do cometa. Em hepatócitos de camundongos hiperglicêmicos, foram observados altos níveis de danos ao DNA e maior número de células danificadas em comparação aos animais normoglicêmicos de ambas as linhagens (Tabela 4). Animais idosos, no entanto, não apresentaram diferença significativa em relação a adultos-jovens para ambos os parâmetros. Utilizando-se tratamento com H₂O₂ como controle positivo indutor de quebras de DNA, constatou-se que apenas nos animais adultos hiperglicêmicos os níveis de danos ao DNA e de percentuais de células danificadas eram tão elevados quanto os do controle positivo (Tabela 4).

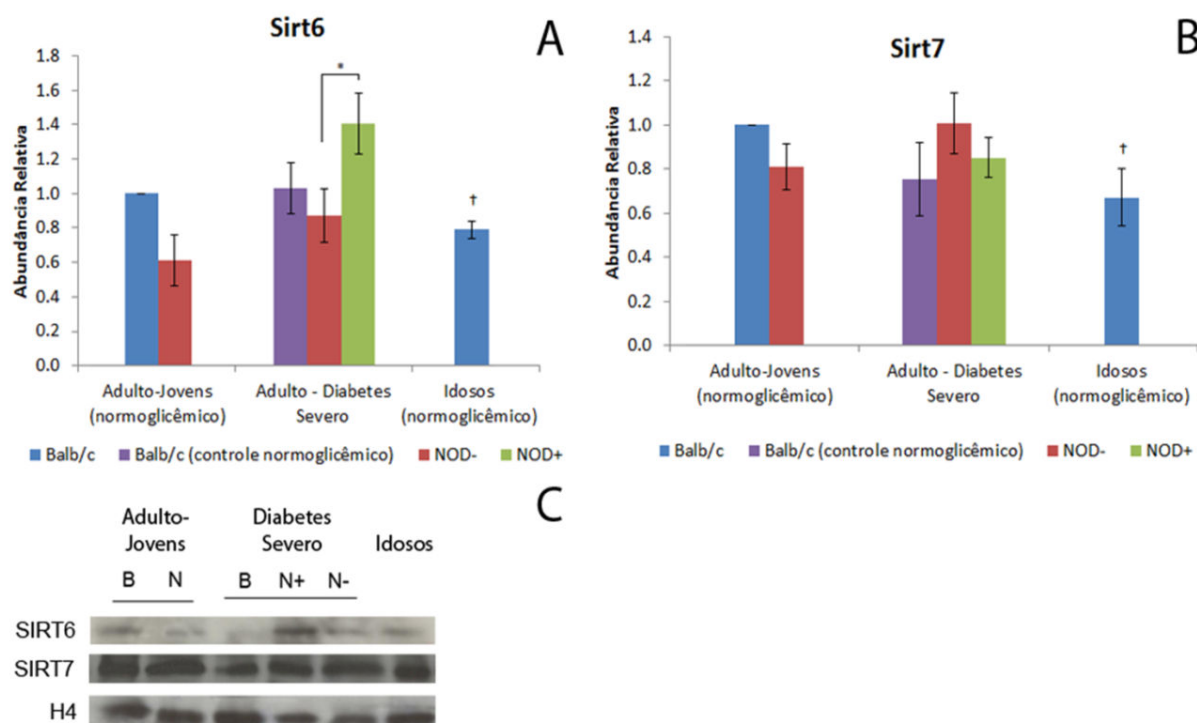


Figura 11 – Abundância relativa de Sirt6 e Sirt7 em hepatócitos de camundongos adultos diabéticos e idosos normoglicêmicos. Abundância de Sirt6 **(A)** e Sirt7 **(B)**. +, hiperglicemia; - normoglicemia; *, diferença significativa ($P < 0,05$; ANOVA); †, diferença significativa em relação aos animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; Teste T-Student). **(C)** *Imunoblotting*. B, Balb/c; N, NOD. A histona H4 foi usada como controle de carga. $n = 5$.

Tabela 4 - Porcentagem de células danificadas e índice de dano ao DNA em células hepáticas de camundongos com e sem tratamento prévio por peróxido de hidrogênio (técnica do cometa).

Animais	H ₂ O ₂	Células danificadas (%)		Dano ao DNA	
		X	SE	X	SE
Adultos- Jovens Balb/c	Não	21,38 ^a	4,7	34,72 ^a	8,60
	Sim	53,75*	14,6	111,97*	29,50
Balb/c Normoglicêmicos	Não	20,67 ^a	3,0	37,58 ^a	6,11
	Sim	53,40*	12,4	105,09*	24,30
NOD Normoglicêmicos	Não	22,58 ^a	4,1	40,89 ^a	9,32
	Sim	56,30*	11,5	128,72*	31,50
NOD Hiperglicêmicos	Não	43,78 ^b	3,8	84,23 ^b	9,97
	Sim	61,57	13,8	148,77	38,50
Idosos Balb/c	Não	25,46 ^a	2,6	48,34 ^a	6,27
	Sim	63,09*	14,5	159,75*	30,60

X, média aritmética; SE, erro-padrão da média; *, diferença significativa em relação ao tratamento com H₂O₂ (Teste T-Student $P < 0,05$); a-b, diferença significativa (ANOVA, $P < 0,05$); n = 5.

4.7. Hiperglicemia e envelhecimento promovem diminuição na razão área AgNOR positiva/área nuclear, mas apenas o envelhecimento promove decréscimo na abundância de Sirt7

A abundância relativa de Sirt7 também foi avaliada nos hepatócitos de camundongos NOD e Balb/c. Apesar de não haver diferença quanto a este item entre camundongos diabéticos e normoglicêmicos, foi observado um decréscimo dessa proteína para camundongos idosos em relação aos adulto-jovens (Figura 11 – B, C).

Como a Sirt7 está relacionada com a transcrição de rDNA, regiões AgNOR+ foram medidas e relacionadas com a área nuclear. Tanto animais hiperglicêmicos como idosos apresentaram aumento na área nuclear em comparação com seus respectivos controles normoglicêmicos e adulto-jovens (Figura 12 – A). Contudo, animais diabéticos não apresentaram diferenças significativas para os valores de área AgNOR+ em comparação aos animais normoglicêmicos. Um decréscimo significativo na área AgNOR+ foi observado em hepatócitos de camundongos idosos em comparação à animais adulto-jovens (Figura 12 – B). Essa diminuição resultou em uma redução na razão área AgNOR+/área nuclear total, propiciando valores semelhantes à razão obtida para animais diabéticos (Figura 12 – C).

A fim de se verificar se a diminuição nas áreas AgNOR+ em camundongos idosos estava relacionada a uma maior metilação de DNA, foi realizada a técnica de *Native-ChIP* seguida de PCR quantitativo para a região que corresponderia ao rDNA 18S, após *splicing*. Foi observado de fato haver um aumento na metilação do DNA em hepatócitos de camundongos idosos normoglicêmicos em relação aos seus controle adulto-jovens. Em animais adultos hiperglicêmicos observou-se uma tendência à diminuição, contudo não estatisticamente significativa (Figura 13).

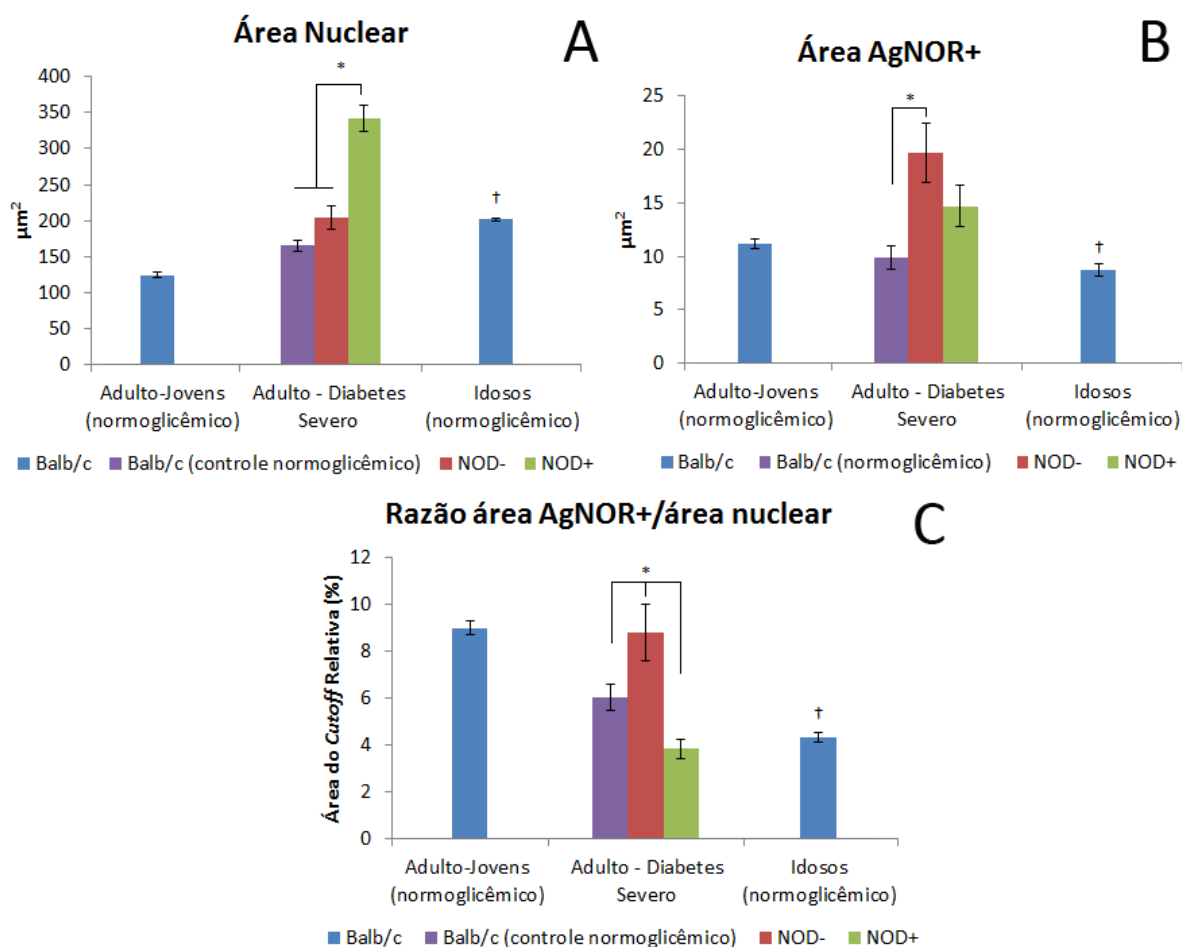


Figura 12 – Áreas nucleares e AgNOR positivas de hepatócitos de camundongos adultos diabéticos e idosos normoglicêmicos. (A) Área nuclear e (B) Área AgNOR positiva em hepatócitos de camundongos. (C) Razão área AgNOR+ por área nuclear. +, hiperglicemia; - normoglicemia; *, diferença significativa ($P < 0,05$; ANOVA); †, diferença significativa em relação aos animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; Teste T-Student), $n = 5$.

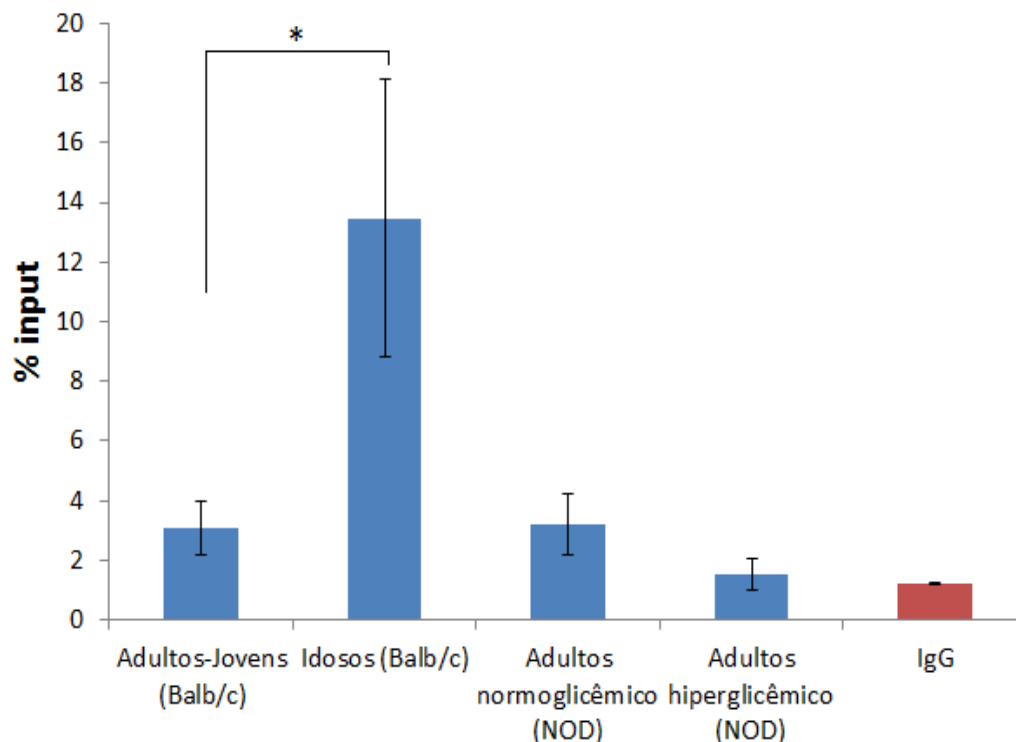


Figura 13 – *Native-ChIP* de 5-metil-citosina no rDNA 18S. IgG, controle negativo; Input, cromatina total usada durante o experimento sem ser imunoprecipitada. *, diferença significativa ($P < 0,05$; Teste T-Student), $n = 3$.

4.8. Análise de expressão gênica diferencial em hepatócitos de camundongos

4.8.1. *Diabetes mellitus*

A fim de se comparar os perfis de expressão gênica em hepatócitos de camundongos diabéticos, animais NOD adultos com hiperglicemia severa foram comparados com animais normoglicêmicos de mesma idade e linhagem. Dos 26.766 transcritos com sequências já estabelecidas, disponíveis no microarranjo de expressão, foi obtido um total de 95 genes diferencialmente expressos para diabéticos sendo que destes, 39 estavam com expressão aumentada e 56 com expressão diminuída.

Esses genes foram divididos em categorias de funções biológicas gerais, sendo que os que desempenham mais de uma função foram colocados em mais

de uma categoria. Em camundongos com hiperglicemia severa, as categorias mais representativas de genes com expressão aumentada foram aquelas envolvidas no transporte celular, transcrição/tradução e inflamação (Anexo II). Para os genes com expressão diminuída as categorias mais representativas foram aquelas relacionadas à transcrição/proliferação celular, metabolismo de lipídios e inflamação (Anexo III).

O mapa geral da interação gênica obtida pelos genes diferencialmente expressos mostrou quatro genes centrais que possivelmente apresentam um papel regulador de rede gênica (*Srebef1*, *Ppargc1a*, *Nr1d1* e *Ppard*) (Figura 14) e o restante periféricamente, sendo que 23 não apresentaram relação direta com nenhum dos genes presentes no mapa (Figura 14). Foram identificadas duas redes de interação gênica que envolviam mais de um gene diferencialmente expressos. Essas redes foram obtidas ao se confrontarem genes com expressão diferencial maior do que 1,6, que apresentavam algum grau de interação entre si e que tivessem uma função biológica comum. A primeira era composta por 35 genes envolvidos no metabolismo de lipídios, transporte e bioquímica de pequenas moléculas, sendo que destes, 14 estavam diferencialmente expressos (*Fold Change*>1,6; *p*<0.05) (Figura 15). Observou-se nesta rede que a maioria dos genes centrais com muitas interações com outras moléculas estavam superexpressos, indicando uma possível ativação dessa rede. A segunda era composta por 34 genes envolvidos em doenças gastrointestinais, disfunção no sistema hepático e esteatose hepática, sendo que destes, 14 estavam diferencialmente expressos. Esta rede, diferente da primeira, apresentava a maioria dos genes centrais da rede com expressão repressa e se sobrepunha com a primeira rede através gene *Pck1* (Figura 16). Este gene encontra-se superexpresso em animais diabéticos, transcreve a proteína fosfoenolpiruvato carboxinase 1, é o principal ponto de regulação da gliconeogênese e pode ser regulado por hormônios como insulina, glicocorticóides glucagon e AMPc.

Foram observados também em animais com hiperglicemia severa três *upstreams regulators* com expressão diferencial e ação específica sobre seus

alvos diferencialmente expressos (Tabela 5). Dos três reguladores, *Ppargc1a* e *Ezh2* encontram-se na primeira rede enquanto o *Srebf1* encontra-se na segunda.

Baseando-se nos três fatores de transcrição diferencialmente expressos e em seus alvos, pode-se observar que *Srebf1* apresenta-se represso em animais hiperglicêmicos (Tabela 5). Este gene transcreve um fator de transcrição denominado *sterol regulatory element-binding transcription factor 1*, envolvido com a biossíntese de colesterol, ácidos graxos e fosfolipídios, que suprem a membrana plasmática para o crescimento celular (Bengoechea-Alonso et al, 2005). Somado a isso, *Srebf1* liga-se ao gene *p21^{WAF1/CIP1}* inibindo quinases e promovendo a poliploidia em fígado (Inoue et al, 2005). Assim como *Srebf1*, os seus alvos gênicos apresentam-se com expressão diminuída e todos estão envolvidos com metabolismo de lipídeos, indicando uma diminuição dessa função biológica (Tabela 5, Figura 16).

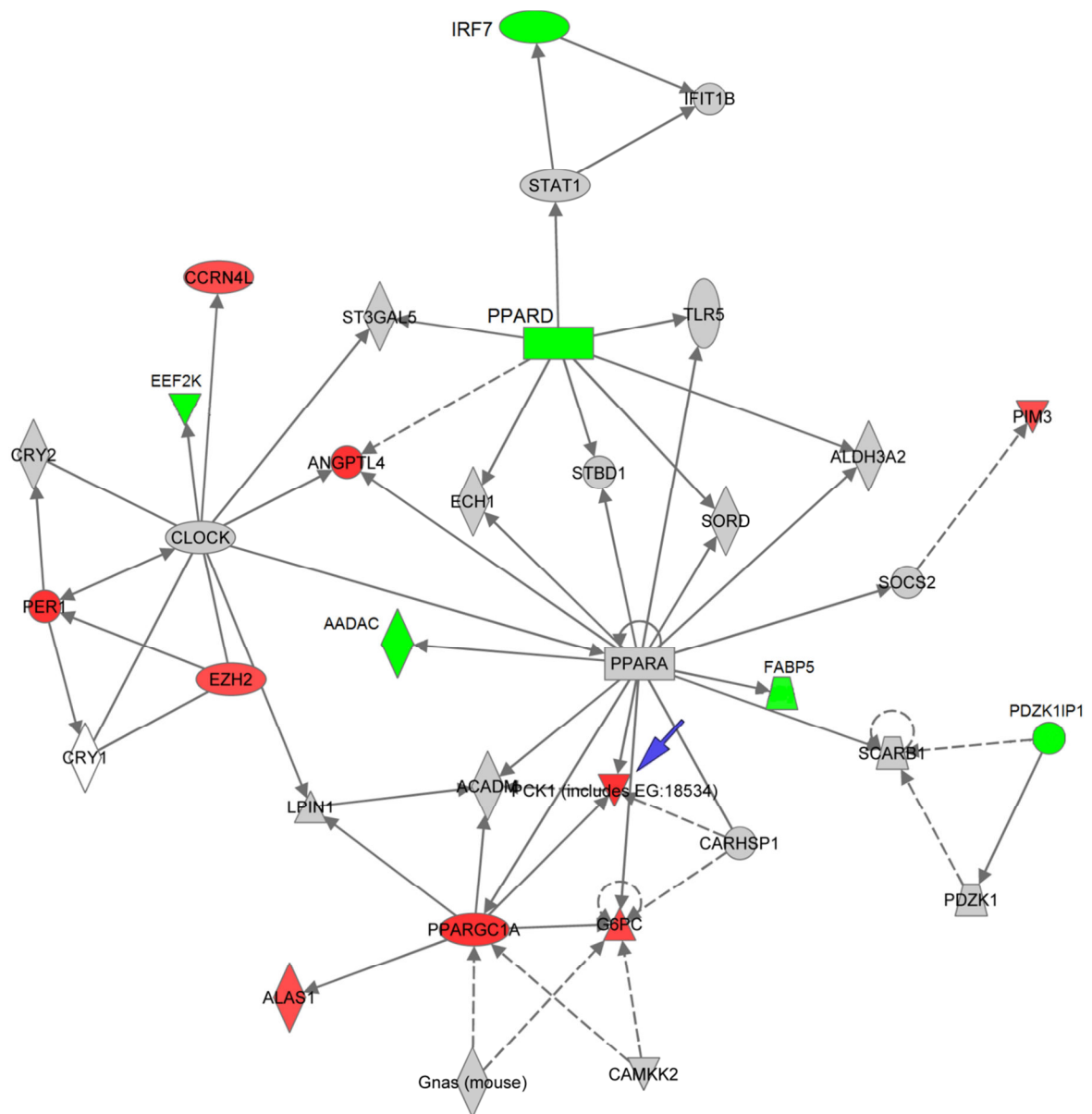


Figura 15 – Rede de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, transporte e bioquímica de pequenas moléculas. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Seta azul, gene de intersecção (IPA®).

Ppargc1a transcreve a proteína PGC-1 α , encontra-se superexpresso em animais diabéticos e é um fator de transcrição envolvido no metabolismo de energia. Como já mencionado na Introdução, a proteína PGC-1 α interage com Sirt1 em situações de alteração na disponibilidade de carboidratos, como jejum e diabetes mellitus. Dos seus alvos gênicos, *Pck1* e *G6pc* encontram-se também superexpressos e estão envolvidos com a biossíntese de carboidratos, indicando aumento desta função nos hepatócitos de camundongos diabéticos (Tabela 5, Figura 15).

Ezh2 encontra-se superexpresso em animais diabéticos e transcreve um membro da família *Polycomb*, a qual está envolvida na manutenção do estado transcricionalmente represso de diversos genes. EZH2, especialmente, é responsável pela adição de três grupos metil na lisina 27 da histona H3 (Etchegaray et al, 2006), levando à condensação cromatínica. Seu alvo, *Per1*, envolve-se com a função de ritmos circadianos (Etchegaray et al, 2006) (Tabela 5, Figura 15).

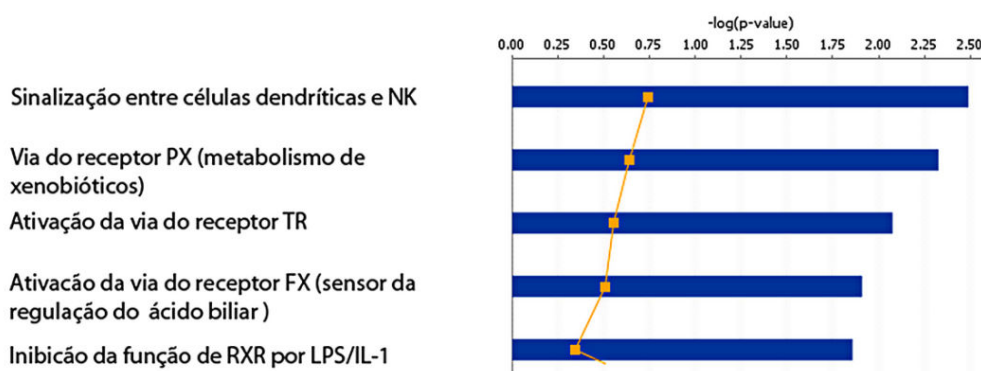
Tabela 5 – Regulação dos fatores de transcrição diferencialmente expressos nas suas moléculas-alvos em hepatócitos de camundongos diabéticos.

Gene	Regulação pelo fator de transcrição	Fold Change
Fator de transcrição - <i>Srebf1</i>		-1.623
<i>Gck</i>	Positiva	-1.822
<i>Gpam</i>	Positiva	-1.987
<i>Pnpla3</i>	Positiva	-4.760
Fator de transcrição - <i>Ppargc1a</i>		2.166
<i>Pck1</i>	Positiva	3.351
<i>G6pc</i>	Negativa	1.720
<i>Alas1</i>	Positiva	1.648
Fator de transcrição - <i>Ezh2</i>		1.656
<i>Per1</i>	Indefinida	1.987

Finalmente, as cinco vias canônicas com mais genes representados estão mostradas na Figura 17 - A, sendo que todas se sobrepõem, com exceção da “sinalização entre células dendríticas e NK” (Figura 17 – B). Dos reguladores transcricionais da Tabela 5, *Ppargc1a* participa de todas as cinco principais vias canônicas apresentadas, com exceção da “sinalização entre células dendríticas e NK” (Figuras 18 – 21). Nessas vias *Ppargc1a* está envolvido com metabolismo de carboidratos, lipídios, xenobióticos e bile, processos chaves em *diabetes mellitus* (Figuras 18 – 21).

■ Pontuação da análise funcional dos genes diferencialmente expressos em NODs hiperglicêmicos ■ Razão

A



B

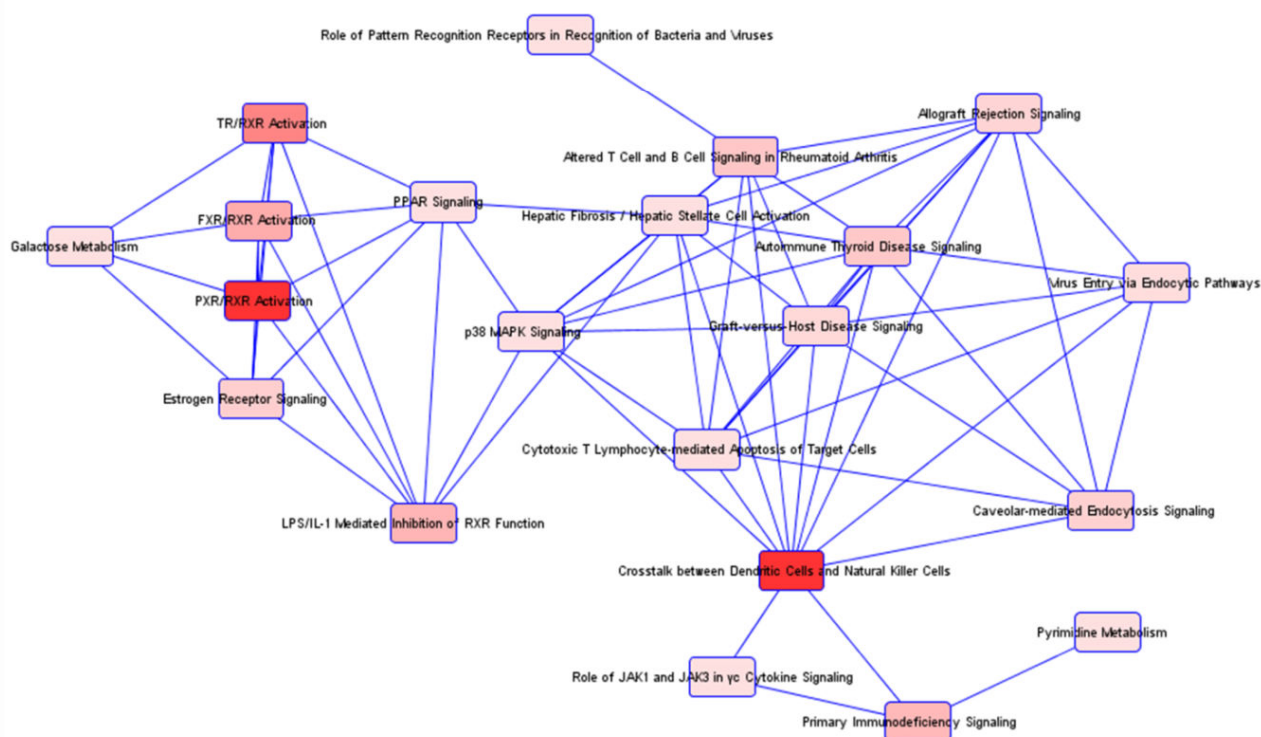


Figura 17 – Vias canônicas alteradas em hepatócitos de camundongos hiperglicêmicos. **A**, cinco vias com maior alteração em camundongos diabéticos. Razão, número de genes diferencialmente expressos encontrados/número total de genes da via. **B**, rede de integração das vias canônicas alteradas. Quanto maior a intensidade de vermelho, mais genes diferencialmente expressos dentro da via canônica.

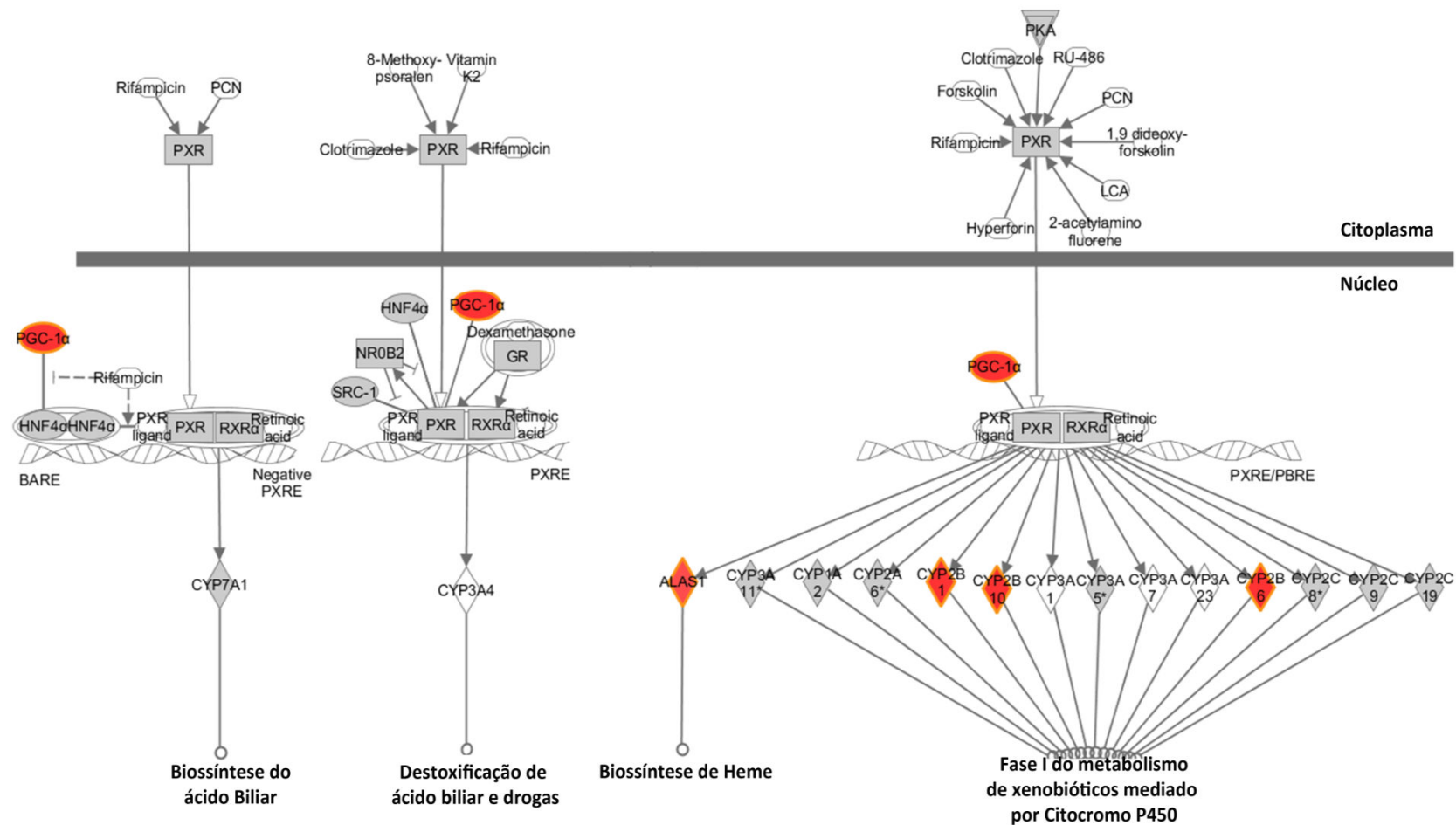


Figura 18 – Vias do Receptor X *Pregnane* (PXR). Vermelho, superexpressão. Linha cheia, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

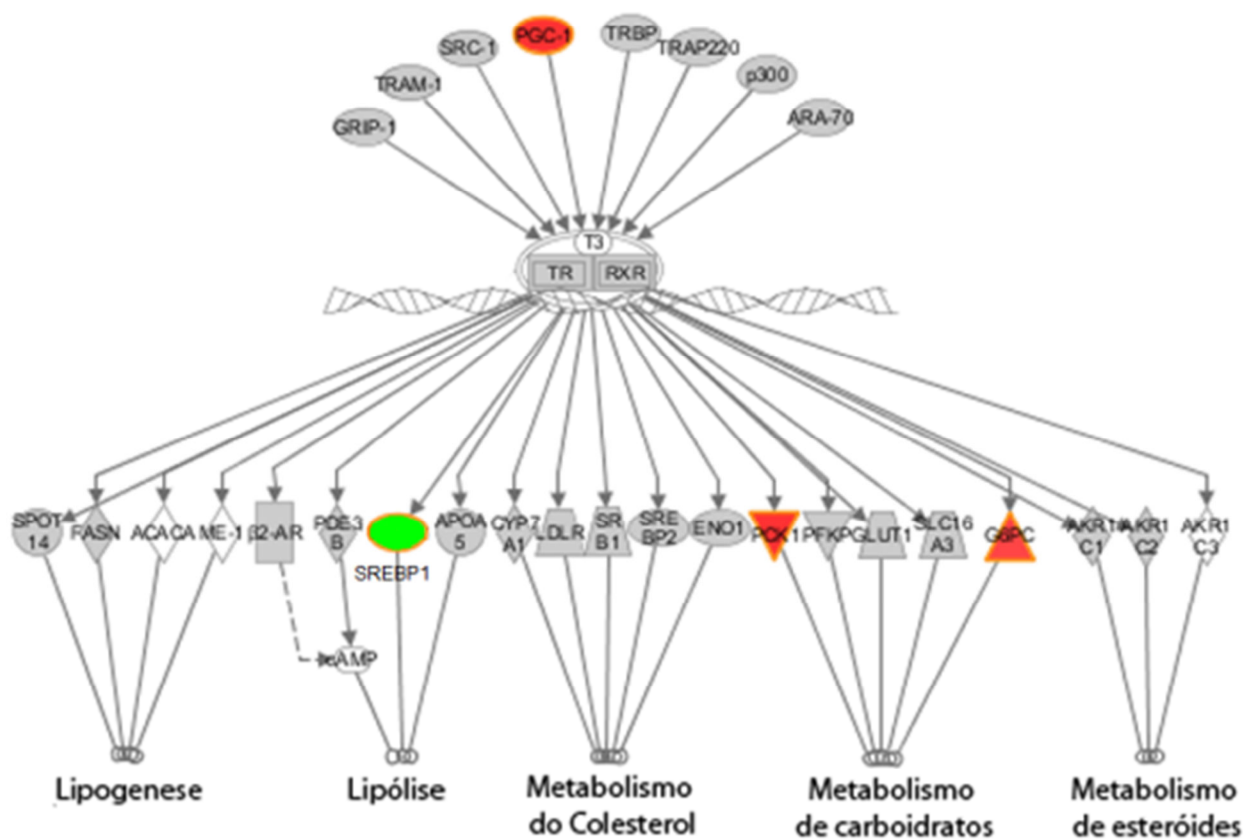


Figura 19 – Via de ativação do receptor da tireóide (TR). Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA[®]).

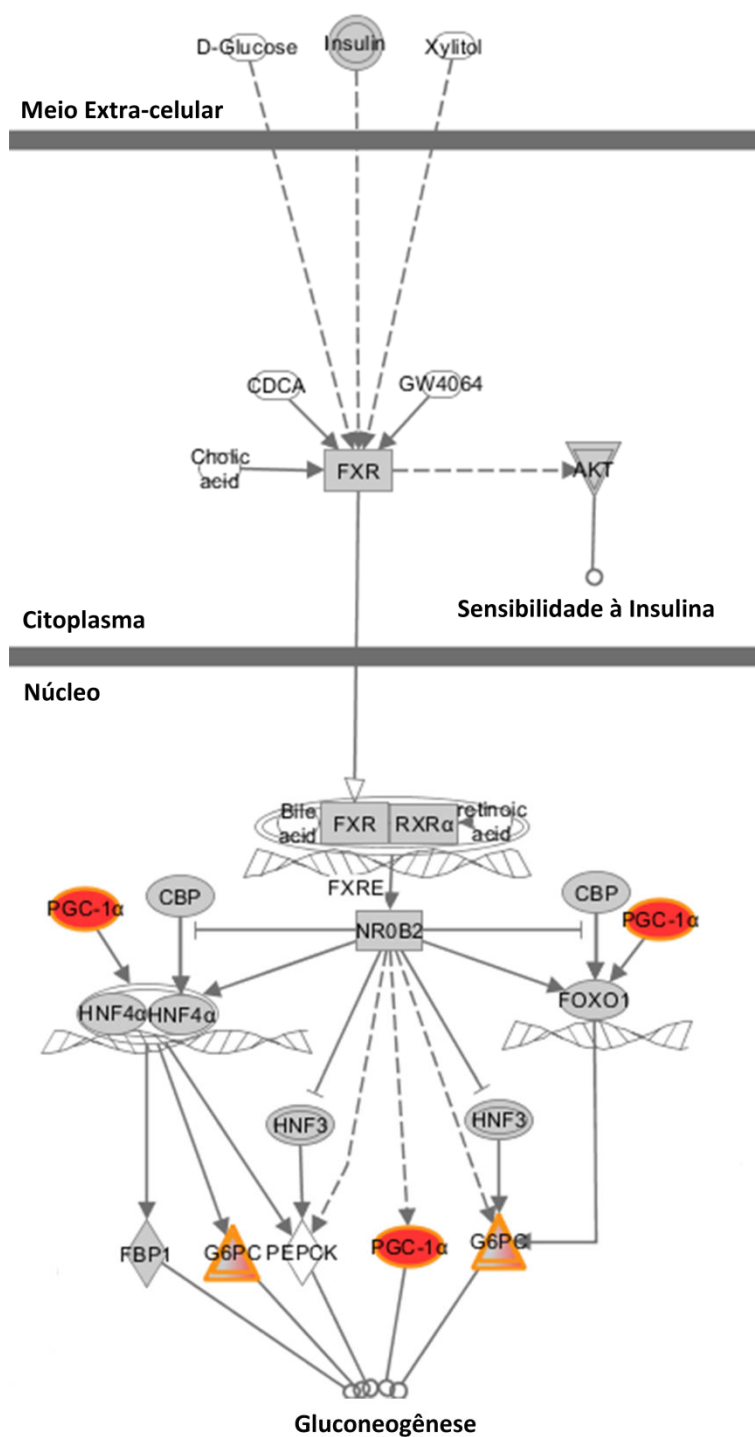


Figura 20 – Via de ativação do receptor X Farnesóide (FXR). Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Vermelho, superexpressão; laranja, grau menor de expressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

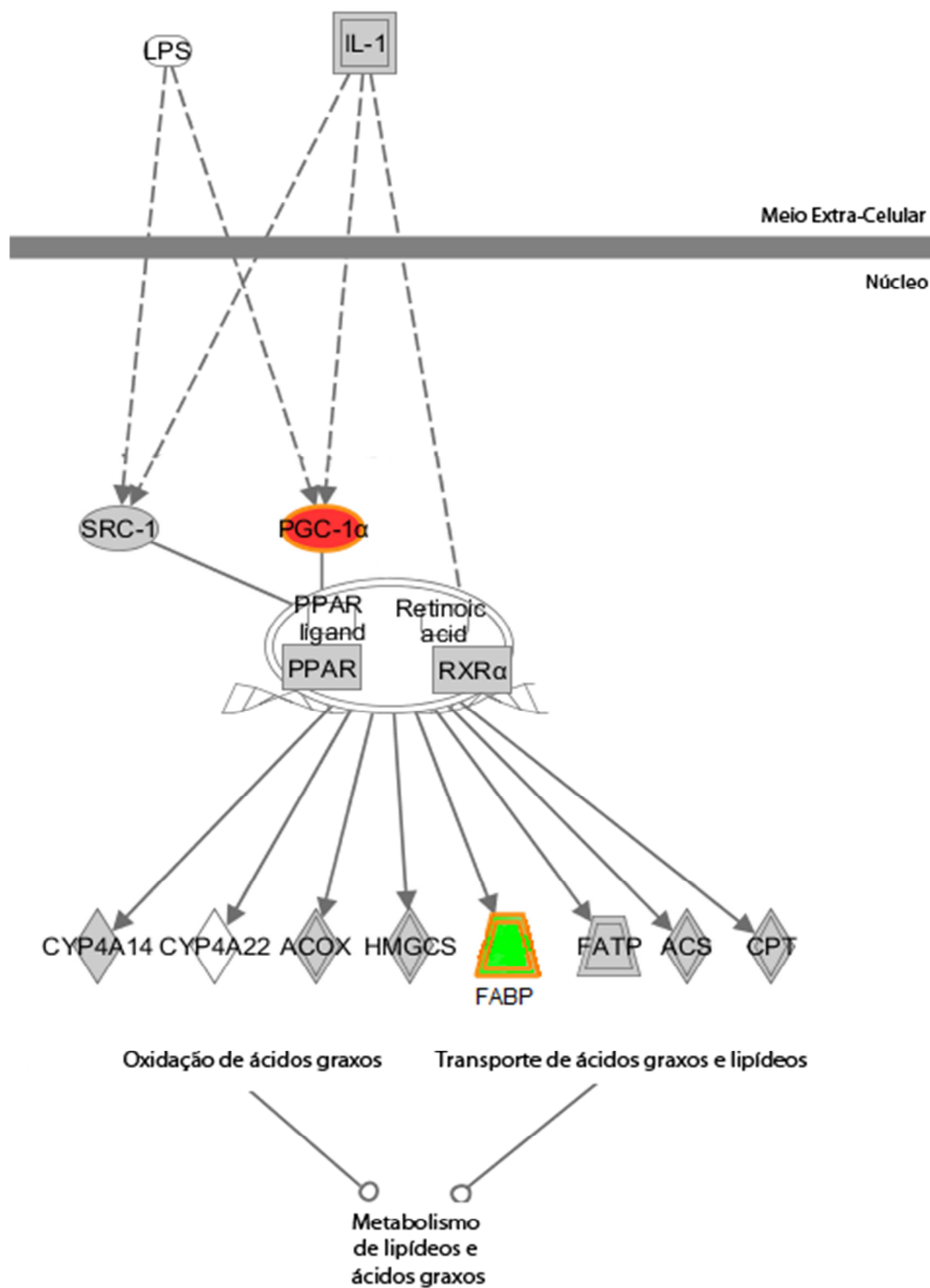


Figura 21 – Via parcial da inibição da função do receptor do ácido retinóico (RXR) mediado por LPS/IL-1. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

4.8.2. Envelhecimento

Em camundongos idosos normoglicêmicos, constatou-se um total de 87 genes com expressão diferenciada, sendo que 59 destes estavam com expressão aumentada e 28 com expressão diminuída. Em hepatócitos de camundongos idosos, as categorias de genes com expressão aumentada mais representativas foram relacionadas a transcrição/tradução, ritmos biológicos e sinalização celular (Anexo IV). Para os genes com expressão diferencial reduzida, as categorias com maior número de genes foram relacionadas a câncer, proliferação celular e respiração celular/oxidação (Anexo V).

Diferentemente do observado em animais hiperglicêmicos, o mapa geral de interação gênica obtida pelos genes diferencialmente expressos mostrou apenas dois genes centrais que possivelmente apresentam um papel regulador de rede gênica (*Cdkn1a* e *Ppard*) (Figura 22). A maioria dos genes encontrou-se disposta periféricamente no mapa, indicando ação final em vias ou cascatas de sinalização. Somado a isso, dois pares de genes apresentaram relação direta sem conexão com genes do mapa e foram encontrados 21 genes “órfãos” (Figura 22).

Foram identificadas três redes de interação gênica que envolviam mais de um gene da lista dos diferencialmente expressos. A primeira era composta por 35 genes envolvidos no desenvolvimento, crescimento e proliferação celular, função e desenvolvimento do sistema hepático, sendo que destes, 16 estavam diferencialmente expressos (*Fold Change* > 1,6; *P* < 0,05) (Figura 23). A segunda rede era composta por 35 genes envolvidos no comportamento, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso e doenças nutricionais, sendo que destes, 16 estavam diferencialmente expressos (Figura 24). A primeira rede se sobrepunha com a segunda rede pelos genes *Cyp2b6* e *Mt2a* (Figura 23 e 24). *Cyp2b6* apresenta expressão reduzida e transcreve uma proteína que participa do complexo do citocromo P450, o qual é envolvido na metabolização de drogas e biossíntese de lipídios e esteróis. *Mt2a* liga-se em íon metálicos e está envolvido em inúmeros processos celulares. Observa-se que nas duas primeiras redes, os

genes de expressão reduzida encontram-se no centro da rede e se relacionam com mais genes, ao invés daqueles com expressão aumentada, os quais se encontram na periferia da rede e têm poucas interações (Figura 23 e 24). A internalização dos genes dentro da rede pode indicar moléculas iniciadoras de vias de sinalização, e como apresentam expressão reduzida, pode-se inferir que essas vias encontram-se repressas. A terceira rede é composta por 25 genes envolvidos em doenças gastrointestinais, disfunção no sistema hepático e esteatose hepática, semelhantemente à observada em animais hiperglicêmicos, sendo cinco deles superexpressos (Figura 25). Dentre esses genes, *Nupr1*, *Gadd45A* e *Hspb1* estão envolvidos com apoptose, proliferação celular e câncer hepático. *Cfd* e *Hla-dmb*, por sua vez estão envolvidos com resposta inflamatória e *diabetes mellitus* (Siegmund et al, 1999; Berg & Scherer, 2005). O posicionamento periférico desses genes na rede pode indicar uma atividade final em vias de sinalização (Figura 25), como o observado para o gene *Gadd45A* na via de ativação do receptor da vitamina B3.

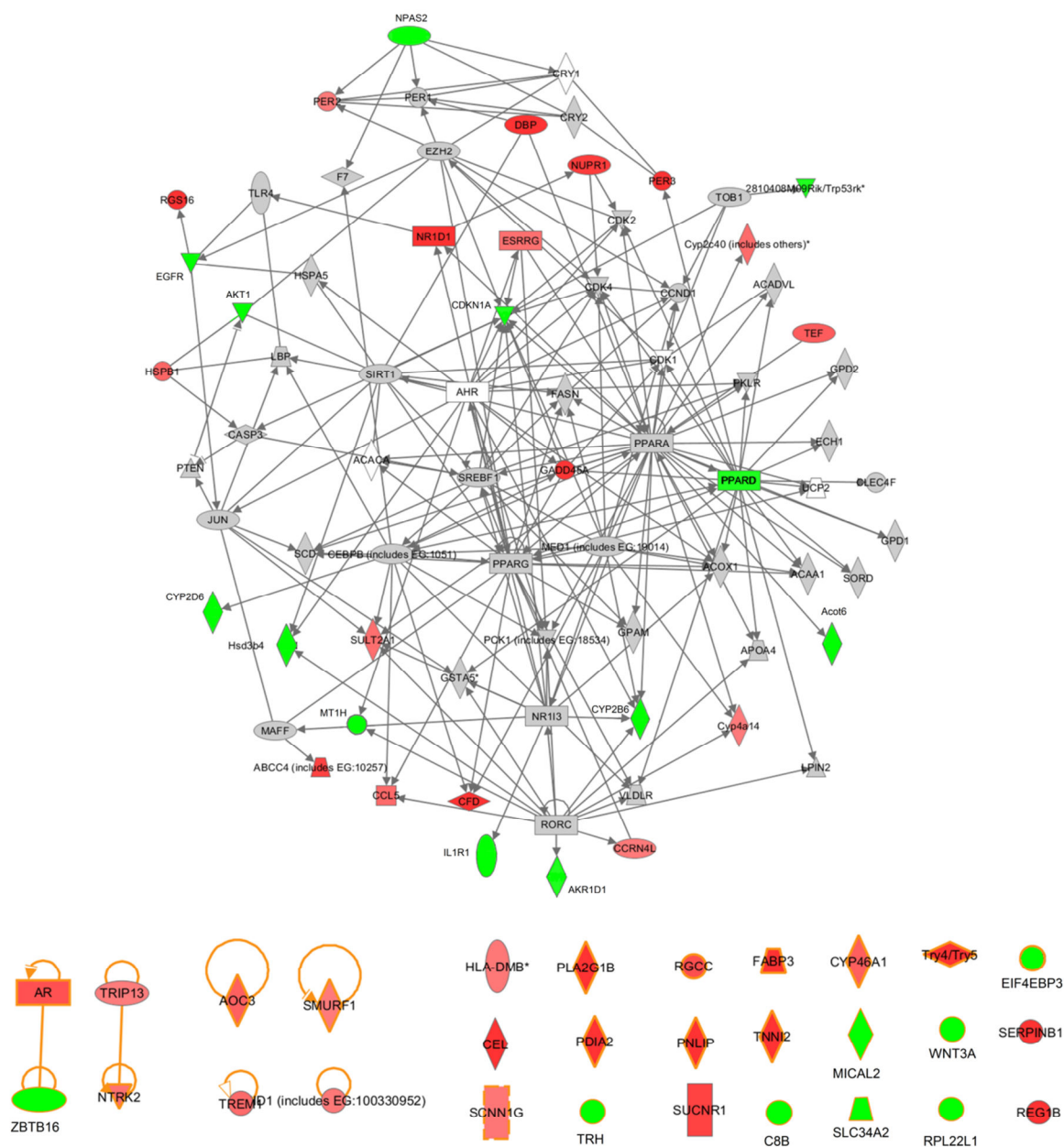


Figura 22 - Mapa gênico de animais envelhecidos constituído apenas de interações diretas. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes; laranja, interação não incluída no mapa gênico. Linha contínua, relação direta; linha curva, auto-regulação. (IPA®).

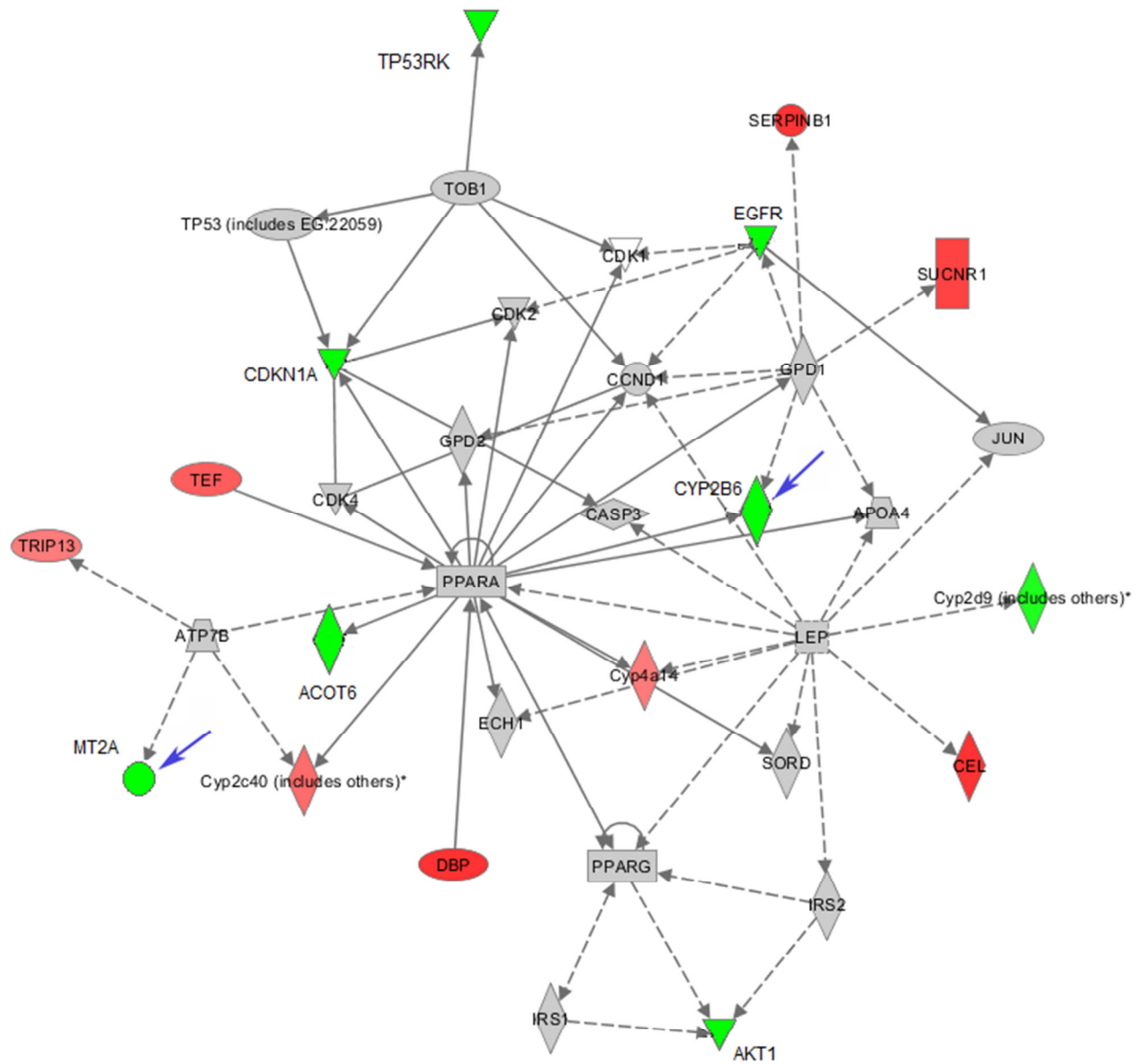


Figura 23 - Rede de genes envolvidos no desenvolvimento, crescimento e proliferação celular, função e desenvolvimento do sistema hepático. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Seta azul, genes de intersecção. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

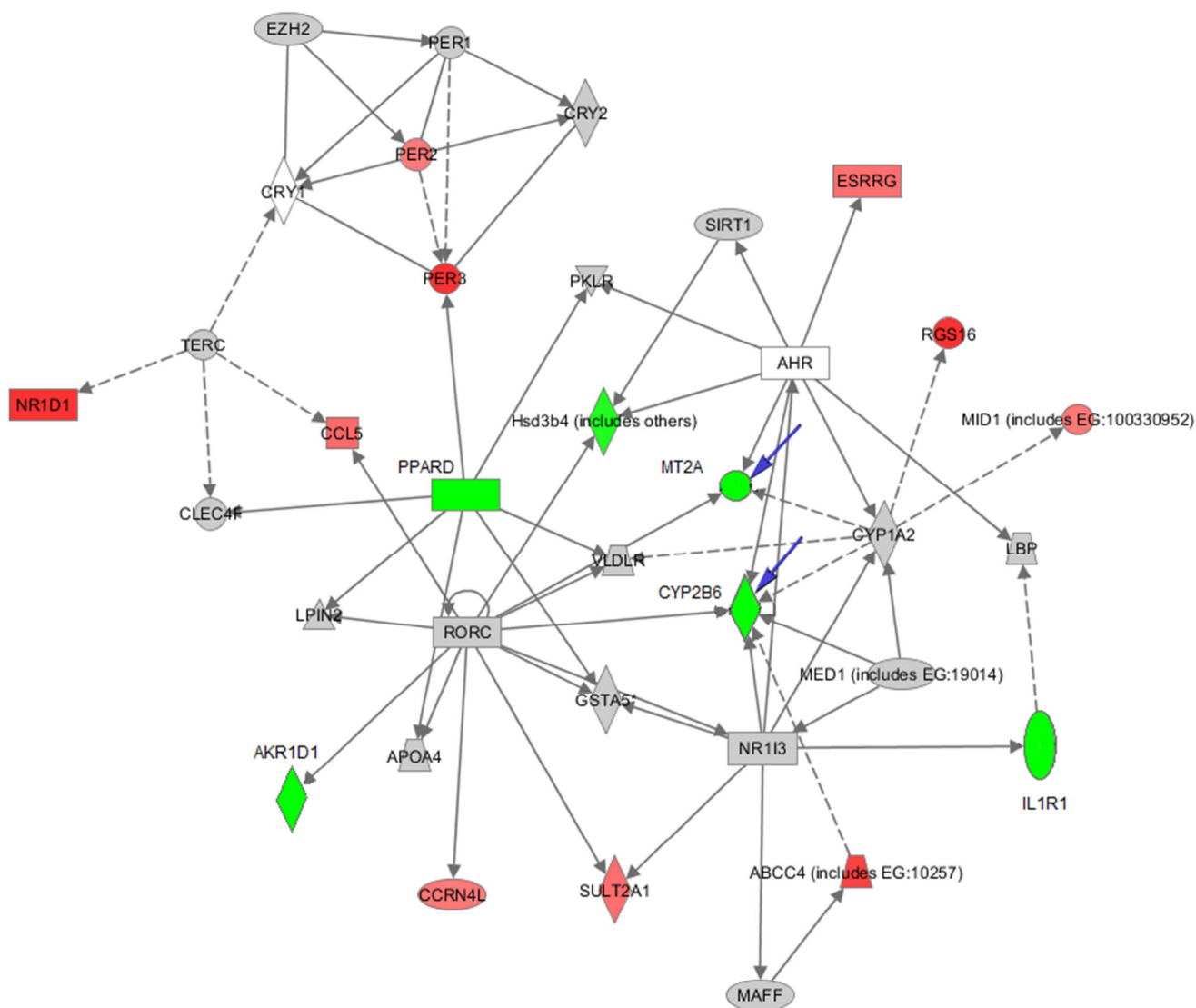


Figura 24 - Rede de genes envolvidos no comportamento, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso e doenças nutricionais. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Seta azul, genes de intersecção. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

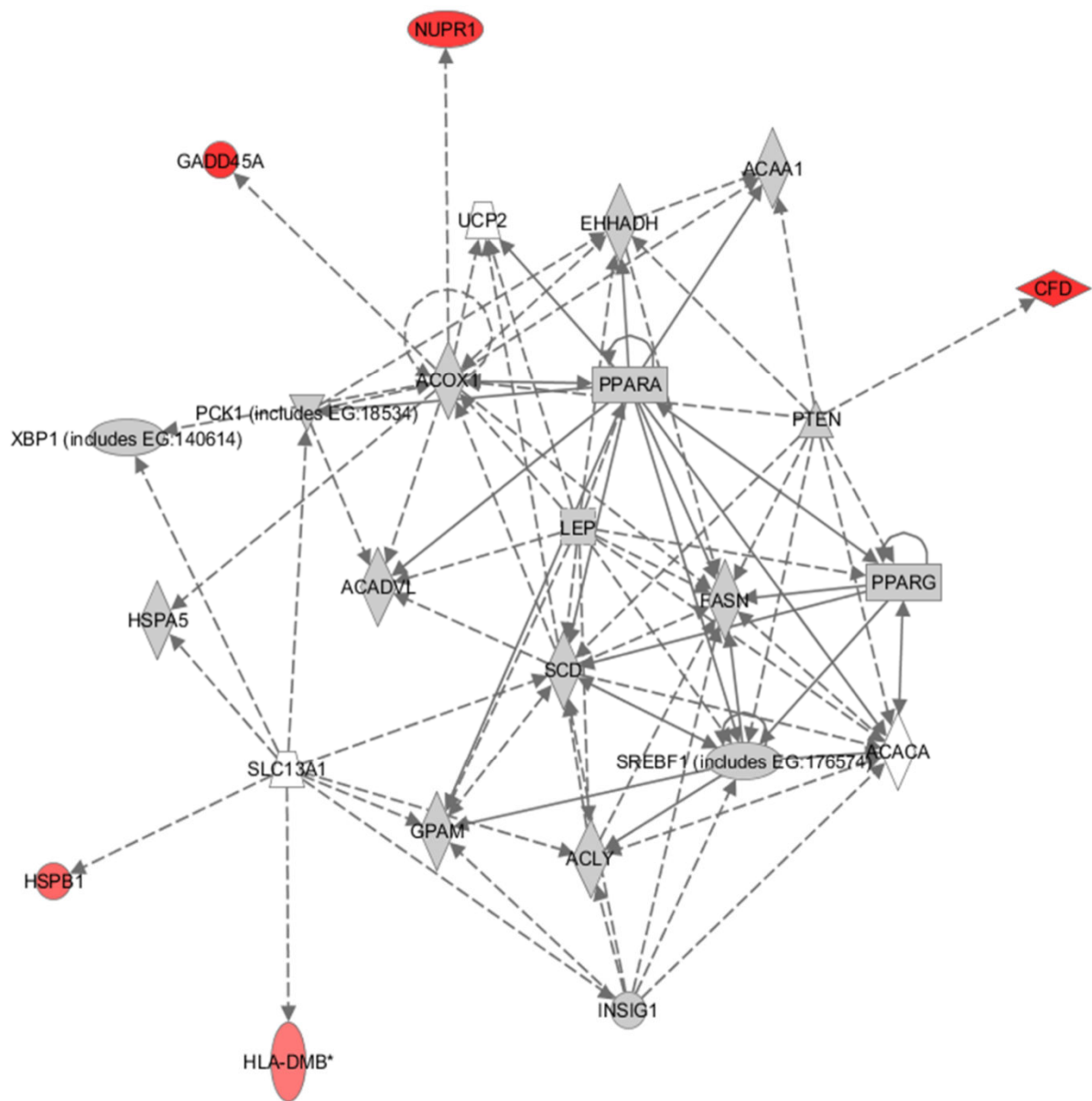


Figura 25 - Rede de genes envolvidos em doenças gastrointestinais, disfunção no sistema hepático e esteatose hepática. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, relação indireta. Vermelho, superexpressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®).

Foi observado também que animais idosos apresentavam dois *upstreams regulators* com expressão diferencial e ação específica sobre seus alvos diferencialmente expressos (Tabela 10). Ambos reguladores de transcrição encontram-se na rede gênica envolvida no comportamento, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso e doenças nutricionais (Figura 24), embora em posições periféricas na rede. *Abcc4* atua como regulador dos níveis de nucleotídeos cíclicos e apresenta uma expressão positiva em hepatócitos de animais idosos. *Per2*, por outro lado, está envolvido com ritmo circadiano e é essencial para a regulação de glicocorticoides, uma expressão reduzida desse gene poderia levar à intolerância à glicose, contudo, em nossos resultados esse gene apresenta-se superexpresso.

Tabela 10 – Regulação dos fatores de transcrição diferencialmente expressos nas suas moléculas-alvos em hepatócitos de camundongos diabéticos.

Gene	Regulação pelo fator de transcrição	<i>Fold Change</i>
Fator de transcrição - <i>Abcc4</i>		2.302
<i>Cyp2b10</i>	Negativa	-2.063
Fator de transcrição - <i>Per2</i>		1.623
<i>Per3</i>	Positiva	4.416

Finalmente, as cinco vias canônicas com mais genes representados estão mostradas na Figura 26 (A). Essas vias interagem entre si, formando dois núcleos sendo que em um deles a via do metabolismo do ácido araquidônico e a do metabolismo do ácido linoleico se encontra na periferia da via com poucas interações. No segundo grupo encontram-se as vias “ativação VDR/RXR e pluripotencialidade de células tronco”, com mais interações em uma rede mais complexa (Figura 26 - B). A via canônica de sinalização dos ritmos circadianos não apresenta nenhum gene em comum com as outras, mostrando-se como “órfã” (Figura 26 – B). Dos dois reguladores *upstream* encontrados, apenas *Per2* faz

parte de uma das cinco vias canônicas mais representadas (Figuras 26 e 27). Contudo *Abcc4* faz parte de outras duas vias canônicas: Resposta ao stress oxidativo mediada por NRF2 e Inibição da função de RXR mediada pelo LPS/IL-1, esta última pontuada entre as cinco primeiras para animais hiperglicêmicos. De forma geral, em camundongos idosos o metabolismo de lipídios mostrou-se bastante alterado, uma vez que envolvem as vias do metabolismo do ácido aracdônico, linoleico entre outras menos representadas. Na via do receptor da vitamina D3, foi observado padrão semelhante de superexpressão e repressão de genes envolvidos com regulação e diferenciação celular. No entanto, apesar de *Gadd45A* e *Ppard* interagirem entre si para a regulação do crescimento celular de alguns tipos de câncer (Han et al, 2003), *SerpinB1* e *Cdkn1a*, por outro lado, atuam de forma independente na diferenciação (Benarafa et al, 2001; Li et al, 2008) (Figura 28).

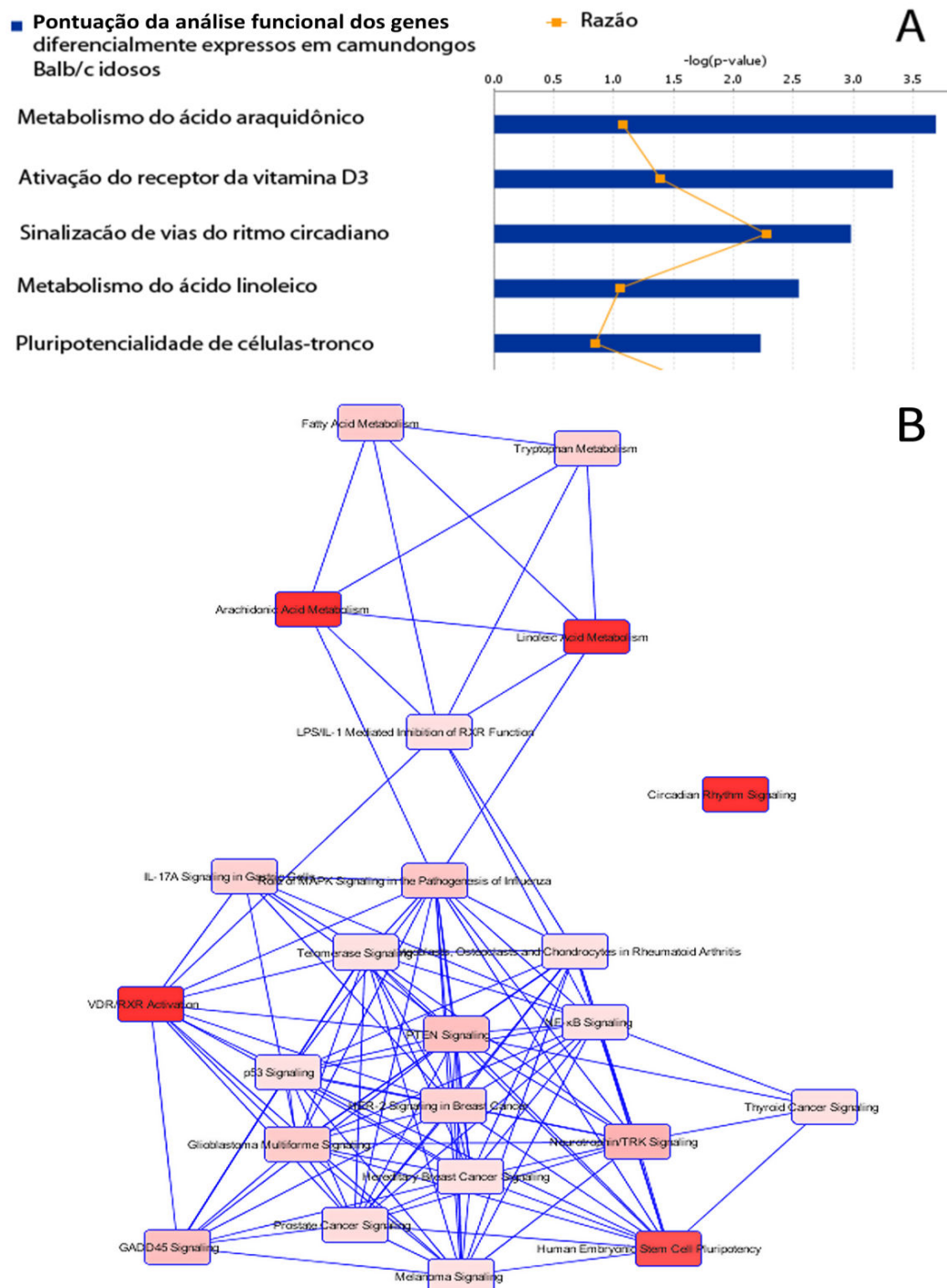


Figura 26 - Vias canônicas alteradas em hepatócitos de camundongos idosos. **A**, as cinco vias com maior alteração em camundongos diabéticos. Razão, número de genes diferencialmente expressos encontrados/número total de genes da via. **B**, rede de integração das vias canônicas alteradas. Quanto maior a intensidade de vermelho, mais genes diferencialmente expressos dentro da via canônica.

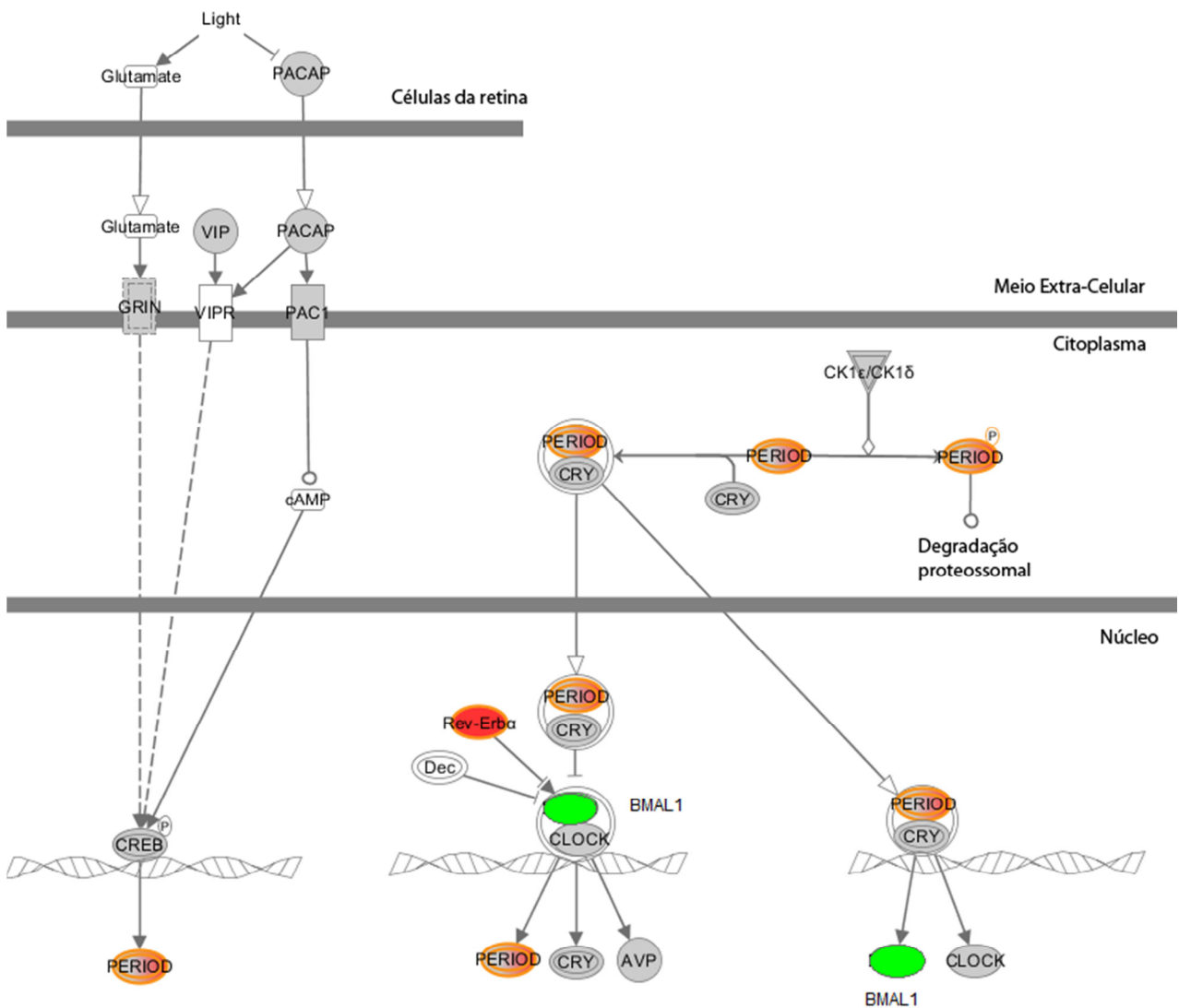


Figura 27 - Via do ritmo circadiano. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; laranja, complexo formado por *Per2* e *Per3* (superexpressos); cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®). Linha cheia, relação direta; linha pontilhada, relação indireta.

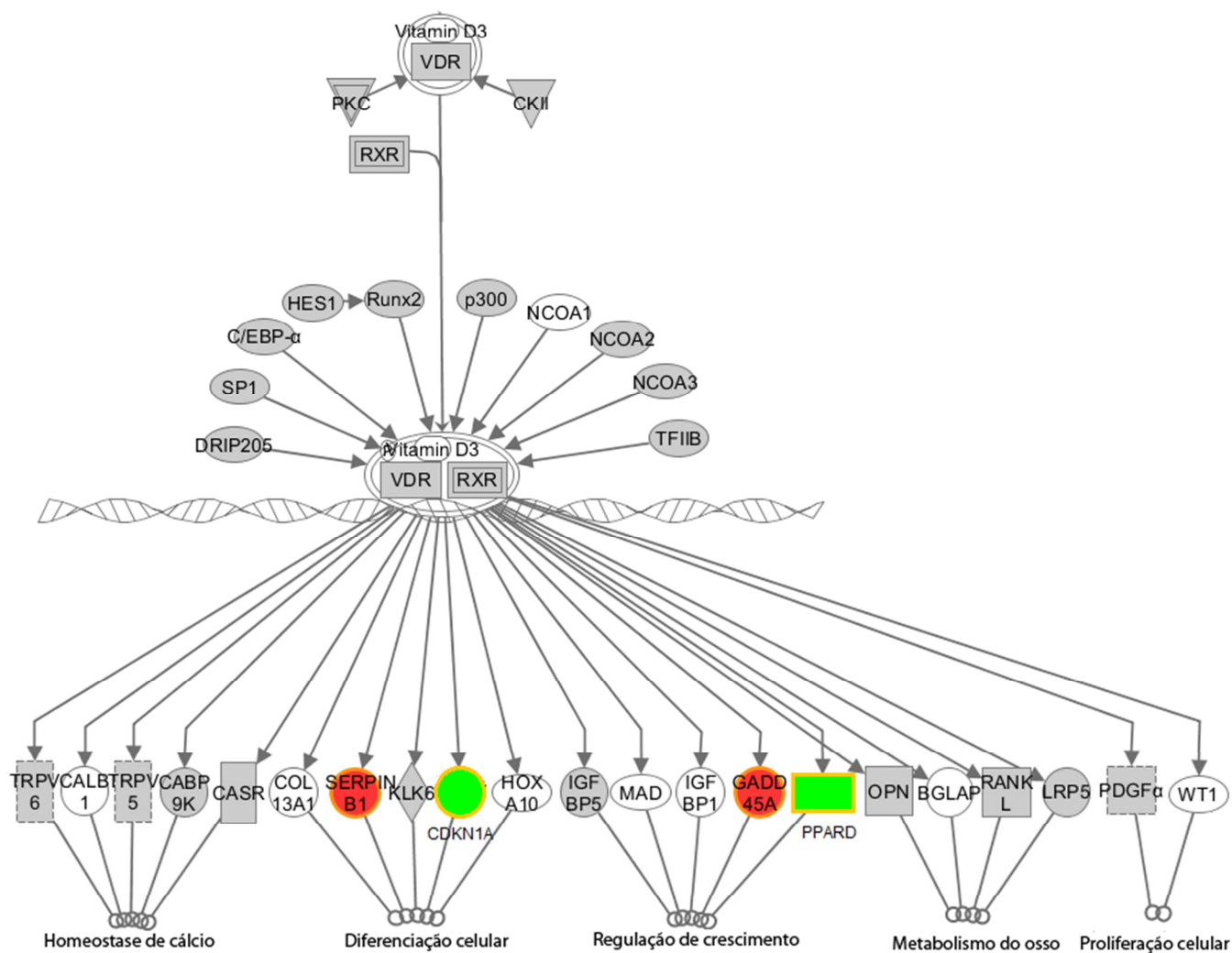


Figura 28 - Via de ativação do receptor da vitamina B3. Vermelho, superexpressão; verde, repressão; cinza, sem diferença de expressão; branco, não se encontra na lista de genes (IPA®). Linha cheia, relação direta.

4.9. Hiperglicemia provoca aumento na expressão gênica, porém diminuição de marcadores epigenéticos

Para estudar a mecanística epigenética em situação de hiperglicemia, foi usado um modelo de células em cultura de hepatocarcinoma humano. Os três genes estudados foram escolhidos pela sua relação com Sirt1 (*Foxo1*) e com o *diabetes mellitus* e envelhecimento (*Igfbp1* e *ApoE*). O meio de cultura com alta concentração de glicose e ausência de insulina promoveu nas células HepG2 um aumento na expressão dos três genes estudados (Figuras 29 - 31). Quando as células eram retornadas a um meio normoglicêmico, a expressão desses genes decrescia, porém com intensidades diferentes. A expressão de *ApoE* apresentou um decréscimo que não atingiu o nível (Figura 29 - A), enquanto *Foxo1* apresentou retorno da expressão a níveis inferiores ao basal (Figura 30 - A) e *Igfbp1* apresentou valores de expressão gênica semelhantes ao grupo “com insulina” (Figura 31 - A).

Para se avaliar o envolvimento de sirtuínas nas situações relatadas, foi realizado tratamento das células HepG2 com nicotinamida. Com este tratamento, os três genes estudados apresentaram resposta diferenciada. O gene *ApoE* não mostrou expressão alterada com o tratamento pela droga em meio normoglicêmico (Figura 29 - A), contudo, a adição de nicotinamida em meio hiperglicêmico promoveu um aumento de expressão desse gene (Figura 29 - A). No caso do gene *Foxo1*, houve apenas redução da expressão gênica quando o tratamento com a nicotinamida se efetuou em meio normoglicêmico (Figura 30 - A). Para o gene *Igfbp1*, o tratamento com a droga elevou a expressão gênica de *Igfbp1* em meio normoglicêmico nos mesmos níveis do meio hiperglicêmico (Figura 31 - A).

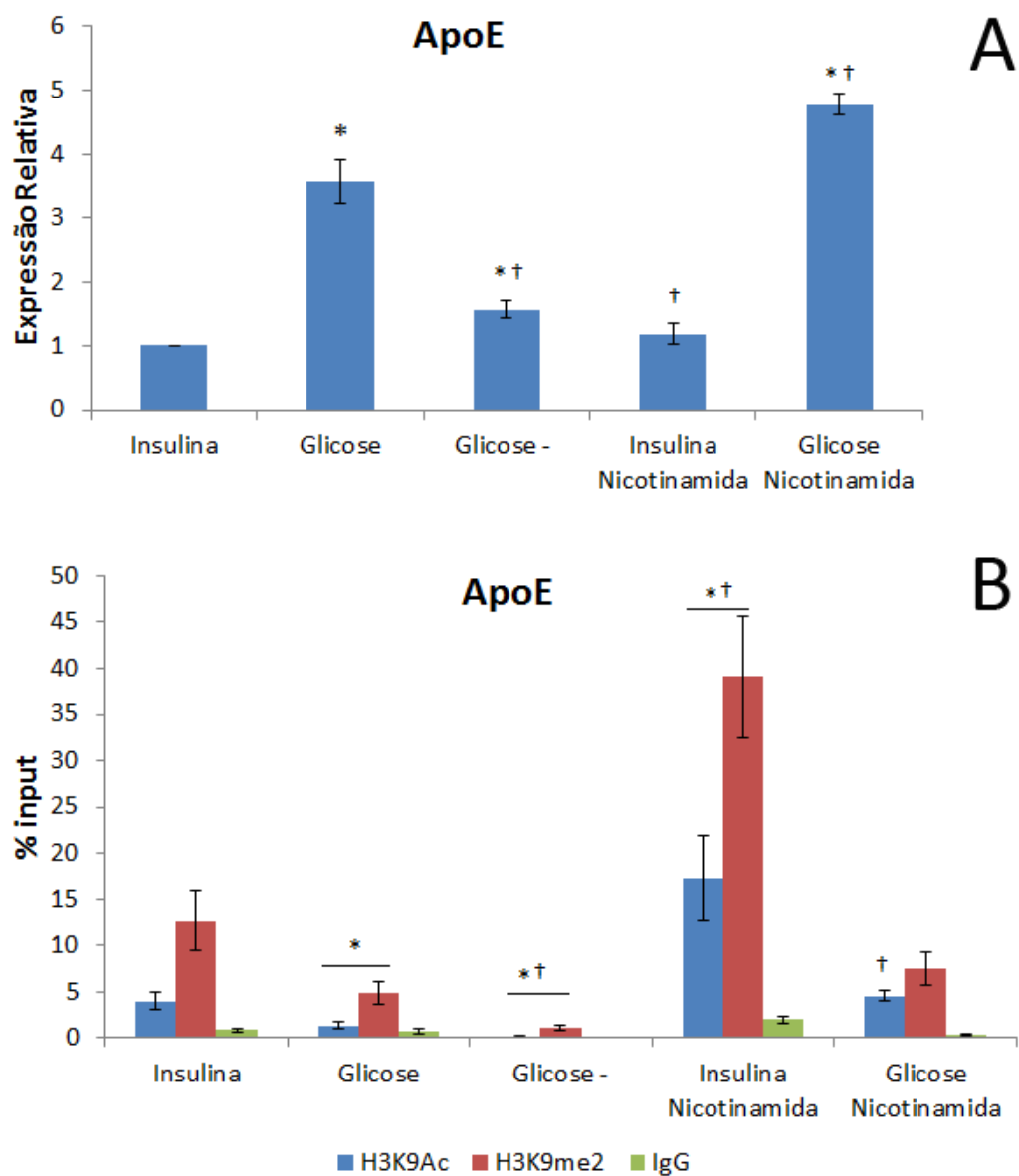


Figura 29 – Expressão relativa (**A**) e marcações epigenética (**B**) do gene *ApoE*. Input, cromatina total usada durante o experimento sem ser imunoprecipitada. *, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com insulina ($P < 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com glicose ($P < 0,05$).

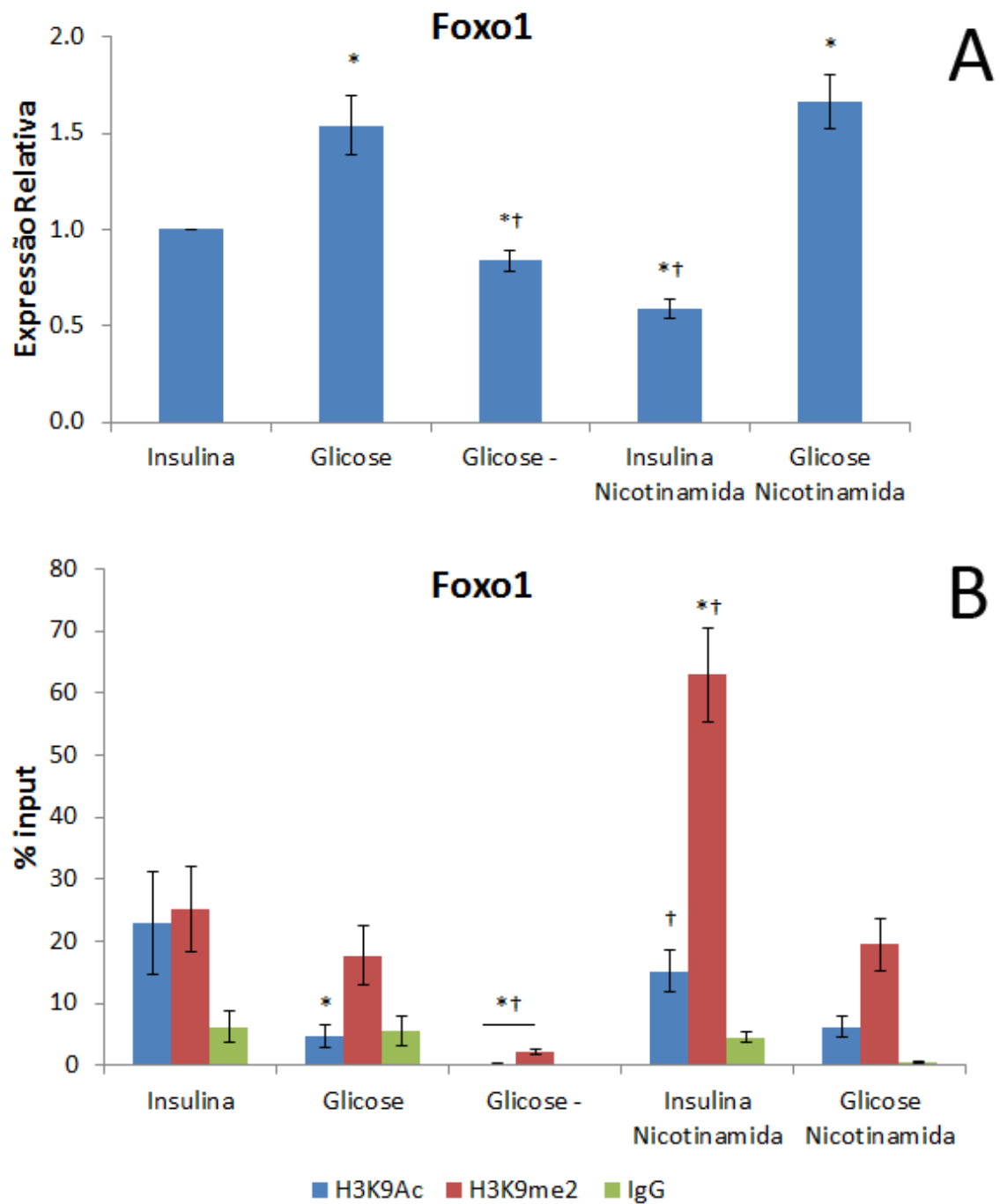


Figura 30 – Expressão relativa (A) e marcações epigenéticas (B) de *Foxo1*. Input, cromatina total usada durante o experimento sem ser imunoprecipitada. *, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com insulina ($P < 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com glicose ($P < 0,05$).

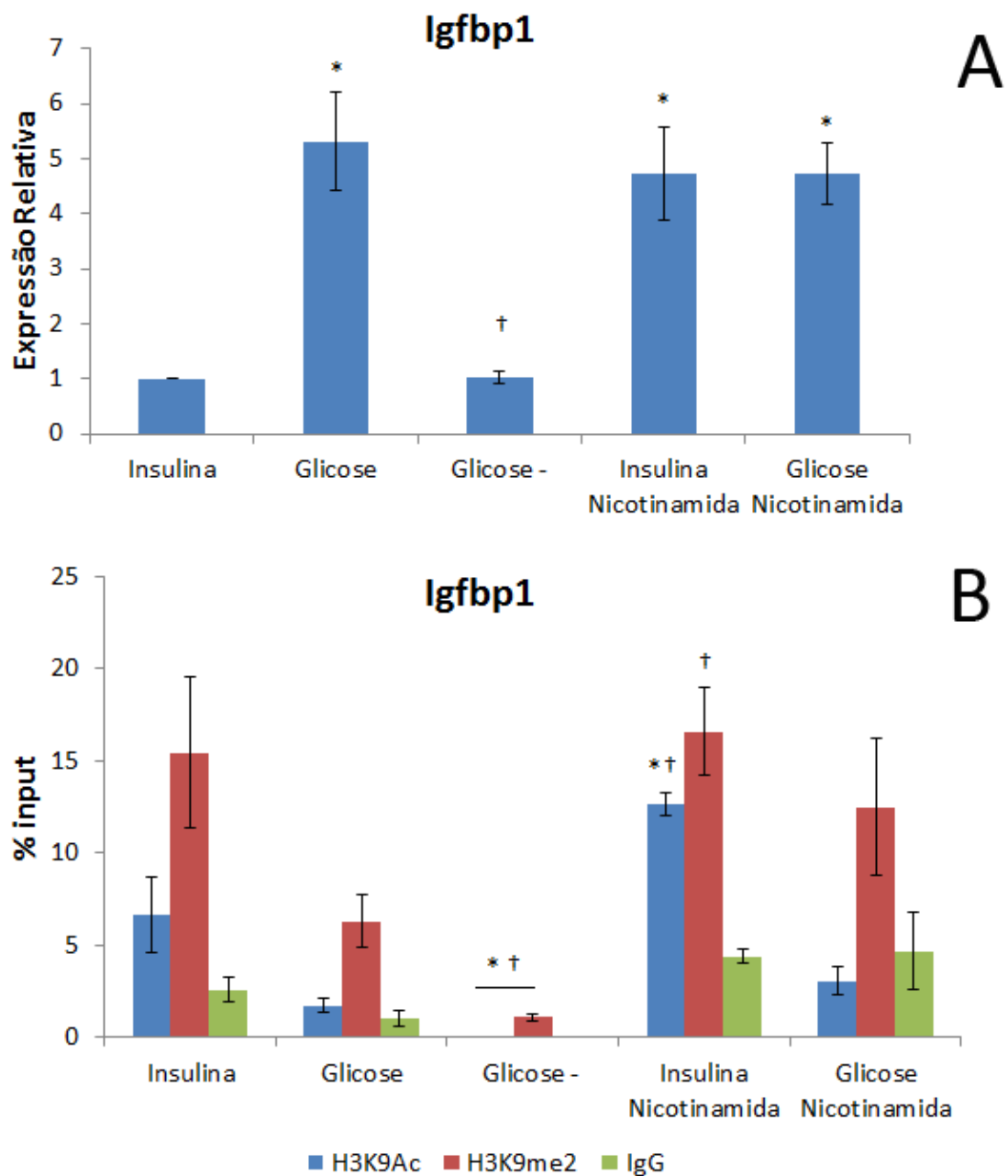


Figura 31 - Expressão relativa (**A**) e marcações epigenéticas (**B**) de *lgfbp1*. Input, cromatina total usada durante o experimento sem ser imunoprecipitada. *, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com insulina ($P < 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com glicose ($P < 0,05$).

A hiperglicemia simulada por um aumento nas concentrações de glicose no meio de cultura para as células HepG2 induziu uma diminuição dos marcadores epigenéticos em todos os genes. É possível observar que na região promotora do gene *ApoE*, ambas as marcações H3K9Ac e H3K9me2 apresentaram-se diminuídas (Figura 29 - B), enquanto no gene *Foxo1*, a redução foi apenas para a H3K9Ac (Figura 30 - B). O gene *Igfbp1* mostrou apenas, não estatisticamente significativa, para a redução dos marcadores (Figura 31 - B).

O retorno ao meio de cultura normoglicêmico não restaurou os níveis de marcações epigenéticas apresentados pelo grupo controle com insulina. Ao contrário, para todos os genes estudados, as marcações tiveram um decréscimo significativo tanto em comparação ao grupo com insulina quanto em relação ao grupo hiperglicêmico, mostrando a perda progressiva de marcações (Figuras 29 – 31 – B).

O tratamento com a nicotinamida em meio normoglicêmico promoveu respostas diferenciadas entre os três genes estudados. No gene *ApoE* houve um aumento significativo de ambas marcações de histonas em comparação àquelas reveladas nos meios normoglicêmico e hiperglicêmico (Figura 29 - B). No gene *Foxo1*, por sua vez, houve significativo aumento da abundância apenas da marcação H3K9me2 (Figura 30 - B). No gene *Igfbp1*, a marcação H3K9Ac foi a mais afetada com o tratamento, sendo diferente daquela dos meios de cultura normoglicêmico e hiperglicêmico (Figura 31 –B).

Quando adicionada a droga ao meio hiperglicêmico, as marcações estudadas não se mostraram diferentes para nenhum dos genes em comparação à situação na qual as células foram cultivadas no meio normoglicêmico e hiperglicêmico, à exceção da H3K9Ac presente no promotor do gene *ApoE* (Figura 29 - B).

4.10. Análise de imagem

Nos histogramas de frequência construídos com valores Feulgen-DNA, em todas as condições experimentais a maioria desses valores se encontra na classe ~2C (Figura 32 A-E), tendo por base que as células HepG2 com ploidia mais baixa são consideradas hiperdiplóides (Chen et al, 1993). Nas células crescidas em meio normoglicêmico (controle), a classe ~2C constitui 83,5% da população celular, enquanto 12,5% e 1,7% das células têm seus valores Feulgen-DNA compreendidos nas classes ~4C e ~8C, respectivamente (Figura 32 - A). O cultivo das células HepG2 em meio hiperglicêmico não trouxe alterações em valores Feulgen-DNA em termos da amostragem populacional considerada (Tabela 11), embora houvesse tendência a um aumento da frequência de valores mais baixos na classe ~2C (Figura 32 - B).

Quando as células cultivadas em meio hiperglicêmico retornaram à condição de normoglicemia, a frequência de núcleos com valores Feulgen-DNA contidos na classe ~2C foi de 63,0%, enquanto a frequência de valores correspondentes às classes ~4C e ~8C passou a 31,2% e 1,1%, respectivamente (Figura 32 - C). Uma baixa frequência de núcleos com valores menores do que aqueles contidos na classe ~2C foi também constatada (Figura 32 - C). Por causa do aumento na frequência de valores correspondentes à classe ~4C nas condição de retorno à normoglicemia, os valores Feulgen-DNA nessa condição experimental diferiram significativamente daqueles apresentados pela condição controle e pelas células cultivadas em meio hiperglicêmico (Tabela 11).

O histograma de frequência de valores Feulgen-DNA de células cultivadas em meio normoglicêmico adicionado de nicotinamida mostrou perfil semelhante ao de células cultivadas em ausência de glicose após terem sido cultivadas em meio hiperglicêmico, embora no primeiro caso a frequência de valores menores do que ~2C tenha sido menor (0,5%) e a de valores maiores que ~4C tenha sido maior (2,3%) (Figura 32 - C,D). A variabilidade dos valores Feulgen-DNA das células cultivadas em meio normoglicêmico adicionado de nicotinamida foi elevada, o que

tornou a diferença entre estes valores e os do controle normoglicêmico não significativas (Tabela 11).

Em células HepG2 cultivadas em meio hiperglicêmico contendo nicotinamida, a variabilidade em valores Feulgen-DNA tenha sido menor do que em células cultivadas em meio normoglicêmico contendo nicotinamida, não se comprovou diferença significativa entre os valores de ambas populações (Tabela 11). No primeiro caso a frequência dos valores contidos na classe ~2C foi de 75,1% e na classe ~4C, de 24,8%; apenas 0,5% de núcleos foram classificados como pertencentes à classe ~8C (Figura 32 - E).

Não foi encontrada diferença significativa na área nuclear das células HepG2 nas diferentes condições experimentais (Tabela 11). No entanto, nas condições de cultivo em meio hiperglicêmico em ausência de nicotinamida ou em meio normoglicêmico em presença de nicotinamida a variabilidade nos tamanhos nucleares foi maior, o que também aconteceu com os valores Feulgen-DNA (Tabela 11). Em um gráfico de correlação valores de área nuclear *versus* valores Feulgen-DNA constatou-se que as células cultivadas em meio normoglicêmico na presença ou ausência de nicotinamida e mesmo naquelas retornadas de um meio hiperglicêmico apresentaram curva de regressão semelhante e com valores de R^2 menores do que apresentados pelas células cultivadas em meio hiperglicêmico na ausência ou presença de nicotinamida (Figura 33 – A-E). Apesar do valor de R^2 decrescer na condição de cultivo das células em meio hiperglicêmico contendo nicotinamida em comparação ao R^2 correspondente às células cultivadas em meio hiperglicêmico sem nicotinamida, este ainda mostrou-se maior dos que os valores de R^2 apresentados pelas células cultivadas em meio normoglicêmico (Figura 33 – A-E).

Também não foram demonstradas diferenças significativas em Sc% nas várias condições experimentais (Tabela 11). No entanto, quando foram correlacionados valores de Sc% *versus* valores Feulgen-DNA, a distribuição de núcleos ~2C ocupou maior intervalo de dispersão, representada por uma reta de referência, do que núcleos com ploidia mais altas (Figura 34).

Tabela 11 – Valores Feulgen-DNA e outros parâmetros de imagem em células HepG2 cultivadas em meio hiperglicêmico, após retorno à normoglicemia e em presença de nicotinamida.

Tratamentos	A _T (u.a.)			Área Nuclear (μm ²)			Sc%		AAR	
	X	SD	Med	X	SD	Med	X	SD	X	SD
Insulina (Controle)	100.73	37.28	89.82 ^a	188.19	67.76	172.38 ^a	47.17 ^a	15.02	1.57 ^a	0.23
Glicose	101.59	43.19	85.00 ^{ab}	191.20	82.11	176.38 ^a	46.28 ^a	15.08	1.55 ^a	0.21
Glicose -	108.67	38.26	97.25 ^c	197.80	63.52	180.34 ^a	47.41 ^a	16.35	1.60 ^{ab}	0.28
Insulina Nicotinamida	113.82	56.11	97.77 ^{ac}	203.42	86.59	181.50 ^a	47.13 ^a	14.64	1.67 ^b	0.30
Glicose Nicotinamida	103.73	35.10	90.85 ^{ac}	194.62	67.10	183.75 ^a	46.68 ^a	12.42	1.66 ^b	0.28

Med, mediana; SD, desvio-padrão; u.a., unidades arbitrárias; X, média aritmética. a-c, letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05; Mann-Whitney para Valores Feulgen-DNA e Área Total; ANOVA para Sc% e AAR), n = 175. A_T, valores Feulgen-DNA para cromatina total; S_c%, área nuclear coberta por cromatina “condensada”; AAR, razão de absorção média, que expressa o contraste entre cromatina “condensada” e “não-condensada” (Vidal et al, 1973).

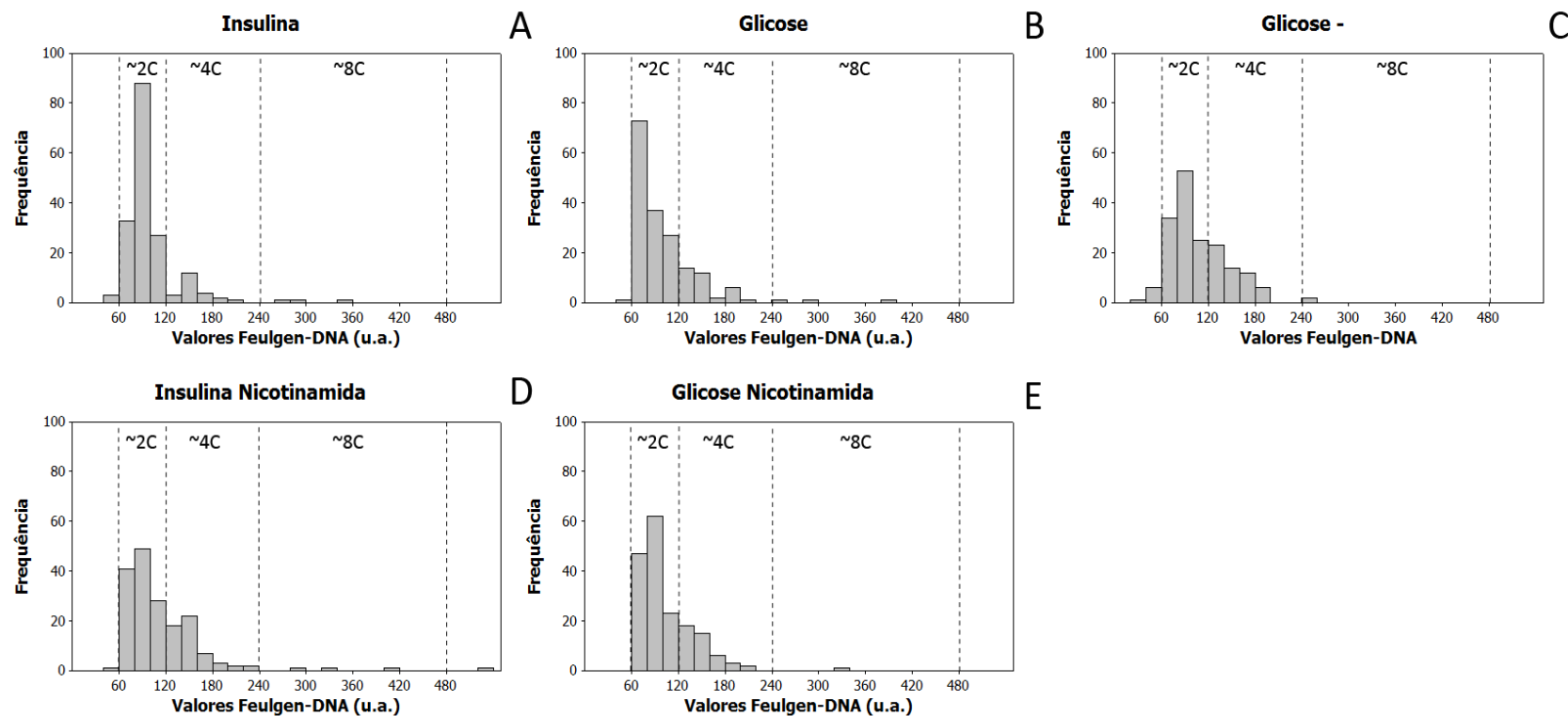


Figura 32 – Histograma dos valores Feulgen-DNA de células HepG2 tratadas em meio normoglicêmico (**A**), hiperglicêmico (**B**), retorno à normoglicemia (**C**) e com nicotinamida em meio normoglicêmico (**D**) e hiperglicêmico (**E**). u.a., unidades arbitrárias, n = 175.

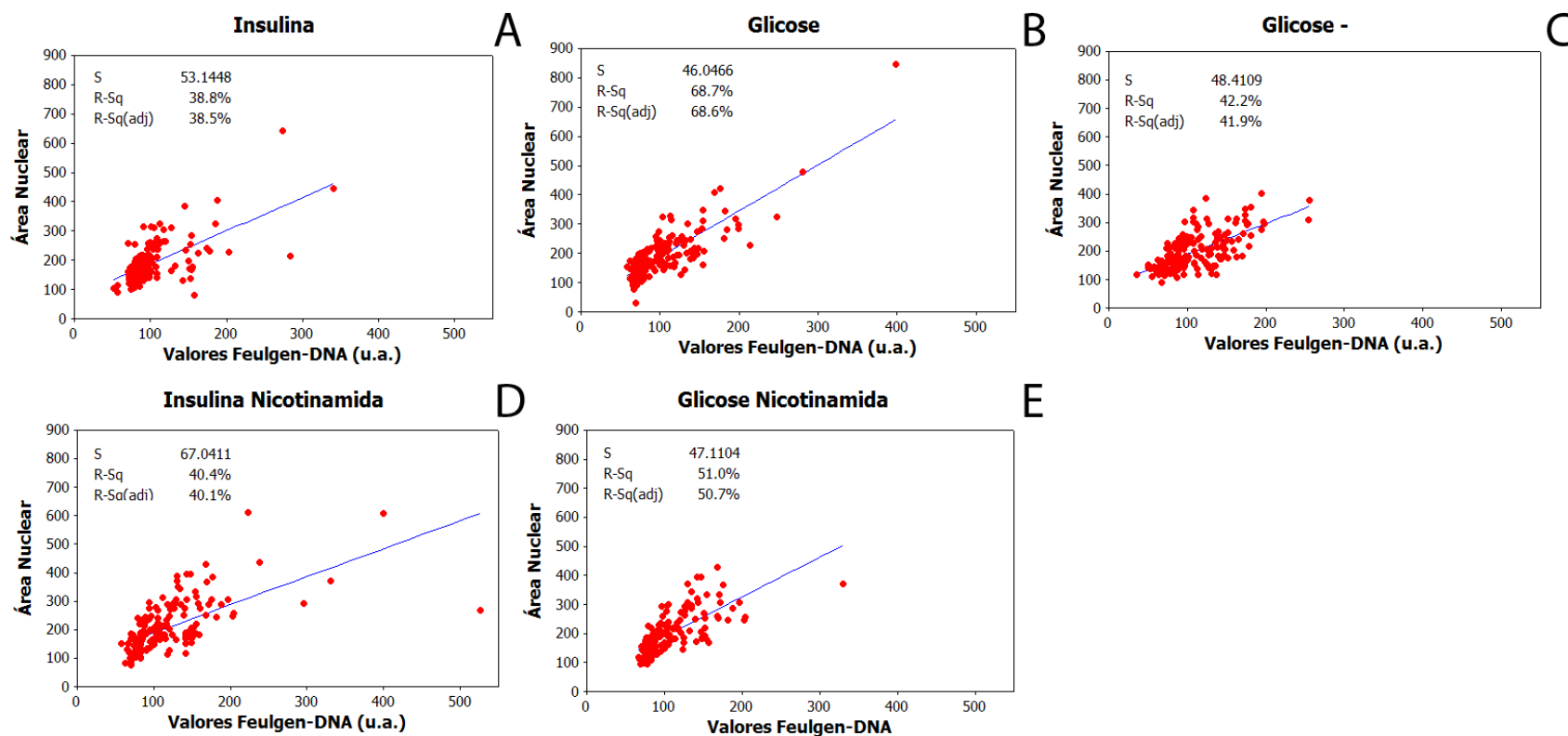


Figura 33 – Correlação de valores Feulgen-DNA vs. Área nuclear total para células HepG2 tratadas em meio normoglicêmico (A), hiperglicêmico (B), retorno à normoglicemia (C) e com nicotinamida em meio normoglicêmico (D) e hiperglicêmico (E), n = 175.

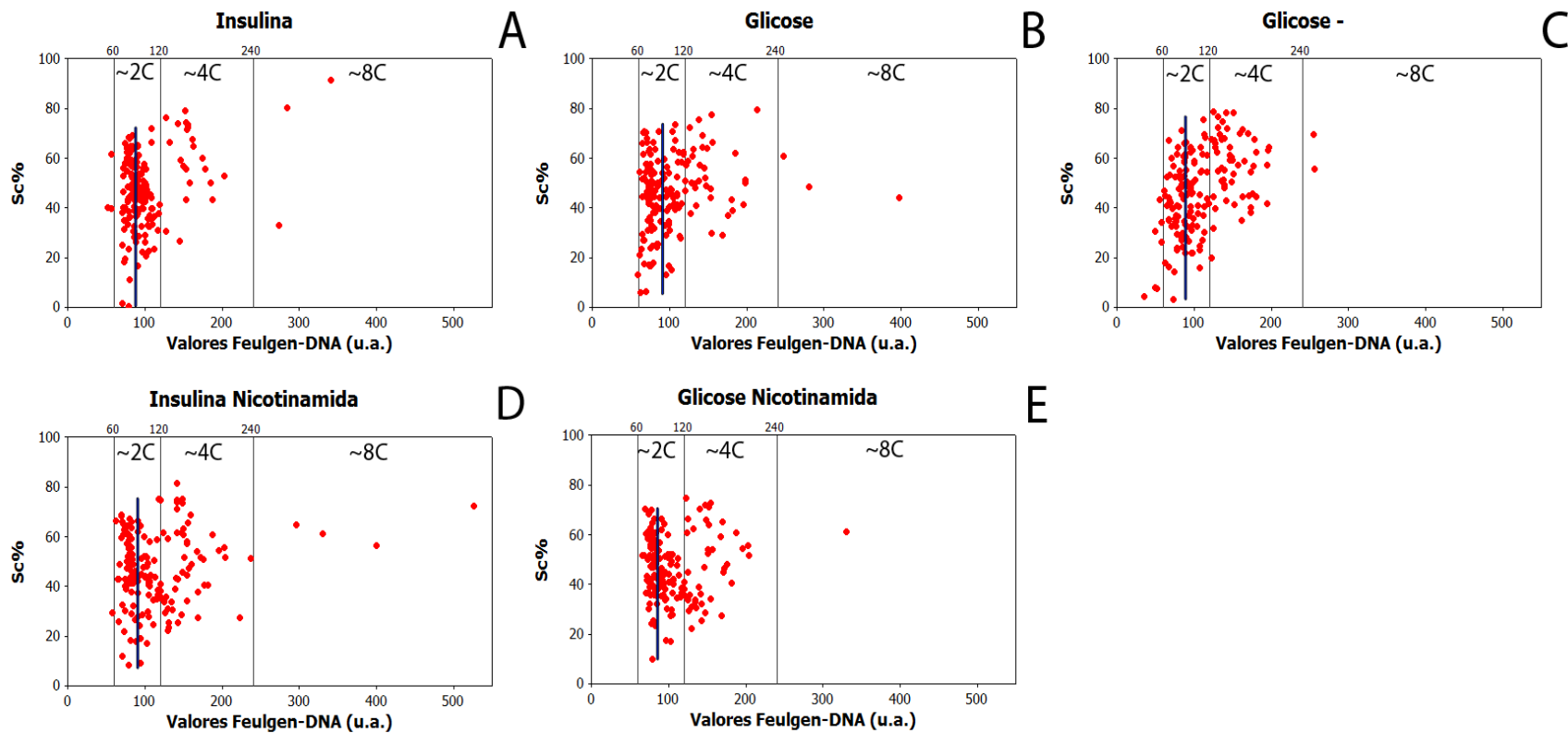


Figura 34 – Gráfico de dispersão dos valores Feulgen-DNA totais em relação aos valores de S_c% em células HepG2 cultivadas em meio normoglicêmico (**A**), hiperglicêmico (**B**), retorno à normoglicemia (**C**) e com nicotinamida em meio normoglicêmico (**D**) e em meio hiperglicêmico (**E**). u.a., unidades arbitrárias. A reta em azul representa a dispersão de valores S_c% de núcleos ~2C, n = 175.

Quanto ao parâmetro AAR, que corresponde ao contraste entre cromatina “condensada” e “não condensada”, houve um aumento significativo em seu valor nas condições de cultivo das células em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, desde que contendo nicotinamida (Tabela 11). Quando construídos gráficos de dispersão de Sc% *versus* AAR, como proposto por Vidal (1984), observa-se que nas células cultivadas em meio normoglicêmico os núcleos de ploidia maior que ~2C mostram valores de Sc% concentrados entre 60-80% e valores de AAR baixos (<1,5), ou seja maior condensação e homogeneidade de distribuição da cromatina do que núcleos ~2C (Figura 35 – A). Nos núcleos ~2C observa-se maior variabilidade na condensação cromatínica e no nível de contraste entre cromatina condensada e não condensada do que nos núcleos >~2C (Figura 35 – A).

Nas células cultivadas em meio hiperglicêmico, os núcleos ~2C, por sua vez, apresentaram valores de Sc% predominantemente menores de 60% (Tabela 12) e AAR se estendendo de 1,2 a 1,9, de modo semelhante ao que se verifica para a maioria dos núcleos ~4C (Figura 35 – B, Tabela 12). Neste caso, o leve aumento na frequência de núcleos de classe de ploidia maiores que ~2C não aumentou a porcentagem de núcleos com Sc% maiores que 60% (Tabela 12; Figura 35 – B), sendo que as frequências mais elevadas foram encontradas em núcleos de classes $\leq$ ~2C. Nas células retornadas a um meio normoglicêmico observa-se que assim como a porcentagem de núcleos de maior ploidia dobrou em relação às células cultivadas em meio normoglicêmico (controle), a porcentagem de núcleos com valores de Sc% maiores que 60% também dobrou (Figura 35 – C, Tabela 12).

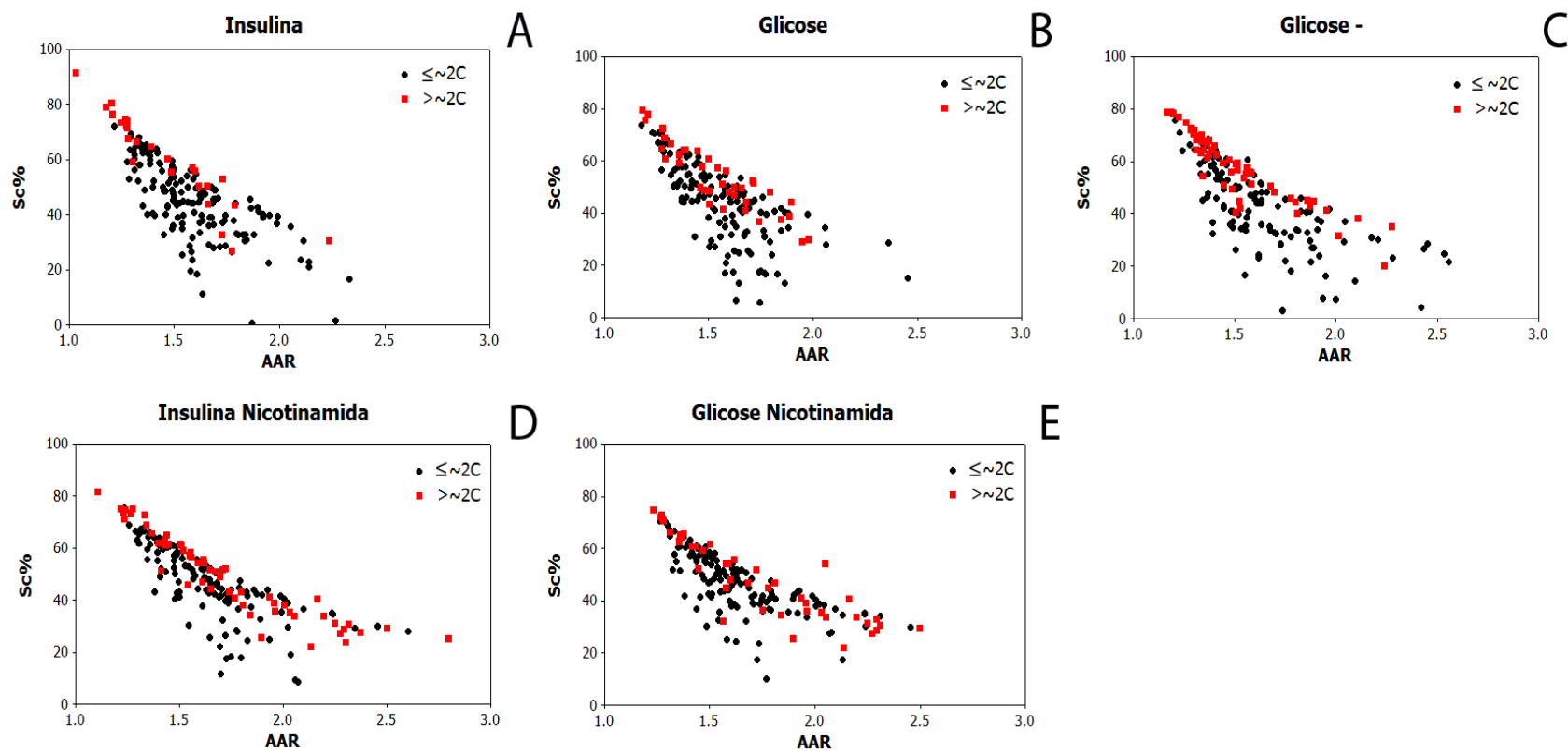


Figura 35 – Diagrama de dispersão de AAR vs. Sc% para células HepG2 tratadas em meio normoglicêmico (A), hiperglicêmico (B), retorno à normoglicemia (C) e com nicotinamida em meio normoglicêmico (D) e hiperglicêmico (E), n = 175.

No entanto, apesar dessas células de ploidia mais elevada apresentarem maior porcentagem de núcleos com valores de AAR menores do que 2,0, ou seja, maior condensação cromatínica e homogeneidade em sua distribuição, a porcentagem dos núcleos que apresentaram AAR maior do que 2,0 também aumentou (Figura 35 – C; Tabela 12).

Quanto às células tratadas com nicotinamida, tanto em meio normoglicêmico quanto em meio hiperglicêmico, a distribuição dos núcleos no gráfico de dispersão é bastante semelhante (Figura 35 – D, E). Quando avaliadas a frequência de núcleos com Sc% maior do que 60% para as células sob tratamento com nicotinamida em meio de cultura normoglicêmico observou-se semelhança às células retornadas ao meio normoglicêmico, tanto para núcleos de classe $\leq \sim 2C$ quanto para núcleos de classes maiores que $\sim 2C$ (Tabela 12). Ambos grupos tratados com nicotinamida, não somente apresentaram maiores frequências de núcleos com $AAR \geq 2,0$ mas estas frequências foram mais elevadas nos núcleos de classe $> \sim 2C$ (Figura 35, Tabela 12).

Tabela 12 – Frequência de núcleos com maior contraste entre cromatina condensada e não condensada ($AAR \geq 2,0$) e com maior área coberta por cromatina condensada ($Sc\% > 60\%$) em células HepG2.

Tratamentos	Frequência nuclear (%) – $AAR \geq 2,0$		Frequência nuclear (%) – $Sc\% > 60\%$		Frequência nuclear total (%)	
	Classe	Classe	Classe	Classe	Classe	Classe
	$\leq \sim 2C$	$> \sim 2C$	$\leq \sim 2C$	$> \sim 2C$	$\leq \sim 2C$	$> \sim 2C$
Insulina	3,9	0,6	13,1	7,4	85,8	14,2
Glicose	2,3	0,0	11,4	7,4	78,3	21,7
Glicose-	6,2	2,3	11,4	14,8	67,6	32,4
Insulina	6,8	8,5	11,9	10,2	67,2	32,8
Nicotinamida						
Glicose	7,9	7,3	9,6	7,3	75,1	24,9
Nicotinamida						

4.11. As marcas epigenéticas nos genes *Apoe*, *Foxo1* e *Igfbp1* em hepatócitos de camundongo e em células HepG2 não mostraram o mesmo perfil.

Com o objetivo de se verificar se camundongos diabéticos apresentavam declínio das marcas epigenéticas H3K9Ac e H3K9me2, como observado em células HepG2 cultivadas em meio hiperglicêmico e retorno à glicemia, foi realizada ChIP para os promotores dos genes *Apoe*, *Foxo1* e *Igfbp1*. Observou-se que apenas para o gene *Foxo1* houve um aumento da H3K9Ac em camundongos NOD hiperglicêmicos. Animais diabéticos, por outro lado, não apresentaram declínio de H3K9Ac nos promotores dos genes *Foxo1* e *Igfbp1* nem declínio de H3K9me2 no gene *Igfbp1* (Figura 36 A-C).

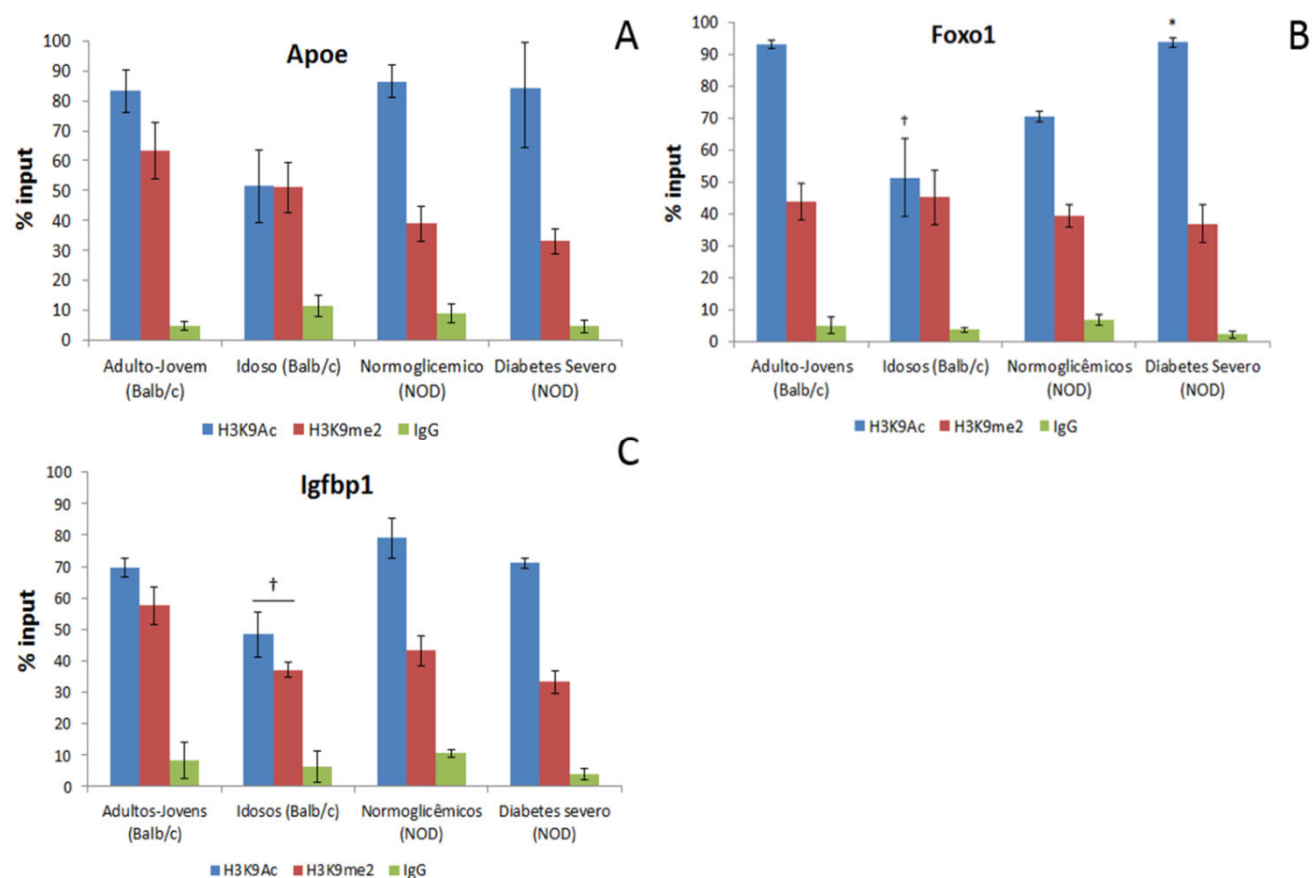


Figura 36- Marcações epigenéticas para os genes *Apoe* (A), *Foxo1* (B) e *Igfbp1* (C) em hepatócitos de camundongos. †, diferença significativa em relação aos adulto-jovens ($P < 0.05$; Teste T-Student). *, diferença significativa em relação ao normoglicêmico ($P < 0.05$; Teste T-Student).

5. Discussão

5.1. Poliploidia e remodelação cromatínica

A poliploidia é um fenômeno fisiológico comum no fígado de roedores como ratos e camundongos que apresentam, quando adultos, uma frequência de 80-90% de hepatócitos poliploides (Celton-Morizur et al, 2010), sendo originada especialmente por citocinese incompleta (Gendric et al, 2012). Como já foi observado anteriormente, o diabetes e o envelhecimento colaboram para o aumento da frequência de hepatócitos poliploides em camundongos (Moraes et al, 2007; Mello et al, 2009). Neste trabalho, a poliploidia de hepatócitos foi avaliada simultaneamente tanto em animais diabéticos como em animais idosos e foi confirmado o aumento de hepatócitos com maiores classes de ploidias nas duas situações experimentais, contudo, com intensidades diferentes.

Apesar das consequências celulares da poliploidização não estarem bem definidas, sabe-se que o aumento da ploidia em fígado está associado com proteção contra estresses, como no caso de hiperglicemia e até com o envelhecimento (Anatskaya & Vinogradov, 2010). A duplicação do genoma tem sido relacionada com a ativação de reparo a danos no DNA e recombinação homóloga (Lu et al, 2007). Animais NOD já apresentavam uma tendência à poliploidia mesmo em situação de normoglicemia, quando comparados com animais Balb/c de mesma idade (linhagem usada como controle para animais envelhecidos), o que poderia indicar uma antecipação à situação de hiperglicemia já incorporada no epigenoma dessa linhagem.

A hiperglicemia e o envelhecimento também provocam alterações, com intensidades diferentes, na acessibilidade da cromatina por nucleases. Esse aumento indica que a cromatina dos hepatócitos de animais hiperglicêmicos se encontra em um estado mais descompactado e acessível para fatores de transcrição e outras proteínas. Esse ensaio, contudo, não distingue a acessibilidade da cromatina entre núcleos com diferentes graus de ploidia, uma vez que o ensaio utiliza um *pool* de núcleos isolados. No entanto, com o estudo de

parâmetros texturais em análise de imagem, é possível detectar um decréscimo de entropia em núcleos com maiores ploidias, indicando maior homogeneidade na compactação da cromatina, com a hiperglicemia severa, uma situação inversa do que acontece em animais normoglicêmicos idosos. Estes últimos resultados confirmam dados observados para camundongos idosos Uni/A, nos quais ocorre o destacamento da matriz nuclear de sequências de DNA transcricionalmente inativas, o que favorece a formação de fibras de cromatina estendidas (Moraes et al, 2010). A presença de pontos de heterocromatina nesses animais também corrobora os dados observados pelo ensaio da MNase, quando após cinco minutos de digestão ocorre uma queda na taxa de clivagem pela enzima. Tais pontos heterocromáticos podem estar relacionados com *foci* heterocromáticos ligados à senescência (SAHFs) (Gonzalo, 2010), embora haja relatos de que as SAHFs não está diretamente associada com senescência (Kosar et al., 2011). A remodelação cromatínica observada nos animais hiperglicêmicos, por sua vez, pode ser ocasionada por fatores epigenéticos como alterações em sirtuínas e na abundância de metilação de DNA, uma vez que há relatos de hipometilação de DNA em hepatócitos de ratos diabéticos (Gray & Meyts, 2005; Williams et al, 2008).

5.2. Sirtuínas e marcações epigenéticas

Dentre várias proteínas envolvidas na remodelação cromatínica, as sirtuínas apresentam um papel importante na coordenação de mudanças epigenéticas na cromatina de hepatócitos de camundongos NOD diabéticos e Balb/c idosos. Sirt1, especificamente, diminui a instabilidade genômica e promove a supressão de oncogenes (Oberdoerffer et al, 2008; Shin et al, 2010) e desacetila o fator de transcrição PGC-1 α , o qual, por sua vez, atua nos hepatócitos como um sensor nutricional, modulando as vias da gliconeogênese e glicólise (Rodgers et al, 2008; Canto & Auwerx, 2009). Como observado em animais com hiperglicemia severa, Sirt1 e PGC-1 α mostram-se mais abundantes em comparação aos animais normoglicêmicos, apesar de sua atividade não acompanhar os níveis de

abundância encontrados. A análise da razão NAD^+/NADH , indica que o não aumento na disponibilidade desta molécula possa ser o fator limitante para a ação de Sirt1, mantendo os níveis de atividade dessa sirtuína abaixo do esperado.

Em casos de diabetes do tipo I não tratados, a falta da sinalização da insulina poderia ser interpretada pela célula como um estado de restrição calórica (Nelson & Cox, 2004), apesar da disponibilidade de glicose, o que induziria um aumento de abundância, porém não de atividade. No fígado, existem relatos de que glicose em excesso poderia diminuir a abundância e a atividade de Sirt1, ativando a via da glicólise devido a ausência de insulina em uma situação de DM1 (Guarente, 2011). Em idosos, o decréscimo da abundância e atividade de Sirt1, assim como da razão NAD^+/NADH , poderiam ser indícios de um decréscimo generalizado no metabolismo celular (Gonzalo, 2010; Shin et al, 2010). Nos idosos essa redução poderia estar relacionada com o decréscimo nas taxas de gliconeogênese e cetogênese, da capacidade anti-oxidante geral do órgão e aumento da peroxidação lipídica (Spindler et al, 2003; Braidy et al, 2011).

Dos alvos histônicos de Sirt1, apenas a modificação H3K9Ac mostrou-se mais abundante em hepatócitos de animais diabéticos e idosos, em comparação aos seus respectivos controles. A acetilação de histonas é importante para o estabelecimento de um estado transcricionalmente competente da cromatina (Görisch et al, 2005). H3K9Ac, especificamente, é normalmente uma marca de ativação gênica, pois se encontra usualmente presente em promotores de genes ativos e colabora com o recrutamento de fatores de transcrição (Nakamura et al, 2010). O aumento na abundância dessa marca em hepatócitos de camundongos com hiperglicemia severa poderia indicar um padrão de expressão gênica diferenciado propiciando ao organismo adaptar-se a longos períodos de ausência da insulina. No entanto já foi observada a presença de H3K9Ac em genes em estado represso (Gatta & Mantovani, 2010) assim como diminuição em sua abundância em experimentos com ratos machos envelhecidos (Kawakami et al, 2009).

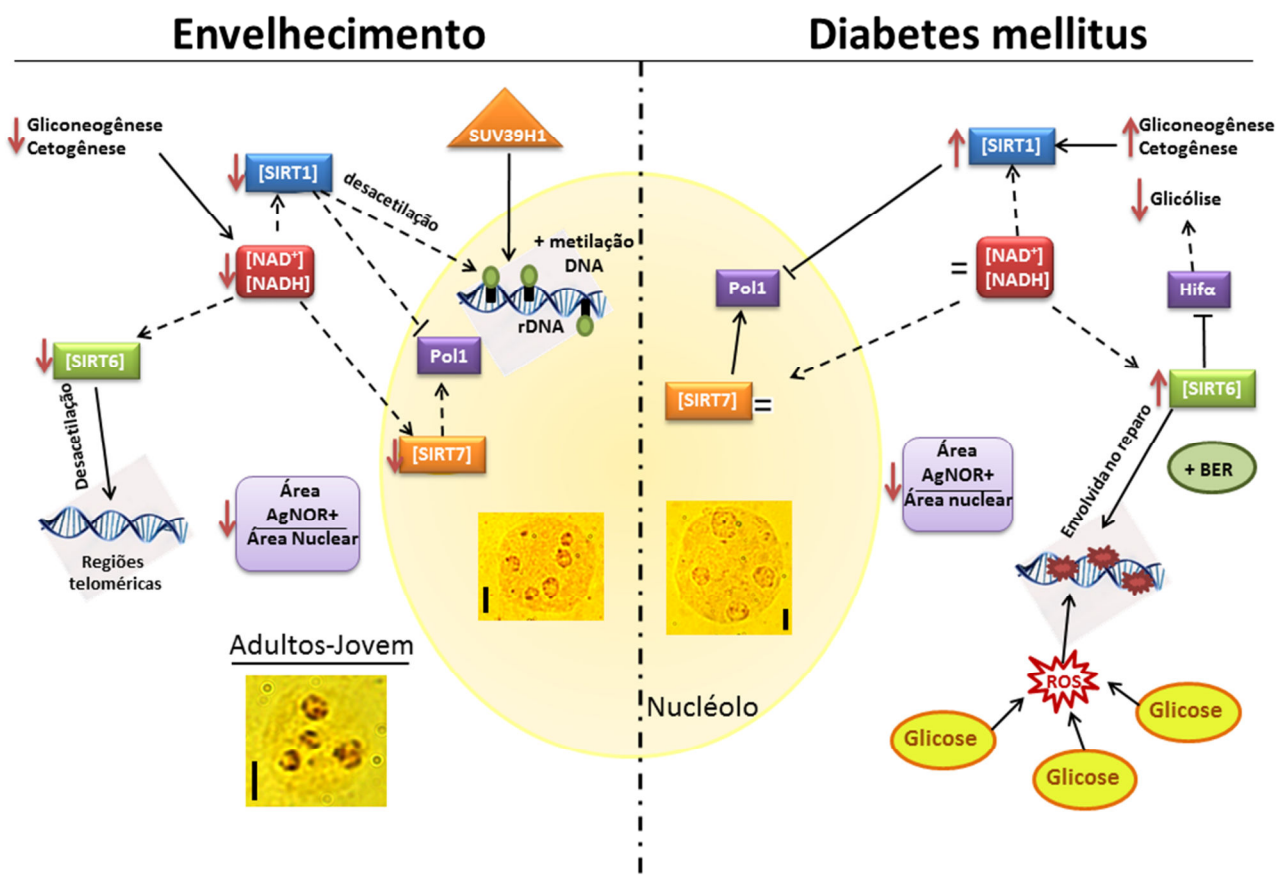


Figura 37 – O efeito do envelhecimento e o *diabetes mellitus* severo do tipo I sobre a abundância e atividade de Sirtuínas nucleares em hepatócitos de camundongos. Setas vermelhas indicam decréscimo ou acréscimo de abundância. Setas pretas indicam ação. Linhas pontilhadas indicam ação reduzida ou incompleta. As fotomicrografias mostram a resposta AgNOR positiva em núcleos de hepatócitos. Barra, 10 µm.

Em idosos, todos os alvos histônicos de Sirt1, com exceção de H1K26Ac, apresentaram abundância relativa aumentada em comparação com animais adultos-jovens, indicando que o decréscimo na abundância e na atividade dessa sirtuína faz com que seus alvos permaneçam acetilados e contribuam para um estado mais descompactado da cromatina, como observado pelo ensaio com MNase e análise de imagem (artigo científico 1 – Anexo I).

Sirt6, assim como Sirt1, têm em comum a modificação de histona H3K9Ac como alvo e ambas estão envolvidas direta ou indiretamente com o envelhecimento e a inflamação (Pfluger et al, 2008; Van Gool et al, 2009). Foi observado neste estudo que a abundância de Sirt6 em hepatócitos de animais diabéticos e idosos era semelhante ao observado para Sirt1. Sabe-se que camundongos *knockout* para Sirt6 apresentam hipoglicemia devido à não-repressão do fator de transcrição Hif α , aumentando a absorção de glicose e taxas de glicólise (Zhong et al, 2010). Como foi observado aumento na abundância de Sirt6 em animais hiperglicêmicos, isso poderia estar relacionado com a diminuição das taxas de glicólise encontradas em situação de DM. Sirt6 também está envolvida com reparo de danos ao DNA e geralmente encontra-se em grande abundância em presença de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mostoslavsky et al, 2006). No diabetes, o desequilíbrio do processo de cetogênese acumula altos níveis de ROS que poderiam causar danos ao DNA (Berg et al, 2004). De fato, animais hiperglicêmicos apresentaram uma porcentagem elevada de células com elevado nível do índice de dano ao DNA (IDD), parâmetros que se assemelharam ao controle positivo. Em camundongos idosos, Sirt6, assim como Sirt1, apresentaram baixa abundância. O decréscimo em Sirt6 já havia sido relacionado com envelhecimento precoce em camundongos *knockout* para esta proteína, uma vez que Sirt6 previne disfunção telomérica quando desacetila H3K9Ac dessas regiões (Tennen et al, 2010).

Sirt7 é uma sirtuína nuclear que se localiza preferencialmente em regiões nucleolares e está envolvida na elongação e transcrição do rDNA (Ford et al, 2006). Nos animais diabéticos não se observou diferença na abundância de Sirt7, enquanto em idosos o nível dessa proteína diminuiu. Nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que em hepatócitos de animais idosos ocorre uma inativação do rDNA provavelmente pelo destacamento dessas sequências de DNA da matriz nuclear (Moraes et al, 2010). O decréscimo na abundância de Sirt7 poderia estar relacionado com a inativação do rDNA observada por Moraes e colaboradores (2010), uma vez que esta proteína age na elongação da transcrição do rRNA,

ativando a RNA polimerase I, antagonicamente à Sirt1, que inibe esta enzima (Ford et al, 2006). Mudanças na posição do rDNA e em sua interação com outros componentes da matriz nuclear podem indicar tanto mudança dos níveis de transcrição do rDNA, como da organização do nucléolo. Tanto em animais diabéticos como em idosos houve um decréscimo na razão área AgNOR positiva/área nuclear, contudo esse resultado deu-se por diferentes causas: enquanto animais com hiperglicemia severa apresentaram redução nessa razão principalmente pelo aumento no valor de área nuclear, animais idosos apresentaram uma combinação de aumento de área nuclear e decréscimo na área AgNOR positiva. Como descrito no artigo científico 1 (Anexo I), ambos os grupos experimentais de animais hiperglicêmicos e envelhecidos apresentaram aumento na área nuclear em células submetidas à reação de Feulgen, e o mesmo foi confirmado utilizando-se a técnica de AgNOR. Somado a isso, animais hiperglicêmicos mostraram diminuição nos níveis de RNA totais (Mello et al, 2009). Havia sido relatado na literatura que a diminuição de áreas nucleolares estaria relacionada com aumento na metilação do rDNA (Swisshelm et al, 1990; Machwe et al, 2000). A técnica de Native-ChIP realizada para a marcação de 5-metil-citosina na região correspondente ao rDNA 18S tanto de regiões ativas como inativas indicou, de fato, aumento na metilação desse sítio em animais idosos, enquanto animais diabéticos não apresentaram nenhuma diferença significativa.

5.3. Expressão gênica diferencial

O DM do tipo I é uma doença de origem auto-imune que fundamentalmente desregula o metabolismo de carboidratos e de lipídios do organismo devido à ausência de insulina. Os genes diferencialmente expressos encontrados em animais hiperglicêmicos mostraram, de fato, alterações nesses dois processos, sendo que o mapa gênico se encontra centrado sobre quatro genes principais: *Ppargc1a*, *Ppard*, *Nr1d1* e *Srebf1*. A via canônica com mais genes com alto *Fold Change* foi a via de sinalização entre células dendríticas e NK, relacionada com inflamação, e apresentou todos os seus genes repressos (*Fasl*, *Klrd1*, *H2-Q10* e

Il2rg). Contudo, também há genes superexpressos relacionados com a inflamação como *Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (Cxcl11)*, receptores de Interleucinas 12 e 1 (*Il12rb* e *Il1rl2*) e *Toll-like 11 (Tlr11)*. Sabe-se que tanto animais com DM1 quanto DM2 apresentam altos níveis de inflamação (Ebstein, 1976). Em DM1, a desregulação na expressão do receptor *Toll-like* e, consequentemente sua sinalização alterada, afeta também as vias de citocinas e interleucinas no sangue periférico, as quais podem estar envolvidas com o início do desenvolvimento desta doença e servirem como um marcador para DM (Alkanani et al, 2012).

A segunda via mais ativada foi a do PXR, a qual é comumente acionada predominantemente no intestino e fígado para o metabolismo de xenobióticos por induzir enzimas da família do citocromo P450. Em nossos experimentos, todos os genes dessa via estavam superexpressos, em particular o fator de transcrição PGC-1 α , o qual participa de três segmentos desta e cujo envolvimento no metabolismo de xenobióticos já havia sido descrito, sendo, então, um possível alvo terapêutico para o tratamento de DM (Amentz et al, 2012). A superexpressão de proteínas do citocromo P450 observada em nossos experimentos pode ser a responsável pela superprodução de ROS (Aubert et al, 2011), o qual se encontra em níveis elevados em DM e induz danos ao DNA, como os observados pelo ensaio do Cometa. Além disso, as implicações de altos níveis de *Cyp2b10* e *Cyp2b6* observados não somente na via do PXR como também na via do RXR mediado por LPS/IL-1 são muitas, pois além de contribuir para o aumento de ROS, também são responsáveis pelo aumento na resistência à insulina e na indução da doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose hepática) devido à alta peroxidação de lipídios (Aubert et al, 2011; Bulum et al, 2011). O gene *Srebf1*, responsável pela indução da lipólise na via TR, e o gene *Fabp5*, na via do RXR mediado por LPS-IL-1, responsável pelo transporte de ácidos graxos e lipídios, assim como outros genes apresentados na segunda rede, se encontram repressos (Figura 16). A repressão desses genes e consequentemente seu envolvimento na rede de doenças gastrointestinais e disfunção no sistema hepático, apresenta indicação de que os animais com DM do tipo I se encontram

na fase inicial, senão instalada, de esteatose hepática, como complicação secundária.

Os hepatócitos de animais diabéticos, como esperado, também apresentaram alterações no metabolismo de glicose como as observadas nas vias TR e FXR. Sabe-se que os genes *G6pc* e *G6pc2*, transcrevem proteínas participantes da via de glicogenólise para liberação de glicose em hepatócitos durante jejum ou DM2, através do fator de transcrição PGC-1 α , o qual se encontra superexpresso em DM2 (Im et al, 2011) e em animais com DM1. Como observado em nosso modelo de DM1, todos esses genes apresentam-se ativos e super-regulados, induzindo a gliconeogênese (Figura 19 e 20), assim como outros genes envolvidos no metabolismo da glicose indicados na primeira rede (Figura 15).

Estudos que avaliaram diferença na expressão gênica em hepatócitos poliplóides indicaram ativação e repressão de vias semelhantes às encontradas em nossos estudos, apesar dos genes envolvidos não serem necessariamente os mesmos. Anatskaya e colaboradores (2007) observaram aumento no reparo a danos ao DNA, indução de metabolismo de ácidos graxos e glicose e diminuição na imunidade, apoptose e respiração. De fato, o decréscimo na expressão do gene *FasI*, relacionado com apoptose e imunidade, e outros indicados na via de sinalização entre células dendríticas e NK, podem estar relacionados a fenômenos não somente ocasionados pelo DM1, mas também pelo estado poliplóide dessas células.

Comparativamente, em hepatócitos de animais idosos foram observadas diversas vias alteradas relacionadas ao metabolismo de lipídios. O metabolismo do ácido linoleico e o do ácido araquidônico se relacionam, uma vez que ácido linoleico é usado na biossíntese de ácido araquidônico e isso se confirma, pois todos os genes diferencialmente expressos na via do primeiro, também estão presentes na via do segundo (*Cyp2b10*, *Cyp2c40*, *Cyp2d9* e *Pla2g1b*). Sabe-se que o ácido linoleico conjugado, apesar de apresentar um efeito anti-obesidade, pode causar esteatose hepática, porém, a administração de ácido araquidônico poderia reverter o quadro desta doença (Oikawa et al, 2009). Apesar do perfil

genômico de camundongos idosos apresentar uma rede de genes envolvidos com doenças gastrointestinais, disfunção e esteatose hepática (Figura 24), os genes com expressão diferencial se encontravam na periferia da rede e apresentavam relações indiretas com os outros genes envolvidos. *Nupr1* e *Gadd45a*, por exemplo, estão superexpressos e são envolvidos com tumorigênese hepática e estresse do retículo endoplasmático, relacionando-se ainda com o complexo P450, no qual foi observada expressão diferenciada em algumas moléculas (Huang et al, 2011; Ozawa et al, 2011).

Apesar de *Gadd45a* e *Nupr1* estarem superexpressos, foi observada a repressão de diversos genes envolvidos com câncer, como *Wnt3a*, *Cdkn1a*, *Egfr* e *Akt1*. *Cdk1na*, por exemplo, transcreve um inibidor de cinase dependente de ciclina e pode ser repressor de tumor quando presente no núcleo ou oncogene se ativo no citoplasma por regular migração e proliferação (Romanov et al, 2012). *Akt1* é um fator de sobrevivência celular (Matsuyama et al, 2004) e quando ativado permite o crescimento de células hepáticas. Em nossos experimentos, este gene encontrava-se represso nos camundongos idosos indicando que nesses animais está ativado um mecanismo de proteção contra tumores (Wang et al, 2004).

Semelhantemente a diabéticos, camundongos idosos apresentaram diversos genes envolvidos com a resposta inflamatória, sendo que, de todos, *Ppard* e *Cyp2b10* encontraram-se diferencialmente expressos em ambas as situações experimentais. O grande número de genes diferencialmente expressos envolvidos com a inflamação e com o envelhecimento foi visto por outros grupos (Cao et al, 2001) e reafirma a hipótese de que o envelhecimento seja um estado inflamado e possa contribuir com o surgimento de doenças típicas do envelhecimento como Alzheimer e DM2 (Navarrete-Reyes & Montana-Alvarez, 2009).

É interessante observar também em hepatócitos de animais idosos a presença de três genes superexpressos envolvidos principalmente com ritmo circadiano (*Per2*, *Per3* e *Nr1d1*), além de outros que se relacionam com o relógio biológico indiretamente (Anexo IV). Alterações no ritmo circadiano com o

envelhecimento podem ter diversas causas e implicações: foi observado que oscilações nos níveis de NAD^+ , assim como inflamação e aumento na síntese de lipídios, como observado neste estudo, poderiam modificar o relógio biológico (Sahar et al, 2011; Finlay et al, 2012).

5.4. Mecanística epigenética no *diabetes mellitus*

Células HepG2 foram usadas como um modelo para simulação de DM1 para análises de expressão gênica e mecanística epigenética dos genes *Apoe*, *Igfbp1* e *Foxo1*. Esses genes foram selecionados principalmente pela sua relação com a Sirt1 na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios (Lemieux et al, 2005; Li et al, 2008; Li et al, 2011).

A análise da expressão gênica nessas células revelou que em uma situação de hiperglicemia as expressões gênicas de *Apoe*, *Foxo1* e *Igfbp1* são aumentadas, contudo esse aumento se torna reversível 24 horas após retorno ao meio de cultura normoglicêmico. O aumento na expressão desses genes com o aumento da concentração de glicose no meio está intimamente relacionado com a sua função no metabolismo energético celular. *Apoe* é regulado indiretamente pela hiperglicemia, uma vez que é um gene que expressa a Apolipoproteína E, a qual se liga a lipídios formando lipoproteínas, que por sua vez, estão envolvidas com o metabolismo de lipídios alterado no DM (Nelson & Cox, 2004), assim como *Foxo1*, que é um fator de transcrição abundante em tecidos responsivos à insulina, como fígado, tecido adiposo, entre outros (Van der Vos & Coffey, 2008). Em hepatócitos, uma das funções de *Foxo1* é atuar como co-ativador de PGC-1 α no aumento da expressão da glicose-6 fosfatase, a qual é muito abundante no DM e foi observada aqui como superexpressa em camundongos diabéticos pelo ensaio de expressão (Van der Vos & Coffey, 2008). O aumento da expressão de *Igfbp1* pode ser uma consequência do aumento de *Foxo1*, pois há uma estimulação dessa proteína por uma via *Foxo1*-dependente iniciada por Sirt1 (Gan et al, 2005).

As respostas obtidas ao tratamento com a nicotinamida mostraram-se diferentes para cada gene, indicando as diferentes atuações das sirtuínas sobre a transcrição. Foi constatado que as sirtuínas não exercem efeito direto na expressão do gene *Apoe*, pois com a adição de nicotinamida, a expressão gênica nos meios de cultura “com insulina” e “insulina com nicotinamida” permaneceram os mesmos. O gene *Igfbp1*, no entanto, apresentou um padrão de regulação direta por sirtuínas, pois apenas com a adição de nicotinamida em um meio de cultura normoglicêmica, sua expressão foi semelhante à de uma situação com hiperglicemia. O tratamento com nicotinamida, em presença de alta concentração de glicose, elevou também a expressão de *Igfbp1*, indicando que a baixa expressão do gene *Igfbp1* pode estar diretamente regulada por sirtuínas.

Analisando-se a expressão do gene *Foxo1* em células HepG2, poderia ser sugerido que as sirtuínas nucleares em um meio normoglicêmico, tivessem um papel modulador sobre esse gene, pois manteriam tal expressão ligeiramente elevada. Contudo, sua ação é anulada em uma situação de hiperglicemia, não havendo alteração na expressão de *Foxo1* com a adição da droga em meio hiperglicêmico.

Quanto aos marcadores epigenéticos, estes não mostraram o mesmo perfil apresentado pela análise da expressão gênica. Em todos os casos houve uma perda progressiva das marcações H3K9Ac e H3K9me2 nos tratamentos com alta concentração de glicose e com o retorno do cultivo a um meio normoglicêmico. O resíduo de lisina 9 da histona H3 é alvo não somente de deacetilases NAD⁺-dependentes, como de deacetilases clássicas (HDAC1), metil-transferase (SUV39H1) e demetilases (JHDM2A) (Yamame et al, 2006; Vaquero et al, 2007; Willis-Martinez et al, 2009). Sua acetilação tem sido diretamente relacionada com ativação transcricional, assim como dimetilação levaria ao silenciamento gênico e a trimetilação seria marca de heterocromatina (Kurdistani et al, 2004; Kawakami et al, 2009). A perda progressiva de marcações H3K9me2 e H3K9me3 e acréscimo da marcação H3K4me em uma situação de hiperglicemia transiente também foi relatada no promotor do gene NF-κB em células endoteliais devido ao

recrutamento de enzimas LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*) (Villeneuve et al, 2008; Cooper & El-Osta, 2010). A assinatura epigenética em marcações de acetilação também foi observada em células retino-endoteliais em ratos hiperglicêmicos (Zhong & Kowluru, 2011). Nelas, a hiperglicemia prejudicou o funcionamento de HATs (histonas acetil transferases) o que provocou um decréscimo de H3Ac e essa alteração permaneceu mesmo com o retorno a condições normoglicêmicas (Zhong & Kowluru, 2011). Essa persistência epigenética constituiria o que é chamado de memória hiperglicêmica. Estudos em humanos indicam que a exposição a altas concentrações de glicose pode causar alterações no epigenoma que podem persistir por longos períodos mesmo após tratamento (Costa & El-Osta, 2010).

O tratamento com nicotinamida induziu alterações no comportamento epigenético diferenciado para cada gene. Associado ao promotor do gene *Apoe*, observou-se aumento nas marcações H3K9Ac e H3K9me2 com o tratamento por nicotinamida, mas isso não se refletiu em alteração na expressão deste gene. Em relação às modificações epigenéticas quando do cultivo em meio de cultura hiperglicêmico contendo nicotinamida, observamos que H3K9Ac associada ao promotor de *Apoe* encontrava-se aumentada, assim como a expressão gênica, indicando que apesar de as sirtuínas não exercerem um papel direto na expressão desse gene, ainda assim regulam discretamente os seus níveis de acetilação.

A idéia de que as sirtuínas possam não estar ativas em um meio hiperglicêmico é corroborada na análise por ChIP dos marcadores epigenéticos associados aos promotores dos genes *Igfbp1* e *Foxo1*. No que se refere a esses genes, o tratamento com meio de cultura hiperglicêmico contendo nicotinamida não alterou os níveis de H3K9Ac e H3K9me2. Contudo, o tratamento com meio de cultura normoglicêmico contendo nicotinamida mostrou alterações. Pudemos relacionar a diminuição da expressão gênica de *Foxo1* com o aumento de H3K9me2 no seu promotor e, em *Igfbp1*, o acréscimo na expressão poderia estar relacionado com o aumento de H3K9Ac no seu promotor.

Além disso, a expressão gênica aumentada de *Igfbp1* somada à maior abundância de marcações epigenéticas após tratamento com nicotinamida em meio normoglicêmico excluiria a hipótese de que as marcações epigenéticas apenas diminuíssem devido à menor concentração de histonas nos promotores de genes ativos (Barski et al, 2007).

Quando observadas as marcações epigenéticas para os mesmos genes analisados em HepG2 em hepatócitos de camundongos diabéticos, não se constatou o mesmo padrão de perda progressiva de H3K9Ac e H3K9me2 nos promotores desse gene, como era esperado. Pelo contrário, observou-se um aumento de H3K9Ac apenas no promotor do gene *Foxo1*, no entanto, outros grupos de pesquisa conseguiram com sucesso mostrar perda de H3K9me2 e H3K9me3 no promotor do gene p65 em animais diabéticos (Brasacchio et al, 2009). Uma vez que este experimento foi realizado em triplicata biológica, é plausível considerar que mais repetições sejam necessárias para identificar algum efeito significativo sobre a marcação H3K9me2, pois nos animais NOD usados, o desenvolvimento da doença não ocorre exatamente no mesmo período, indicando certa variabilidade entre animais da mesma linhagem. No entanto é possível observar uma tendência ao decréscimo dessa marcação nos genes aqui estudados. Não há, contudo, relatos referentes à marca de ativação H3K9Ac, mas uma vez que foi observado um aumento generalizado dessa marcação em animais diabéticos nesta investigação, seria esperado que em algum dos genes estudados houvesse aumento dessa marcação nos promotores.

Em idosos, por outro lado, foi observada diminuição de marcação epigenética para os genes *Foxo1* e *Igfbp1* e de fato existem relatos de uma diminuição global da metilação de histonas H3 e H4 nessas condições (Gonzalo, 2010). Contudo é importante salientar que a redução de marcadores epigenéticos em regiões específicas não exclui o aumento dos mesmos marcadores de forma global, como no caso da H3K9Ac e metilação de DNA. Foi observado neste estudo que há um aumento de H3K9Ac em hepatócitos, porém diminuição nos genes *Foxo1* e *Igfbp1* particularmente, em oposição à metilação de DNA, quando

há diminuição na metilação global e no aumento de metilação em *loci* específicos (Gonzalo, 2010), como os do rDNA 18S e, também observados em nossos experimentos.

5.5. Fenótipo Nuclear de células HepG2

Como esperado para hepatócitos humanos as células HepG2 apresentaram baixos níveis de poliploidia. A maioria dos núcleos apresentam valores Feulgen-DNA correspondentes à classe ~2C (Celton-Morizur et al, 2010). Devido à sua característica tumoral, essas células apresentam hiperdiploidia, sendo que ~2C corresponde à presença de 50 a 60 cromossomos (Chen et al, 1993). Apesar dos valores Feulgen-DNA da amostragem populacional de células HepG2 cultivadas em meio hiperglicêmico não diferirem daqueles observados nas células cultivadas em meio normoglicêmico, foi possível se observar que no interior da classe ~2C houve um deslocamento da frequência de núcleos para valores inferiores. A “perda” de DNA observada nessas células poderia ser consequente a uma leve descompactação da cromatina permitindo maior solubilização do ácido apurínico durante a hidrólise ácida da reação de Feulgen, o que levaria a um decréscimo nas absorbâncias e consequentemente em valores Feulgen-DNA para este material. No grupo de células que retornou à normoglicemia, após tratamento hiperglicêmico, foi observado aumento na frequência de células na classe ~4C, o que poderia ser um indício de divisão celular (fases S e G2). Isto porque as células desse grupo foram coletadas após 72 h de cultivo, ao invés de 48 h, como no grupo “Insulina” e “Glicose”. No entanto, a ocorrência de divisão celular não aconteceria em sincronia à taxa normal de proliferação e sim como consequência da mudança nos meios de cultivo, porque as células HepG2 apresentam um tempo de duplicação de 20 h a 29 h (Nyberg et al, 1994; Huang et al, 1999; HPA Culture Collections, 2012), e o tempo de 72 h se situaria em um período pós-ciclo de divisão. O indício de duplicação no conteúdo de DNA, então, poderia ser uma resposta proliferativa ao estresse ocasionado pelo retorno ao meio normoglicêmico. Isso ainda é evidenciado pela ausência de células com classes de ploidia >~4C neste grupo.

Tal acontecimento pode ser uma forma através da qual as células se protegem dos danos causados pela hiperglicemia, pois o cultivo de células HepG2 em altos níveis de glicose não apenas eleva os níveis de ROS como também a peroxidação de lipídios (Chandrasekaran et al, 2010). Enquanto células não-tumorais apresentam diminuição da proliferação celular e aumento de apoptose sob essa condição experimental (Varma et al, 2005; Davidson & Yellon, 2006), células pancreáticas cancerígenas apresentam proliferação celular aumentada com a hiperglicemia (Han et al, 2011). Uma vez que as células HepG2 são reestabelecidas em um meio de cultura normoglicêmico favorável, isso poderia ser, então, um estimulador da proliferação celular.

De fato, a hiperglicemia provocou um leve aumento no tamanho nuclear, uma vez que células cultivadas em meio hiperglicêmico tanto na ausência quanto na presença de nicotinamida apresentaram alguns núcleos com área nuclear maior do que o esperado em relação ao seus respectivos valores Feulgen-DNA, resultando em uma maior inclinação da linha de regressão obtida de áreas nucleares *versus* conteúdo de DNA. Achado semelhante já foi relacionado com senescência prematura em fibroblastos humanos (Kobayashi et al, 2008). Em cardiomiócitos *knockout* para Sirt3, foi observado também entumescimento mitocondrial associado ao envelhecimento precoce (Nogueiras et al, 2012). O “inchaço” celular é a primeira manifestação de injúria à célula e apresenta, como características, aumento do volume do retículo endoplasmático, de mitocôndrias, aumento da formação de áreas heterocromáticas, entre outros (Kumar et al, 2012). Os agentes dessas injúrias podem variar desde hipóxia, agentes químicos, reação imunológica, defeitos genéticos, desequilíbrio nutricional e envelhecimento (Kumar et al, 2012), muitos dos quais podem ser relacionados com o tipo de estresse submetidos aqui pela simulação de uma condição de DM1.

Os resultados obtidos com o tratamento por nicotinamida indicam que as sirtuínas influenciam o fenótipo nuclear das células HepG2 cultivadas tanto em condições de normoglicemia como de hiperglicemia. Os fenótipos nucleares nesses casos indicaram um aumento do contraste entre cromatina condensada e

não-condensada, especialmente para núcleos com maiores classes de ploidia, os quais também apresentaram menor porcentagem de área coberta com cromatina condensada. Como as sirtuínas são deacetilases de histonas, uma vez havendo inibição dessas proteínas é de se esperar uma descondensação cromatínica (Kouzarides, 2007). Contudo, essa descondensação mostrou-se mais pronunciada apenas para núcleos com classes de ploidia maiores do que $\sim 2C$, indicando que as sirtuínas estariam atuando de forma seletiva predominante em núcleos com conteúdo de DNA duplicado. Foi observado que o tratamento com nicotinamida em megacariócitos estimula o aumento de ploidia nessas células, por inibir Sirt1 e/ou Sirt2 (Giammona et al, 2009), sendo que Sirt2 é uma sirtuína citoplasmática que está envolvida no atraso da proliferação celular ao inibir a condensação cromatínica (Inoue et al, 2007). Isso corrobora nossos dados, uma vez que no gráfico de dispersão de Vidal foi possível observar um deslocamento de AAR para valores $\geq 2,0$ em células $>\sim 2C$ ao mesmo tempo em que as áreas ocupadas por cromatina condensada se tornaram levemente menores principalmente para células com classe de ploidia $\leq \sim 2C$.

6. Conclusões Gerais

Levando em consideração os resultados obtidos assim como dados da literatura é possível concluir que:

- 1-Tanto em camundongos NOD com hiperglicemia severa quanto em camundongos BALB/c normoglicêmicos idosos ocorre aumento na ploidia e remodelação cromatínica em hepatócitos. Contudo, o aumento na ploidia é mais pronunciado em animais diabéticos e a remodelação cromatínica difere nas duas situações experimentais.
- 2- Em hepatócitos de animais com hiperglicemia severa ocorre aumento na abundância de Sirt1 e Sirt6, mesmo sem disponibilidade do seu cofator, enquanto em hepatócitos de camundongos normoglicêmicos idosos há redução na abundância de Sirt1, Sirt6 e Sirt7, indicativa de redução generalizada no metabolismo desses animais.
- 3- Em hepatócitos de camundongos com hiperglicemia severa o aumento na abundância de Sirt1, mas não sua atividade, resulta em uma seleção de alvos. O aumento da abundância e atividade de PGC1- α , possivelmente por Sirt1, induz a transcrição de genes envolvidos com a gliconeogênese e o aumento da abundância de H3K9Ac pode estar envolvido com uma regulação epigenética diferencial em genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos. Em hepatócitos de animais normoglicêmicos idosos, a pouca abundância e a baixa atividade de Sirt1, devido ao não-aumento da abundância de NAD⁺, contribuem para a permanência da acetilação em todos os seus alvos histônicos, com exceção de H1K26Ac, o que se reflete no estado descompactado da cromatina desses animais.
- 4- Em hepatócitos de animais com hiperglicemia severa, porém não de animais normoglicêmicos idosos, o aumento na taxa de danos ao DNA, provavelmente

por aumento de ROS, pode ter contribuído para com o aumento na abundância de Sirt6.

- 5- Em hepatócitos de animais com hiperglicemia severa, a baixa razão área AgNOR+/área nuclear se dá por um aumento no valor da área nuclear enquanto em animais normoglicêmicos idosos é devida à combinação de aumento na área nuclear e diminuição na área AgNOR+, sendo esta última associada a um aumento de metilação no rDNA.
- 6- Tanto em hepatócitos de animais diabéticos quanto de normoglicêmicos idosos há diversos genes diferencialmente expressos envolvidos em processos inflamatórios, sendo que no primeiro caso provavelmente ocorram devido à natureza autoimune da doença, enquanto no segundo caso sejam um indício de inflamação comumente associada ao envelhecimento. Somado a isso, em animais diabéticos os genes diferencialmente expressos envolvidos no metabolismo de lipídios provavelmente aumentem a peroxidação lipídica, produzindo ROS, e induzam a esteatose hepática, contribuindo com complicações secundárias da doença.
- 7- Células HepG2 cultivadas em meio hiperglicêmico apresentam indícios de estresse celular como um ligeiro intumescimento nuclear, revertido quando do retorno das células à normoglicemia, após o que as células passam a apresentar aumento em valores Feulgen-DNA interpretados como resultantes de proliferação celular em resposta ao estresse. O tratamento com nicotinamida, tanto em meio normoglicêmico quanto em meio hiperglicêmico, induz um aumento na frequência de células com maiores graus de ploidia, semelhantemente ao que acontece com as células retornadas ao cultivo em meio normoglicêmico. O maior contraste entre cromatina condensada e não condensada nas células com maiores valores Feulgen-DNA então verificado indica a atuação das sirtuínas na remodelação cromatínica e na progressão do ciclo celular das células HepG2.

8- Embora em células HepG2 a hiperglicemia provoque alterações na expressão de genes estratégicos, como *Apoe*, *Foxo1* e *Igfbp1*, essas alterações são reversíveis. A progressiva diminuição na abundância de marcadores epigenéticos em meio hiperglicêmico leva à suposição de que um mecanismo de memória epigenética possa estar ativo, um fenômeno que não foi observado em modelo animal. As sirtuínas neste contexto mostram exercer um papel tanto na expressão gênica quanto na marcação epigenética; no entanto, em meio hiperglicêmico essas proteínas aparentam estarem inativas, semelhantemente ao observado em modelo animal.

7. Referências Bibliográficas

- Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Walter, P. DNA, chromosomes and genomes. In: Alberts et al., Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York, 2008, pp. 195-262.
- Alkanani, AK, Rewers, M, Dong, F, Waugh, K, Gottlieb, PA, Zipris, D. Dysregulated Toll-like receptor-induced interleukin-1 β and interleukin-6 responses in subjects at risk for the development of type 1 diabetes. (2012) *Diabetes*, *in press*.
- Allis, CD, Jenuwein, T, Reinberg, D. Overview and concepts. In: Allis et al., Epigenetics. Cold Spring Harbor, New York, 2007, pp. 23-62.
- Amentz, Z, Masoodi, M, Griffin, JL. Applications of metabolomics for understanding the action of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in diabetes, obesity and cancer. (2012) *Genome Med* 32 *in press*
- Anatskaya, OV, Vinogradov, AE. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. (2007) *Genomics* 89: 70-80.
- Anatskaya, OV, Vinogradov, AE. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. (2010) *Funct Integr Genomics* 10: 433-446.
- Arduino, F. Etiopatogenia do diabetes mellitus. In: Arduino, F. Diabetes Mellitus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1980 a, pp. 45-59.
- Arduino, F. Classificação e epidemiologia do diabetes. In: Arduino, F. Diabetes Mellitus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1980 b, pp. 60 - 67.
- Arduino, F. O diabetes ontem e hoje. In: Arduino, F. Diabetes Mellitus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1980 c, pp. 1-3.
- Aubert, J, Begrich, K, Knockaert, L, Robin, MA, Fromenty, B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. (2011) *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35: 630-637.
- Bakel, H. Interactions of transcription factors with chromatin. (2011) *Subcell Biochem* 52: 223-259.

- Barski, A, Cuddapah, S, Cui, K, Roh, TY, Schones, DE, Wang, Z, Wei, G, Chepelev, I, Zhao, K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. (2007) *Cell* 129: 823-837.
- Benarafa, C, Lecuyer, TE, Baumann, M, Stolley, JM, Cremona, TP, Remold-O'Donnell, E. SperpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow. (2001) *J Leukoc Biol* 90: 21-29.
- Bengoechea-Alonso, MT, Punga, T, Ericsson, J. Hyperphosphorylation regulates the activity of SBREBP1 during mitosis. (2005) *PNAS* 102: 11681-11686.
- Berg, AH, Scherer, PE. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. (2005) *Circ. Res.* 96: 939-949.
- Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer, L. The integration of metabolism. In: Berg et al., *Biochemistry*. WH Freeman, New York, 5th ed, 2004 pp. 867-890.
- Bitterman, KJ, Andreson, RM, Cohen, HY, Latorre-Esteves, M, Sinclair, DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. (2002) *J Biol Chem* 277: 45099-45107.
- Black JC, Whetstone, JR. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. (2011) *Epigenetics* 6: 9-15.
- Blobel, P, Potter, VR. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. (1966) *Science* 154: 1662 – 1665.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) *Anal Biochem* 7: 248-254.
- Braidy, N, Guillemin, GJ, Mansour, H, Chan-Ling, T, Poljak, A, Grant, R. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and sirt1 activity in wistar rats. (2011) *Plos One* 6: e19194
- Brasacchio, D, Okabe, J, Tikellis, C, Balcerzyk, A, George, P, Baker, EK, Calkin, AC, Brownlee, M, Cooper, ME, El-Osta, A. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. (2009) *Diabetes* 58: 1229-1236.
- Brown, CR, Kennedy, CJ, Delmar, VA, Forbes, DJ, Silver, PA. Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. (2008) *Genes Dev* 22: 627-639.

- Bulum, T, Kolaric, B, Duvnjak, L, Duvnjak, M. Nonalcoholic fatty liver disease markers are associated with insulin resistance in type 1 diabetes. (2011) *Diag Dis Sci* 56: 3655-3663.
- Canto, C, Auwerx, J. PGC-1 α , Sirt1 and AMPK, na energy sensing network that controls energy expenditure. (2009) *Curr Opin Lipidol* 20: 98-105.
- Cao, SX, Dhahbi, JM, Mote, PL, Spindler, SR. Genomic profiling of short-and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. (2001) *PNAS* 98: 10630-10635.
- Celton-Morizur, S, Merlen, G, Couton, D, Desdouets, C. Polyploidy and liver proliferation. (2010) *Cell Cycle* 9: 460-466.
- Chakalova, L, Fraser, P. Organization of Transcription. (2010) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000729.
- Chandrasekaram, K, Swaminathan, K, Chatterjee, S, Dey, A. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. (2010) *Toxicol in Vitro* 24: 387-396.
- Chen, H, Chiu, T, Chen, P, Chen, D. Cytogenetic studies on human liver cancer cell lines. (1993) *Cancer Genet Cytogenet* 65: 161-166.
- Cohen, HY, Miller, C, Bitterman, KJ, Wall, NR, Hekking, B, Kessler, B, Howitz, KT, Gorospe, M, Cabo, R, Sinclair, DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. (2004) *Science* 305: 390-392.
- Cooper, ME, El-Osta, A. Epigenetics: mechanisms and implication for diabetic complications. (2010) *Circ Res* 107: 1403-1413.
- Cosseau, C, Grunau, C. Native chromatin immunoprecipitation. In: Tollefsbol, TO. *Epigenetics Protocols*. Springer Science, Berlin 2011, p. 195-212.
- Crawford, GE, Holt, IE, Whittle, J, Webb, BD, Tai, D, Davis, S, Margulies EH, Chen Y; Bernat, JA; Ginsburg, D; et al. Genome-wide mapping of DNase hypersensitive sites using massively parallel signature sequencing (MPSS). (2006) *Genome Res* 16: 123-131.
- Cremer, T, Cremer C. Chromosome territories nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. (2001) *Nature Rev* 2: 292-301.
- Davidson, SM, Yellon DM. Does hyperglycemia reduce proliferation or increase apoptosis? (2006) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1486-H1487.
- Domenis, R, Bisetto, E, Rossi, D, Comelli, M, Mavelli, I. Glucose-modulated mitochondria adaptation in tumor cells: a focus on ATP synthase and inhibition factor 1. (2012) *Int J Mol Sci* 13: 1933-1950.

- Dominy Jr., JE, Lee, Y, Gerhart-Hines, Z, Puigserver, P. Nutrient-dependent regulation of PGC-1 α 's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. (2010) *Biochim Biophys Acta* 1804:1676-1683.
- Ebstein, W. Zur Therapie des Diabetes mellitus, insbesondere euber die Anwendung des salicy-sauren Natorns bei demselben (=on the treatment of diabetes mellitus, esp. on the use of salicylic-acid sodium). (1876) *Klinische Wochenschrift* 13: 337-340.
- Elgin, SC, Grewal, SI. Heterochromatin: silence is golden. (2003) *Curr Biol* 13: R895-R898.
- Etchegaray, JP, Yang, X, DeBruyne, JP, Peters, AH, Weaver, DR, Jenuwein, T, Reppert, SM. The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. (2006) *J Biol Chem* 281: 21209-21215.
- Felisbino, MB, Tamashiro, WMSC, Mello, MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-trated HeLa cells. (2011) *Plos One* 6: e29144.
- Finlay, LA, Michels, AJ, Butler, JA, Smith, EL, Monette, JS, Moreau, RF, Petersen, SK, Frei, B, Hagen, TM. R- α -lipoic acid does not reverse hepatic inflammation of aging but lowers lipid anabolism, while accentuating circadian rhythm transcript profiles. (2012) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R587-597.
- Ford, E, Voit, R, Liszt, G, Magin, C, Grummt, I, Guarente, L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. (2006) *Genes Dev* 20: 1075-1080.
- Fraga, MF, Ballestar, E, Villar-Garea, A, Boix-Chornet, M, Espada, J, Schotta, G, Bonaldi, T, Haydon, C, Ropero, S, Petrie, K, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. (2005) *Nature Genet* 37: 391-400.
- Gan, L; Han, Y; Bastianetto, S; Dumont, Y; Unterman, TG; Quirion, R. Foxo-dependent and -independent mechanisms mediate Sirt1 effects on Igfbp-1 gene expression. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1092-1096.
- Gatta, R, Mantovani, R. Single nucleosome CHIPs identify an extensive switch of acetyl marks on cell cycle promoters. (2010) *Cell Cycle* 9: 2143-2159.
- Gendric, G, Celton-Morizur, S, Desdouets, C. Polyploidy and liver proliferation. (2012) *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36: 29-34.

- Ghiraldini, FG, Mello, MLS. Micronucleus formation, proliferative status, cell death and DNA damage in ethosuximide-treated human lymphocytes. (2010) *Cell Biol Int Rep* 17: e00006.
- Ghiraldini, FG, Silva, IS, Mello, MLS. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice. (2012) *Cytometry Part A* 81: 755-764.
- Ghosh, S, George, S, Roy, U, Ramachandran, D, Kolthur-Seetharam, U. NAD: a master regulator of transcription. (2010) *Biochim Biophys Acta* 1799: 681-693.
- Giammona, LM, Panuganti, S, Kemper, JM, Apostolidis, PA, Lindsey, S, Papoutsakis, ET, Miller, WM. Mechanistic studies on the effects of nicotinamide on megakaryocytic polyploidization and the roles of NAD⁺ levels and SIRT inhibition. (2009) *Exp Hematol* 37: 1340-1352.
- Gilbert, N, Boyle, S, Fiegler, H, Woodfine, K, Carter, NP, Bickmore, WA. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. (2004) *Cell* 118: 555-566.
- Gonzalo, S. Epigenetic alterations in aging. (2010) *J Appl Physiol* 109: 586-597.
- Görisch, SM, Waschsmuth, M, Tóth, KF, Rippe, K. Histone acetylation increases chromatin accessibility. (2005) *J Cell Sci* 118: 5825-5834.
- Gorla, GR, Malhi, H, Gupta, S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. (2001) *J Cell Sci* 114: 2943-2951.
- Gray, SG, Meyts, P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. (2005) *Diabetes Metab Res Rev* 21: 416-433.
- Grob, A, Roussel, P, Wright, JE, McStay, B, Hernandez-Verdun, D, Sirri, V. Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. (2009) *J Cell Sci* 122: 489-498.
- Guarente, L. The logic linking protein acetylation and metabolism. (2011) *Cell Metab* 14: 151-153.
- Han, C, Demetris, AJ, Michalopoulos, GK, Zhan, Q, Shelhamer, JH, Lu T. PPAR γ ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21^{WAF1/CIP1} pathway. (2003) *Hepatology* 38: 167-177.
- Han, L, Ma, Q, Li, J, Liu, H, Li, W, Ma, G, Xu, Q, Zhou, S, Wu, E. High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression. And transactivation of EGFR. (2011) *Plos One* 6: e27074.

- Heiden, MGV, Cantley, LC, Thompson, CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. (2009) *Science* 324: 1029-1033.
- Heitz, E. Das Heterochromatin der Moose. (1928) *I Jahrb Wiss Botanik* 69: 762-818.
- Heitz, E. Ueber α - und β -Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei *Drosophila*. (1934) *Biol Zbl* 54: 588 – 609.
- Herbert, V, Lau, KS, Gottlieb, CW, Bleicher SJ. Coated charcoal immunoassay of insulin. (1965) 25: 1375-1384.
- HPA Culture Collections, (2012) www.hpacultures.org.uk
- Huang, RS, Ho, Y, Lin, H, Wei, S, Liu, T. Folate deficiency induces a cell-cycle specific apoptosis in HepG2 cells. (1999) *J Nutr* 129: 25-31.
- Huang, J, Viswakarma, N, Yu, S, Jia, Y, Bai, L, Vluggens, A, Cherkaoui-malki, M, Khan, M, Singh, I, Yang, G, et al. Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. (2011) *Am J Pathol* 179: 703-713.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010) www.ibge.gov.br
- Iborra, FJ, Pombo, A, Jackson, DA, Cook, PR. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription ‘factories’ in human nuclei. (1996) *Journal Cell Sci* 109: 1427-1436.
- Im, SS, Kim, MY, Kwon, SK, Kim, TH, Bae, JS, Kim, H, Kim, KS, Oh, GT, Ahn, YH. Peroxisome proliferator-activated receptor $\{\alpha\}$ is responsible for the up-regulation of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression in fasting and db/db mice. (2011) *J Biol Chem* 286: 1157-1164.
- Imai, S. The NAD world: a new systemic regulatory network for metabolism and aging – Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. (2009) *Cell Biochem Biophys* 53: 65-74a.
- Imai, S. From heterochromatin islands to the NAD world: a hierarchical view of aging through the functions of mammalian Sirt1 and systemic NAD biosynthesis. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1790: 997-1004b.
- Inoue, T, Hiratsuka, M, Osaki, M, Yamada, H, Kishimoto, I, Yamaguchi, S, Nakano, S, Katoh, M, Ito, H, Oshimura, M. Sirt2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. (2007) *Oncogene* 26: 945-957.

- Inoue, N, Shimano, H, Nakakuki, M, Matsuzaka, T, Nakagawa, Y, Yamamoto, T, Sato, R, Takahashi, A, Sone, H, Yahagi, et al. Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21^{WAF1/CIP1}, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. (2005) 25: 8938-8947.
- IDF, International Diabetes Federation (2012) <http://www.idf.org>
- Ivy, JM, Klar, AJS, Hicks, JB. Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. (1986) *Mol Cell Biol* 6: 688-702.
- Iyer, VV, Yang, H, Ieraputritou, MG, Roth, CM. Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism. (2010) *Biotechnol Bioeng* 107: 347-356.
- Jaloszynski, P, Kujawski, M, Czub-Swierczek, M, Markowska, J, Szyfter, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. (1997) *Mutat Res* 385: 223-233.
- Jenuwein, T, Allis, CD. Translating the histone code. (2001) *Science* 293: 1074-1080.
- Kaeberlein, M, McVey, M, Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. (1999) *Genes Dev* 13: 2570-2580.
- Kawakami, K., Nakamura, A, Ishigami, A, Goto, S, Takahashi, R. Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. (2009) *Biogerontol* 10: 415-421.
- Kim, HS, Xiao, C, Wang, RH, Lahusen, T, Xu, X, Vassilopoulos, A, Vazquez-Ortiz G, Jeong, WI, Park, O, Ki, SH, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. (2010) *Cell Metab* 12: 224-236.
- Kind, J, Steensel, B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. (2010) *Curr Opin Cell Biol* 22: 320 – 325.
- Kobayashi, Y, Sakemura, R, Kumagai, A, Sumikawa, E, Fujii, M, Ayusawa, D. Nuclear swelling occurs during premature senescence mediated by MAP kinases in normal human fibroblasts. (2008) *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 1122-1125.
- Kosar, M, Bartkova, J, Hubackova, S, Hodny, Z, Lukas, J, Bartek, J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence occur in a cell type- and insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. (2011) *Cell Cycle* 103: 457-468.

- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function (2007) *Cell* 128: 693-705
- Kouzarides, T, Berger, SL. Chromatin modifications and their mechanism of action. In: Allis et al, Epigenetics. Cold Spring Harbor, New York, 2007, pp. 191-210.
- Kurdistani, SK, Tavazoie, S, Grunstein, M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. (2004) *Cell* 117: 721-733.
- Kurien, BT, Scofield, RH. Western blotting. (2006) *Methods* 38: 283-293.
- Kumar, V, Abbas, AK, Fausto, N, Mitchell, R. Cell injury, cell death and adaptations. In: Kumar et al., Robbins basic pathology. (2007) Saunders, Philadelphia, 8th ed, pp. 1-30.
- Lemieux, ME, Yang, X, Jardine, K, He, X, Jacobsen, KX, Staines, WA, Harper, ME, McBurney, MW. The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals. (2005) *Mech Ageing and Dev* 126: 1097-1105.
- Li, F, Devi, YS, Bao, L, Mao, J, Gibori, G. Involvement of Cyclin D3, CDKN1A (p21), and BIRC5 (Survivin) in interleukin 11 stimulation of decidualization in mice. (2008) *Biol Reprod* 78: 127-133.
- Li, J, Wang, Q, Chai, W, Chen, MH, Liu, Z, Shi, W. Hyperglycemia in Apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. (2011) *Cardiovasc Diabetol* 10: 117.
- Li, Y, Xu, W, McBurney, MW, Longo, VD. Sirt1 inhibition reduces IGF-1/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. (2008) *Cell* 8: 38-48.
- Lombard, DB, Scwer, B, Alt, FW, Mostoslavsky, R. SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing. (2008) *J Intern Med* 263: 128-141.
- Lu, P, Prost, S, Caldwell, H, Tugwood, JD, Betton, GR, Harrison, DJ. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. (2007) *Mamm Genome* 18: 617-626.
- Ma, HJ, Nagata, T. Electron microscopic radioautographic studies on DNA synthesis in the hepatocytes of aging mice as observed by image analysis. (1990) *Cell Mol Biol* 36: 73-84.
- Machwe, A, Orren, DK, Bohr, VA. Accelerated methylation of ribosomal RNA genes during the cellular senescence of Werner syndrome fibroblasts. (2000) *Faseb J* 14: 1715-1724.
- Maiese K, Morhan, SD, Chong, ZZ. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. (2007) *Curr Neurovasc Res* 4: 63-71.

- Makino, S, Kunitomo, K, Muraoka, Y, Mizushima, Y, Katagiri, K, Tochino, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. (1980) *Exp Anim* 29: 1-13.
- Malatesta, M, Bertoni-Freddari, C, Fattoretti, P, Caporaloni, C, Fakan, S, Gazzanelli, G. Altered RNA structural constituents in aging and vitamin E deficiency. (2003) *Mech Ageing Dev* 124: 175-181.
- Matsuyama, S, Kitamura, T, Enomoto, N, Fujita, T, Ishigami, A, Handa, S, Maruyama, N, Zheng, D, Ikejima, K, Takei, Y, et al. Senescence marker protein-30 regulates Akt activity and contributes to cell survival in HepG2 cells. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 321: 386-390.
- Matunis, MJ. Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes. (2006) *Methods* 39: 277 – 283.
- McCord, RA, Michishita E, Hong, T, Berber, E, Bozer, LD, Kusumoto, R, Guan, S, Shi, X, Gozani, O, Burlingame, AL, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break point. (2009) *Aging* 1: 109-121.
- Mehta, IS, Figgitt, M, Clements, CS, Kill, IR, Bridger, JM. Alterations to nuclear architecture and genomic behavior in senescent cells. (2007) *Ann NY Acad Sci* 1100: 250-263.
- Mello, MLS, Vidal, BC, Russo, J, Planding, W, Schenck, U. Image analysis of the AgNOR response in *ras*-transformed human breast epithelial cells. (2008) *Acta Histochem* 110: 210-216.
- Mello, MLS, Aldrovani, M, Moraes, AS, Guaraldo, AMA, Vidal, BC. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. (2009) *Micron* 40: 577-585.
- Milech, A. Fisiopatologia do diabetes. In: Arduino, F. Diabetes Mellitus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1980, p. 68-77.
- Moraes, AS, Guaraldo, AMA, Mello, MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. (2007) *Cytometry Part A* 71: 28-37.
- Moraes, AS, Mondin, M, Beletti, ME, Aguiar-Perecin, MLR, Guaraldo, AMA, Mello, MLS. Age-related association of rDNA and telomeres with the nuclear matrix in mouse hepatocytes. (2010) *Cell Biol Int* 34: 925-931.
- Mostoslavsky, R, Chua, KF, Lombard, DB, Pang, WW, Fischer, MR, Gello, L, Liu, P, Mostoslavsky, G, Franco, S, Murphy, MM, et al. Genomic instability and

- aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. (2006) *Cell* 124: 315-329.
- Murayama, A, Ohmori, K, Fujimura, A, Minami, H, Yasuzawa-Tanaka, K, Kuroda, T, Oie, S, Daitoku, H, Okuwaki, M, Nagata, K, et al. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. (2008) *Cell* 133: 627-639.
- Nakagawa, T, Guarente, L. Sirtuins at a glance. (2011) *J Cell Sci* 124: 833-838.
- Nakamura, A, Kawakami, K, Kametani, F, Nakamoto, H, Goto, S. Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction. (2010) *Ann NY Acad Sci* 1197: 33-39.
- Navarrete-Reyes, AP, Montana-Alvarez, M. Inflammaging. Aging inflammatory origin. (2009) *Rev Invest Clin* 61: 327-336.
- NIH, National Institutes of Health. (2012) <http://www.nih.gov>.
- Nelson, DL, Cox, MM. Biological membranes and transport. In: Nelson & Cox, Leningher principles of biochemistry. WH Freeman, New York, 4th ed. 2004, pp. 369-420.
- Nogueiras, R, Habegger, KM, Chaudhary, N, Finan, B, Banks, AS, Dietrich, MO, Horvath, TL, Sinclair, DA, Pfluger, PT, Tschop, MH. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. (2012) *Physiol Rev* 92: 1479-1514.
- Nyberg, SL, Remmel, RP, Mann, HJ, Peshwa, MV, Hu, WS, Cerra, FB. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. (1994) *Ann Surg* 220: 59-67.
- Oberdoerffer, P, Michan, S, McVay, M, Mostoslavsky, R, Vann, J, Park, S, Hartlerode, A, Stegmuller, J, Hafner, A, Loerch, P, et al. Sirt1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. (2008) *Cell* 135: 907-918.
- Oikawa, D, Tsuyama, S, Akimoto, Y, Mizobe, Y, Furuse, M. Arachidonic acid prevents fatty liver induced by conjugated linoleic acid in mice. (2009) *Br J Nutr* 101: 1558-1563.
- Ozawa, S, Gamou, T, Habano, W, Inoue, K, Yoshida, M, Nishikawa, A, Nemoto, K, Degawa, M. Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. (2011) *J Toxicol* 36: 613-623.

- Pang, J, Gong, H, Xi, C, Fan, W, Dai, Y, Zhang, TM. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is involved in glucose toxicity through Sirt1 modulation in HepG2 hepatocytes. (2011) *J Cell Biochem* 112:299-306.
- Park, GH, Buetow, DE. RNA synthesis by hepatocytes isolated from adult and senescent Wistar rat liver. (1990) *Gerontology* 36: 76-83.
- Pivovarov, O, Gogenbakan, O, Pfeiffer, AF, Rudovich, N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. (2009) *Diabetologia* 52: 1656-1654.
- Pfluger, PT, Herranz, D, Velasco-Miguel, S, Serrano, M, Tschop, MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. (2008) *PNAS* 105: 9793-9798.
- Rodgers, JT, Lerin, C, Gerhart-Hines, Z, Puigserver, P. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. (2008) *FESB Lett* 582: 46-53
- Romanov, VS, Pospelov, VA, Poselova, TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. (2012) *Biochemistry* 77: 575-84.
- Roth, CM, Kohen, RL, Walton, SP, Yarmush, ML. Coupling of inflammatory cytokine signaling pathways probed by measurements of extracellular acidification rates. (2001) *Biophys Chem* 31: 1-12.
- Ruijter, AJ, Van Gennip, AH, Caron, HN, Kemp, S, Van Kuilenburgh, AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. (2003) *Biochem J* 370: 737-749.
- Sahar, S, Nin, V, Barbosa, MT, Chini, EN, Sassone-Corsi, P. Altered behavioral and metabolic circadian rhythms in mice with disrupted NAD⁺ oscillation. (2011) *Aging* 3: 794-802.
- Salminen, A, Kaarniranta, K. Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF- κ B signaling. (2010) *Cell Signaling* 22: 573-577.
- Samamez, CH, Caron, S, Briand, O, Dehondt, H, Duplan, I, Kuipers, F, Heinuyer, N, Clavey, V, Staels, B. The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. (2012) *Arch Physiol Biochem* 118: 102-111.
- Sarg, B, Koutzumani, E, Helliger, W, Rundquist, IN, Lindner, HH. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. (2002) *J Biol Chem* 277: 39195-39201.

- Sauve, AA, Wolberger, C, Schramm, VL, Boeke, JD. The biochemistry of sirtuins. (2006) *Annu Rev Biochem* 75: 435-465.
- Scharf, AN, Imhof, A. Every methyl counts – epigenetic calculus. (2011) *FESB Lett* 585: 2001-2007.
- Schwer, B, Verdin, E. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. (2008) *Cell Metab* 7: 104-112.
- Sedivy, JM, Banumathy, G, Adams, PD. Aging by epigenetics – a consequence of chromatin damage? (2008) *Exp Cell Res* 10: 1909-1917.
- Shin, DM, Kucia, M, Ratajczak, MZ. Nuclear and chromatin reorganization during cell senescence and aging – a mini-review. (2010) *Gerontology* 57: 76-84.
- Shogren-Knaak, M, Ishii, H, Sun, JM, Pazin, MJ, Davie, JR, Peterson, CL. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. (2006) *Science* 311: 844-847.
- Siegmund, T, Donner, H, Braun, J, Usadel, KH, Badenhop, K. HLA-DMA and HLA-DMB alleles in German patients with type 1 diabetes mellitus. (1999) *Tissue Antigens* 54: 291-294.
- Signore, A, Pozzilli, P, Gale, EA, Andreani, D, Beverley, PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. (1989) *Diabetologia* 32: 282-289.
- Solomon, MJ, Varshavsky, A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. (1985) *PNAS* 82: 6470-6474.
- Spindler, SR, Dhahbi, JM, Mote, PL. Protein turnover, energy metabolism, aging, and caloric restriction. (2003) *Adv. Cell Aging Gereont* 14: 69-85.
- Strome, S, Kelly, WG. Epigenetic regulation of the X chromosomes in *C. elegans*. In: Allist et al., Epigenetics. Cold Spring Harbor, New York, 2007, pp. 291 – 306.
- Suchankova, G, Nelson, LE, Gerhart-Hines, Z, Kelly, M, Gauthier, MS, Saha, AK, Ido, Y, Puigserver, P, Ruderman, NB. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. (2009) *Biochem Biophys Res Commun* 378: 836-841.
- Surjana, D, Halliday, GM, Damian, DL. Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis and DNA repair. (2010) *J Nucleic Acids* 25: pii: 157591.

- Swisshelm, K, Disteché, CM, Thorvaldsen, J, Nelson, A, Salk, D. Age-related increase in methylation of ribosomal genes and inactivation of chromosome-specific rRNA gene clusters in mouse. (1990) *Mutat Res* 237: 131-146.
- Tennen, RI, Berber, E, Chua, KF. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. (2010) *Mech Ageing Dev* 131: 185-192.
- Tennen, RI, Chua, KF. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. (2011) *Trends Biochem Sci* 36: 39- 46.
- The Jacksons Laboratory, (2010) <http://www.jax.org/index.html>.
- US Census Bureau, (2010) www.census.gov
- Vakhrusheva, O, Braeuer, D, Liu, Z, Braun, T, Bober, E. SIRT7-dependent inhibition of cell growth and proliferation might be instrumental to mediate tissue integrity during aging. (2008) *J Phys Pharm* 59: 201-212.
- Van der Vos, KE, Coffey, PJ. Foxo-binding partners: it takes two to tango. (2008) *Oncogene* 27: 2289-2299.
- Van Gool, F, Galli, M, Gueyda, C, Kruys V, Prevot, PP, Bedalov, A, Mostoslavsky, R, Alt, FW, Smedt, T, Leo, O. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. (2009) *Nat Med* 15: 206-210.
- Vaquerizas, JM, Akhtar, A, Luscombe, NM. Large-scale nuclear architecture and transcriptional control. In: Hughes, TR. A handbook of transcription factors. Springer, New York, 2011, pp. 279-295.
- Vaquero, A, Scher, M, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Serrano, L, Reinberg, D. Sirt1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. (2007) *Nature* 450: 440–444.
- Varma, S, Lal, BK, Zheng, R, Breslin, JW, Saito, S, Pappas, PJ, Hobson, RW, Duran, WN. Hyperglycemia alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. (2005) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1744-H1751.
- Vidal, BC. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. (1984) *Biol Cell* 50: 137-146.
- Vidal, BC, Russo, J, Mello, MLS. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. (1998) *Exp Cell Res* 244:77-82.

- Vidal, BC, Schlueter, G, Moore, GW. Cell nucleus pattern recognition: influence of staining. (1973) *Acta Cytol* 17: 510-521.
- Villeneuve, LM, Reddy, MA, Lanting, LL, Wang, M, Meng, L, Natarajan, R. Epigenetic histone H3 lysine methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. (2008) *PNAS* 105: 9047-9052.
- Voelter-Mahlknecht, S, Letzel, S, Mahlknecht, U. Fluorescence *in situ* hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene. (2006) *Int J Oncology* 28: 899-908.
- Vogelmann, J, Valeri, A, Guillou, E, Cuvier, O, Nollmann, M. Roles of chromatin insulator proteins in higher-order chromatin organization and transcription regulation. (2011) *Nucleus* 2: 358-369.
- Wang, GL, Iakova, P, Wilde, M, Awad, S, Timchenko, NA. Liver tumor escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. (2004) *Genes Dev* 18: 912-925.
- Wang, Z, Zang, C, Cui, K, Schones, DE, Barski, A, Peng, W, Zhao, K. Genome-wide mapping of HAT and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. (2009) *Cell* 138: 1019-1031.
- Wijeratne, SS, Cuppett, SL, Schlegel, V. Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. (2005) *J Agric Food Chem* 53: 8768-8774.
- Williams, KT, Garrow, TA, Schalinske, KL. Type 1 diabetes leads to tissue specific DNA hypomethylation in male rats. (2008) *J Nutr* 138: 2064-2069.
- Willis-Martinez, D, Richards, HW, Timchenko, NA, Medrano, EE. Role of HDAC1 in senescence, aging and cancer. (2010) *Exp Gerontol* 45: 279-285.
- Xiao, C, Kim, HS, Lahusen, T, Wang, RH, Xu, X, Gavrilova, O, Jou, W, Gius, D, Deng, CX. SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice. (2010) *J Biol Chem* 285: 36776-36784.
- Yamame, K, Toumazou, C, Tsukada, Y, Erdjument-Bromage, H, Tempst P, Wong, J, Zhang, Y. JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. (2006) *Cell* 125: 483-495.
- Zhong, L, D'Urso, A, Toiber, D, Sebastian, C, Henry, RE, Vadysirisack, DD, Guimaraes, A, Marinelli, B, Wikstrom, JD, Nir, T. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . (2010) *Cell* 140: 280-293.

- Zhong, Q, Kowluru, RA. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy. (2011) *Diabetes* 60:1304-1313.
- Zollner, RL, Pavin, E.J. Implantação da linhagem de camundongos não-obeso diabéticos (Nod) no Brasil: contribuição ao estudo de auto-imunidade em diabetes mellitus insulino dependente e outras doenças associadas. (1994) *Arq Bras Endocrinol* 38: 105-108.

8. Anexo I

Artigo: *Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice.* Artigo publicado em *Cytometry Part A*; DOI: 10.1002/cyto.a.22102.

Polyploidy and Chromatin Remodeling in Hepatocytes from Insulin-Dependent Diabetic and Normoglycemic Aged Mice

Flávia G. Ghiraldini, Isabela S. Silva, Maria Luiza S. Mello*

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

Received 9 March 2012; Revision Received 14 June 2012; Accepted 21 June 2012

Grant sponsor: São Paulo State Research Foundation (FAPESP); Grant numbers: 2010/50015-6 and 2008/58067-2 (to M.L.S.M. and F.G.G.); Grant sponsor: Brazilian National Council for Research and Development (CNPq); Grant numbers: 471303/2009-7, 301943/2009-5, and 506463/2010-9 (to M.L.S.M. and I.S.S.).

*Correspondence to: Maria Luiza S. Mello, Department of Structural and Physiological Biology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), 13083-862 Campinas, SP, Brazil

Email: mlsmello@unicamp.br

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22102

© 2012 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Changes in polyploidization, chromatin supraorganization, and chromatin accessibility were investigated in hepatocytes collected from adult, nonobese diabetic (NOD) mice with increasing hyperglycemia and compared with adult normoglycemic controls and 56-week-old normoglycemic BALB/c mice. Our goal was to determine the changes in ploidy degrees and chromatin characteristics in mouse hepatocytes that are associated with insulin-dependent diabetes and to detect similarities in these aspects with those verified with aging, with greater accuracy than previous studies. Image analysis of Feulgen-stained nuclei revealed changes in ploidy degrees and chromatin supraorganization. Chromatin accessibility was assessed with micrococcal nuclease (MNase) digestion. Increased polyploidy was associated with increasing levels of glycemia, and this trend toward polyploidy was found even under normoglycemic conditions in NOD mice. Although high degrees of ploidy were also detected in aged BALB/c mice, the magnitude of polyploidy was not the same magnitude as that in the diabetic mice. While there was increased homogeneity of chromatin packaging with increasing polyploidy under conditions of severe hyperglycemia (and even under conditions of normoglycemia) in NOD mice, an inverse relationship was observed in aged BALB/c mice. Chromatin accessibility to MNase increased under severe hyperglycemia and advanced age, but it was much higher in the diabetic mice. In conclusion, although similarities in polyploidy were observed between the hepatocytes from increasingly hyperglycemic adult mice and those from normoglycemic aged mice, the relationship between chromatin remodeling and increases in ploidy degrees was not the same between the hepatocytes of these two groups. These findings demonstrate that strict similarities between diabetes and aging are not always true at the cellular level. This discordance is likely due to differences in the metabolic state of mouse hepatocytes during aging and diabetic conditions consequent to specificities in their gene regulatory programs. © 2012 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

aging; diabetes; hepatocytes; polyploidy; chromatin supraorganization; image analysis; MNase; NOD mice

POLYPOIDITY is a physiological phenomenon in which eukaryotic cells contain more than two sets of the haploid genome. A possible link between polyploidy and the orchestration of gene expression has been proposed. According to this hypothesis, polyploidy acts as a protective mechanism against apoptosis and oxidative stress-induced DNA damage by increasing the gene copy number, saving energy resources, affecting the expression profile of some genes and, consequently, prolonging cell survival (1–3). The determination of Feulgen-DNA content using microspectrophotometry, image analysis, and flow cytometry has allowed investigators to assess changes in the frequency of different degrees of ploidy in the nuclei of several somatic cell types, including liver cells and myocardiocytes, under different physiological or experimental conditions (1–9). In the mammalian liver and heart, polyploidy has been considered an ingenious evolutionary tool for the rapid adaptation of cells to stress

and changing environmental conditions, which protects cell vitality, favors reserve ATP production, and sustains tissue-specific functions while strongly inducing function-specific genes (10). In the liver, polyploidy could enable a flexible physiology in which tissue-specific functions are maintained under severe conditions and new gene regulatory pathways are introduced. Indeed, many ploidy-responsible genes are expressed in the liver (10). Thus, ploidy could serve as an adaptive mechanism for dealing with physiologically unfavorable microenvironments (10).

The increase in polyploidy with advancing age is a well-known phenomenon that is observed in mouse hepatocytes (2,5,8,10). Increasing polyploidy and zonal chromatin unraveling were reported for some hepatocytes from adult nonobese diabetic (NOD) mice with insulin-dependent diabetes (11). Although a 15% increase in $>4C$ (tetraploid) nuclei in mononucleated hepatocytes has been reported for aged A/Uni inbred mice, 8C (octoploid) nuclei represent 23% of the mononucleated hepatocytes in hyperglycemic NOD mice and 1% of the mononucleated hepatocytes in normoglycemic BALB/c adult mice (8,11).

Female NOD mice are a useful experimental model that is widely used for studying cell pathology in Type 1 diabetes, as these mice spontaneously develop a form of autoimmune diabetes that closely resembles the human disease (12). Importantly, NOD mice develop insulin-dependent diabetes, in which the levels of circulating insulin are reduced under hyperglycemic conditions. In rats, insulin regulates the genesis of binucleated, tetraploid liver cells; as insulin decreases, the proportion of these cells drastically decreases. This phenomenon is driven by impairment in Akt phosphorylation that results in the completion of the cytokinesis program (13). For these reasons, a connection between insulin signaling pathways and polyploidy is expected (10,13).

The study of polyploidy and chromatin remodeling in the hepatocytes of NOD mice has previously been limited to observations made under a single hyperglycemic condition, such that the relationship between chromatin remodeling and increases in ploidy degrees were not previously explored. Similarly, data on chromatin accessibility, which could be assessed using the micrococcal nuclease (MNase) assay in adult hyperglycemic and old normoglycemic mouse hepatocytes, have not been previously collected.

In the present study, changes in polyploidy levels, the level of chromatin remodeling and the response to the MNase assay were investigated in hepatocytes of adult NOD mice that showed increasing levels of glycemia and in the hepatocytes of aged normoglycemic BALB/c mice. Our goal was to determine the changes in ploidy degrees and chromatin characteristics in mouse hepatocytes that are associated with insulin-dependent diabetes and to compare similarities in these features with those verified to result from aging, with greater accuracy than previous studies (11).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female NOD and BALB/c mice were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB)

of the University of Campinas (Brazil). The animals were reared under standard controlled conditions, fed extruded chow (Nuvital[®], Colombo, Brazil) and given water ad libitum.

The glycemia levels in the NOD and BALB/c mice were evaluated once a week and 24 h before they were euthanized. Blood samples were obtained by caudal puncture and analyzed using the automatic Accu-Check Active glucose meter (Roche Diagnostica do Brasil Ltd.), which measures glycemia in the range of 10 to 600 mg/dL or 0.6 to 33.3 mmol/L. Glycemic levels were considered normal in the 90 to 100 mg/dL (5.00–5.55 mmol/L) range. Glycemic levels ranging from 200 to 400 mg/dL (11.1–22.2 mmol/L) indicated moderate hyperglycemia, while glycemic values higher than 500 mg/dL (27.5 mmol/L) indicated severe hyperglycemia.

Five groups of animals were used in this study: (1) normoglycemic 8-week-old NOD young adults, (2) normoglycemic 8-week-old BALB/c young adults, (3) moderately hyperglycemic NOD adults, (4) severely hyperglycemic NOD adults, and (5) normoglycemic 56-week-old BALB/c mice. Age-matched normoglycemic BALB/c and NOD mice were included as controls for both diabetic groups.

The protocols involving animal care and use in the present study were approved by the Committee for Ethics in Animal Use of the University of Campinas (registration no. 1608–1) and met the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Immediately after decapitation, mouse livers were removed, placed in a cold 0.9% NaCl solution, and sliced. Fresh imprints prepared from liver slices were fixed on glass slides in a mixture of absolute ethanol and glacial acetic acid (3:1, v/v) for 1 min and then rinsed in 70% ethanol for 5 min. Livers for the MNase assay were stored at -80°C .

DNA Topochemistry

The imprints were subjected to the Feulgen reaction with hydrolysis performed in 4 M HCl for 60 min at 25°C (11,14). The imprints were then treated with Schiff reagent for 40 min in the dark, rinsed in sulfuric water (three batches 5 min each) and distilled water, air dried, and mounted in natural Canada balsam. All of the staining and subsequent steps were performed in parallel for the cellular preparations to minimize variations in the experimental conditions and to reduce the possibility of systematic errors.

Image Analysis

Three to six specimens per experimental condition (approximately 70 hepatocyte nuclei per specimen) were analyzed. For moderately hyperglycemic NOD adults, the normoglycemic NOD controls and BALB/c controls, 45 to 50 nuclei were analyzed per specimen. Ninety Feulgen-stained BALB/c mouse lymphocytes (30 nuclei per specimen) were used as controls for diploidy. As binucleation was not considered in this study, the Feulgen-DNA values are shown for individual nuclei that were not contiguous.

Assessed nuclei were chosen at random and were analyzed using Carl Zeiss/Kontron equipment and Kontron

KS400-3 software (Oberkochen, Munich, Germany). The images were obtained with a Zeiss Axiophot 2 microscope equipped with a Neofluar 40/0.75 objective, an optovar factor 2, a 0.90 condenser, and a λ value of 546 nm. A 100-W halogen illuminator, a voltage regulator for light intensity maintained constant at point 4, filter wheels 1 and 2 rotated into position 100 (open position), and a luminous-filter diaphragm (transmitted light) at its maximal opening were used. Illumination conditions were kept constant for all of the nuclei investigated. Images for processing were fed from the microscope into a Fujitsu/Siemens computer through a Zeiss AxioCam HRC color video camera. The low (*L*) and high (*H*) threshold levels were defined such that the nuclear images appeared with a green false color and were well separated from each other and from the background. In most cases, *L* = 51 and *H* = 122 gray values. Under the optical conditions used, 1 μm corresponded to 12.4 pixels. The minimum area to be measured in this apparatus corresponded to four pixels. The software provided the following quantitative information: nuclear area (μm^2), mean gray value per nucleus (subsequently converted into optical density, OD = absorbance), standard deviation of the total densitometric values per nucleus or absorbance variability per nucleus (SDtd), entropy (number of bits needed to store the densitometric values per nucleus image) (15,16), and energy. The energy parameter was calculated from the densitometric histogram: in contrast to entropy, large values are found in images with large regions of uniform density (15,17). Integrated OD (IOD; i.e., Feulgen-DNA values in arbitrary units) was equal to the absorbance multiplied by the nuclear area.

Nucleus Isolation

Liver cell nuclei were isolated according to previously described procedures (18,19) and used for the MNase assay. Briefly, the livers were homogenized manually in cold TKM buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5; 15 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , $1\times$ PMSE, 2 mM DTT, 10 mM sodium butyrate) with 0.25 M sucrose, and a sucrose gradient was produced using TKM buffer with 2.3 M sucrose. The samples were ultracentrifuged (Beckman[®], Brea) at 105,000g and 4°C for 30 min. The nuclei were then resuspended in 0.25 M sucrose TKM buffer that was supplemented with 2% Triton X-100. Samples were then centrifuged at 800g for 5 min in order to eliminate endoplasmic reticulum remnants. Nucleus purity was checked under phase contrast microscopy and by measuring the absorbance ratio at λ 260/280 in a UV Diode Array Spectrophotometer (HP[®], Palo Alto).

MNase Assay

The isolated nuclei (3 mg/mL) were suspended in Tris-HCl buffer at pH 7.4 containing 65 mM KCl, 15 mM NaCl, 1.8 mM CaCl_2 , and 250 μM PMSE. MNase (Sigma, St. Louis) at a concentration of 1 U/mg DNA was added to the samples, and digestion was carried out for 2, 5, and 10 min at 25°C. The reaction was stopped by the addition of 25 mM EDTA and 20 mM EGTA, which was followed by chilling on ice for 15 min (20). DNA was then extracted with chloroform and

precipitated with 0.3 M sodium acetate and 2.5 vol ethanol at -20°C (21). DNA was then resuspended in Tris-HCl buffer at pH 7.6 containing 60 mM EDTA, 60% glycerol, 0.4 mM bromophenol blue, and 0.5 mM xylene cyanol, which was followed by 1% agarose gel electrophoresis in $1\times$ TAE buffer containing 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide at 80 V for 2 to 3 h at room temperature. The gels were photographed with UV transilluminator (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Stockholm, Sweden), and analysis was performed with ImageJ software (NIH, Bethesda). Band digestion profiles were generated, and values corresponding to the sum of the band peak areas for cut DNA were divided by the uncut DNA area, thus providing the chromatin accessibility index (CAI) (22). Five independent sets of experiments were performed.

Statistics

All image analysis calculations and statistics were performed with Minitab 12TM software (State College, PA). The Mann-Whitney test was performed to assess the statistical significance when the samples did not show a normal distribution. $P < 0.05$ was considered the critical level for rejection of the null hypothesis.

For MNase studies, a comparison of data obtained from five independent sets of experiments was performed by an ANOVA or, for pair-wise comparison, Student's *t*-test (GraphPad, La Jolla).

RESULTS

Image Analysis

Image analysis revealed an increase in Feulgen-DNA values in hepatocyte nuclei with increasing glycemic levels in the NOD mice and with increasing age in the normoglycemic BALB/c mice (Fig. 1, Table 1). The Feulgen-DNA values in the hepatocytes of mice with severe hyperglycemia showed the largest variability in comparison with the specimens with moderate hyperglycemia and normoglycemic NOD mice or normoglycemic BALB/c mice, including aged animals (Fig. 1, Table 1).

No difference was found between the Feulgen-DNA values of hepatocytes from young adults (8 weeks old) of normoglycemic NOD and the BALB/c mice (Table 1). With increasing adult age (19–29 weeks old), the Feulgen-DNA values in hepatocytes of the NOD mice under normoglycemic and moderate hyperglycemic conditions did not differ from each other. However, the values from these animals were higher than those from age-matched normoglycemic BALB/c mice and the values obtained for the normoglycemic young adults of both mouse strains (Table 1).

The Feulgen-DNA values for the hepatocytes from adult NOD mice with severe hyperglycemia were higher than the values for the age-matched normoglycemic NOD and BALB/c controls (Table 1). Although these controls differed from each other, the differences were not of the same magnitude as the differences between the NOD and BALB/c controls against the moderate hyperglycemic group (Table 1). The age at which either moderate or severe hyperglycemia was attained in the

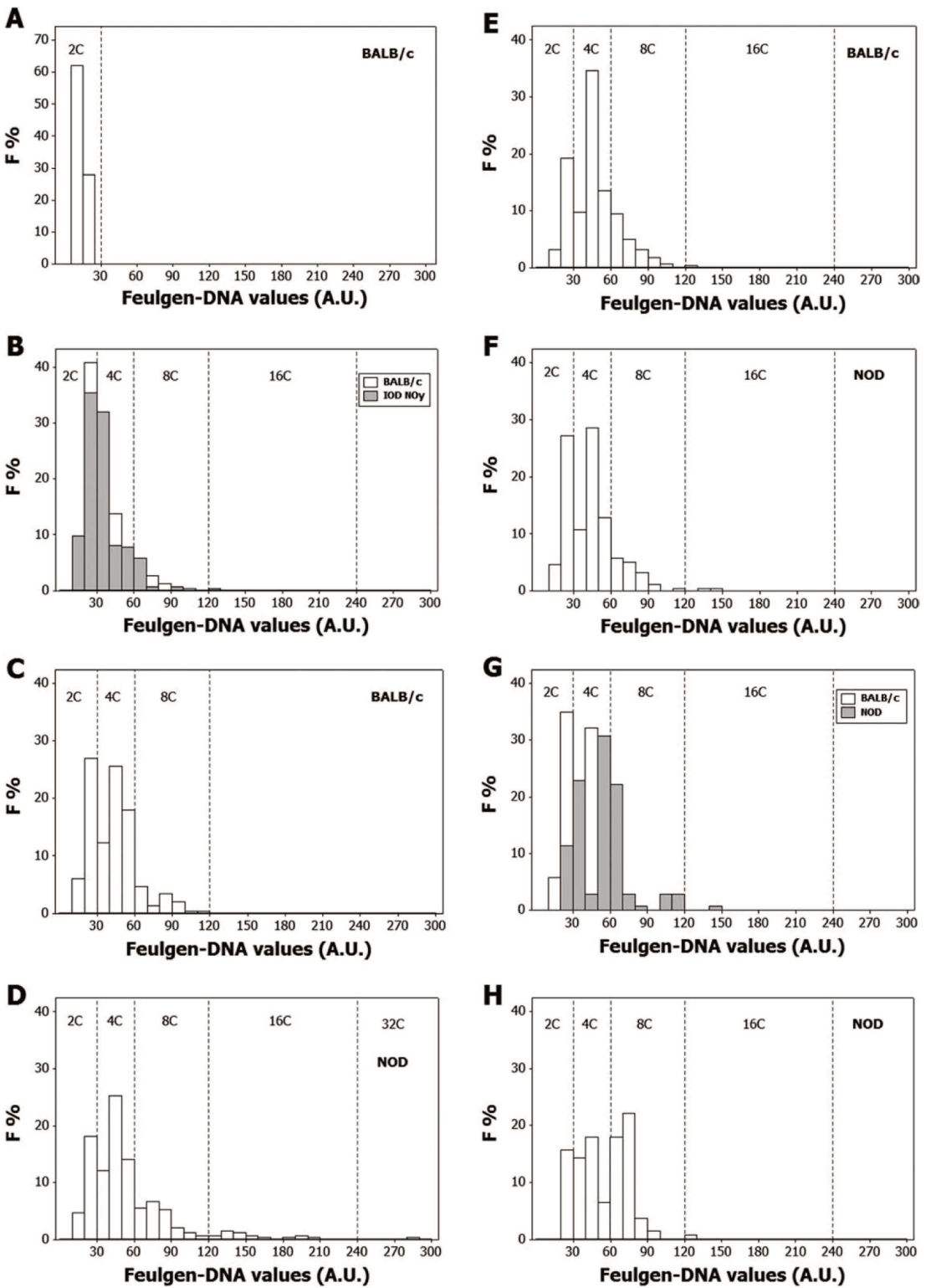


Figure 1. Relative frequency histograms of Feulgen-DNA values in arbitrary units (A.U.) for hepatocytes from normoglycemic and hyperglycemic NOD mice and normoglycemic BALB/c mice. Lymphocytes from BALB/c mice (A) were used as the diploid (2 C DNA content) control. B, Normoglycemic young adults; C, normoglycemic aged mice; D, severely hyperglycemic adults; E and F, normoglycemic controls of same age as severe hyperglycemic adults (D); G, normoglycemic controls of same age as moderately hyperglycemic adults (H); H, Moderately hyperglycemic adults.

Table 1. Feulgen-DNA amounts in hepatocytes of NOD and BALB/c mice under normoglycemic and hyperglycemic conditions

CELLS	MOUSE AGE (WK)	MOUSE LINEAGE	GLYCEMIC CONDITION	NO. ANIMALS	FEULGEN-DNA VALUES (A.U.)			
					X	S	MD	N
Lymphocytes ^a	8	BALB/c	Normal	3	14.18	2.26	13.85	90
Hepatocytes	8	NOD	Normal	5	34.76	14.23	30.73 ^a	350
		BALB/c	Normal	5	35.31	15.20	30.31 ^a	350
	19–29	NOD	Moderate hyperglycemia	3	53.93	19.65	51.75 ^b	140
			Normal ^b	3	53.38	21.68	56.28 ^b	140
	19–38	BALB/c	Normal ^b	3	35.74	11.02	37.52 ^c	140
		NOD	Severe hyperglycemia	5	53.58	33.82	45.82 ^d	350
			Normal ^c	4	43.84	19.82	42.32 ^e	280
		BALB/c	Normal ^c	5	46.26	18.06	44.96 ^f	350
	56	BALB/c	Normal	6	42.29	17.91	43.32 ^e	420

Different superscript letters (a–f) down the Md column mean differences significant at $P_{0.05}$ (Mann–Whitney test). The six different superscript letters mean that the “a” groups differ significantly not only from the “b” groups, but also from the “c,” “d,” “e,” and “f” groups. The same applies to the “b” groups compared with the “c,” “d,” “e,” and “f” groups and so on.

^a 2C DNA class control.

^b Same age as moderate hyperglycemic NOD.

^c Same age as severe hyperglycemic NOD.

A.U., arbitrary units; MD, median; N, number of nuclei counted; S, standard deviation; X, arithmetic mean.

Table 2. Feulgen-DNA C classes in hepatocytes of NOD and BALB/c mice under normoglycemic and hyperglycemic conditions

CELLS	MOUSE AGE (WK)	MOUSE LINEAGE	GLYCEMIC STATE	RELATIVE FREQUENCIES (%) OF FEULGEN-DNA C CLASSES				
				2 C	4 C	8 C	16 C	32 C
Lymphocytes ^a	8	BALB/c	Normal	100	—	—	—	—
Hepatocytes	8	NOD	Normal	45.14	47.72	6.85	0.29	—
		BALB/c	Normal	48.86	43.14	8.00	—	—
	19–29	NOD	Moderate hyperglycemia	15.71	38.58	45.00	0.71	—
			Normal ^b	11.43	56.43	31.43	0.71	—
	19–38	BALB/c	Normal ^b	40.72	57.86	1.42	—	—
		NOD	Severe hyperglycemia	22.57	51.14	20.85	5.15	0.29
			Normal ^c	31.78	52.14	15.35	0.73	—
		BALB/c	Normal ^c	22.28	57.71	19.72	0.29	—
	56	BALB/c	Normal	33.09	55.48	11.43	—	—

^a 2C DNA class control.

^b Same age as moderate hyperglycemic NOD.

^c Same age as severe hyperglycemic NOD.

NOD mice varied. More time was required for two of the five NOD mice to attain severe hyperglycemic levels. Consequently, the chosen age of the NOD and BALB/c normoglycemic controls also varied.

Even in young NOD and BALB/c adults, polyploidy was observed in hepatocyte nuclei. Here, polyploidy is considered in terms of the results provided by nuclei from mononucleated cells. In order to avoid considering nuclei pertaining to binucleated cells in this analysis, contiguous or closest nuclei were not measured. The majority of the Feulgen-DNA values corresponded to at least three different C classes in comparison with the values shown by BALB/c mouse lymphocytes, which corresponded to the 2 C class (Fig. 1, Table 2). Nuclei with higher C DNA doubling classes (16 C and 32 C) were found in the severe hyperglycemic NOD mice, although Feulgen-DNA values that shifted to high degrees of ploidy were also observed in the moderately hyperglycemic mice, in which 45% of the

nuclei were categorized into the 8 C class and only a few nuclei were categorized into the 16 C class (Fig. 1, Table 2). However, the larger number of 8 C nuclei that were sampled in the moderate hyperglycemic NOD mice, compared with the severe hyperglycemic specimens (Table 2), might have resulted in the larger median Feulgen-DNA values obtained for the former (Table 1). Although more than 50% of the cell nuclei in the normoglycemic NOD mice had a DNA content representative of the 4 C class, a significant number of nuclei with a higher degree of ploidy were also found, particularly those with a DNA content positioned in the 8 C class (Table 2).

Although a shift in the Feulgen-DNA amounts to higher values occurred in the hepatocytes of the 56-week-old normoglycemic BALB/c mice compared with those of young adult mice, the pattern of observed values differed from that of the severely hyperglycemic mice (Fig. 1, Table 2).

Table 3. Image textural and densitometric parameters of Feulgen-stained hepatocytes of NOD and BALB/c mice

MOUSE AGE (WK)	MOUSE LINEAGE	GLYCEMIC STATE	SDTD		ENTROPY		ENERGY		MEAN GRAY VALUES	
			X	S	X	S	X	S	X	S
8	NOD	Normal	9.30 ^a	2.41	5.12 ^a	0.38	0.035 ^a	0.010	100.38 ^a	22.34
	BALB/c	Normal	10.69 ^b	3.22	5.29 ^b	0.43	0.032 ^b	0.011	84.79 ^b	13.78
19–29	NOD	Moderate hyperglycemia	8.51 ^a	3.32	4.93 ^c	0.50	0.042 ^c	0.014	87.04 ^b	7.93
		Normal ^a	8.71 ^a	1.83	5.05 ^{a,c}	0.31	0.036 ^a	0.009	84.87 ^b	4.13
19–38	BALB/c	Normal ^a	11.23 ^{b,c}	2.09	5.41 ^d	0.24	0.027 ^d	0.007	74.94 ^d	7.94
	NOD	Severe hyperglycemia	11.71 ^c	3.91	5.40 ^{b,d}	0.53	0.029 ^{b,d}	0.013	82.13 ^b	12.69
56		Normal ^b	11.16 ^{b,c}	2.93	5.37 ^{b,d}	0.41	0.030 ^{b,d}	0.011	87.30 ^b	6.49
	BALB/c	Normal ^b	12.85 ^d	2.80	5.57 ^e	0.34	0.025 ^{d,e}	0.008	86.10 ^b	11.12
	BALB/c	Normal	11.67 ^c	2.78	5.45 ^d	0.37	0.028 ^d	0.009	93.05 ^c	16.75

No. nuclei counted: the same presented in Table 1. Different superscript letters (a–e) down the X columns mean differences significant at $P_{0.05}$ (ANOVA) ; these letters mean that the “a” groups differ significantly not only from the “b” groups, but also from the “c,” “d,” and “e” (if pertinent) groups. The same applies to the “b” groups compared with the “c,” “d,” and “e” (if pertinent) groups and so on.

^a Same age as moderate hyperglycemic NOD.
^b Same age as severe hyperglycemic NOD.
S, standard deviation; X, arithmetic mean.

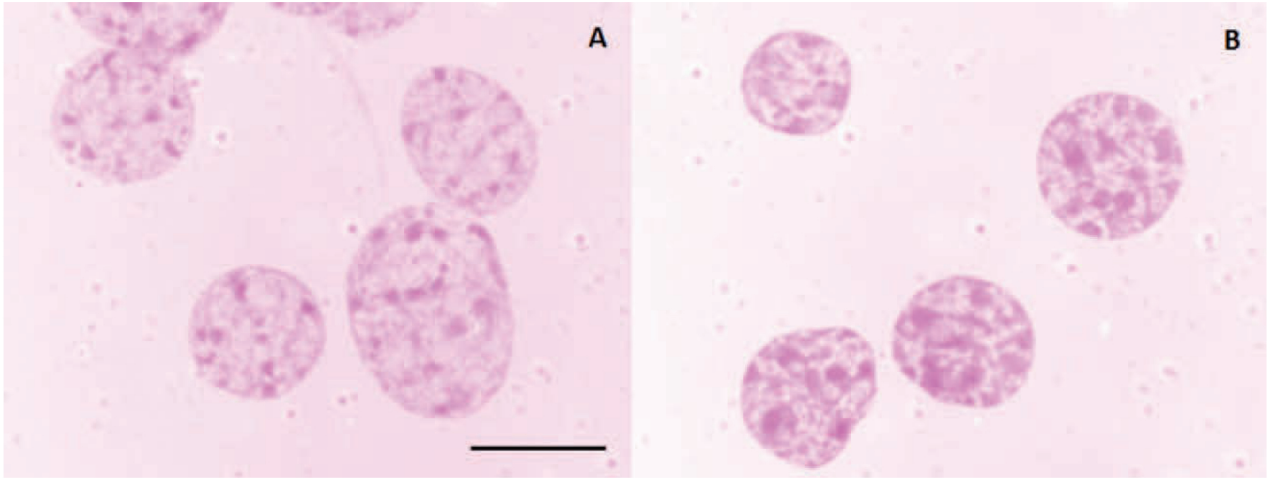


Figure 2. Feulgen-stained hepatocyte nuclei from severe diabetic adult NOD (A) and normoglycemic aged BALB/c mice (B). Bar, 20 μ m.

No changes in SDtd (light transmittance variability per nucleus), entropy and mean gray values were practically observed in the Feulgen-stained chromatin of moderately hyperglycemic NOD mice as compared with the normoglycemic controls. However, when compared with the normoglycemic BALB/c mice of the same age, the SDtd and entropy values of the Feulgen-stained hepatocytes of normoglycemic and moderate hyperglycemic NOD mice were much lower (Table 3). The inverse result was observed with mean gray values (a densitometric parameter) (Table 3). Under conditions of severe hyperglycemia and in comparison with the NOD control, no statistically significant changes in the textural parameters of the studied nuclear population were observed. However, the SDtd and entropy values were higher than those measured under conditions of moderate hyperglycemia and were lower than those measured in the appropriate BALB/c controls (Table 3). The energy values were inversely related to the entropy values (Table 3).

Interestingly, even the NOD and BALB/c mice differed from each other in terms of their nuclear textural parameters under normoglycemic states. Values obtained for SDtd and entropy in Feulgen-stained hepatocytes of NOD mice were smaller than those obtained for the hepatocytes of BALB/c mice; the inverse result was observed for the energy parameter (Table 3). Examples of images of Feulgen-stained hepatocytes from severely hyperglycemic adult NOD and normoglycemic aged BALB/c mice are shown in Figure 2.

Changes in textural parameters were also found with increasing age in the BALB/c mice. Indeed, increased SDtd and entropy values along with decreased energy values were found when 19- to 29-week-old mice were compared with 8-week-old mice (Table 3). These values were slightly increased in the 56-week-old specimens (Table 3).

A significant difference in mean gray values was found between severely hyperglycemic NOD mice and normoglycemic aged BALB/c mice, but not between severe

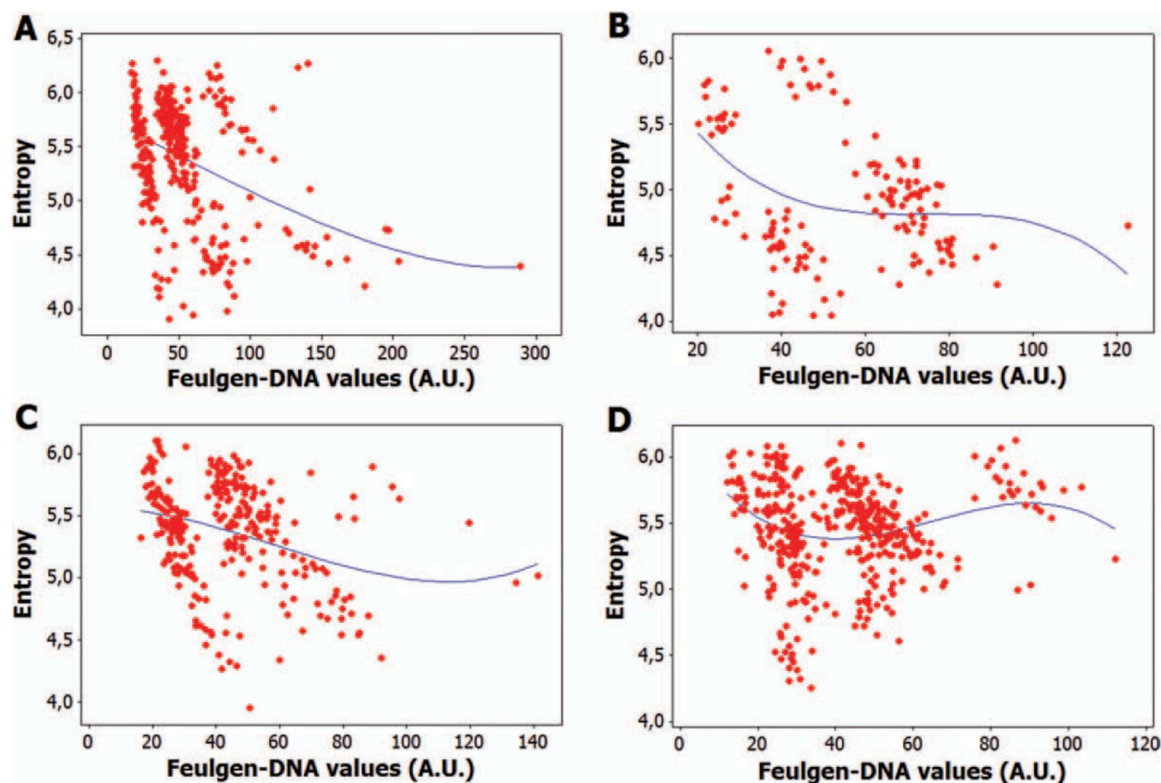


Figure 3. Fitted line plots showing the relationship between nuclear entropy and Feulgen-DNA values in arbitrary units (A.U.) for hepatocytes from severely (A) and moderately (B) hyperglycemic and normoglycemic (C) adult NOD mice, and for hepatocytes from normoglycemic aged BALB/c mice (D).

hyperglycemic mice and moderate hyperglycemic mice (Table 3).

When plotting entropy versus Feulgen-DNA values, it is possible to detect a different trend regarding entropy as a function of the increasing ploidy degrees for hepatocytes from hyperglycemic adult compared with normoglycemic aged mice (Fig. 3). The same trend was verified when plotting mean gray values versus the Feulgen-DNA values (data not shown). This result is not revealed by a simple analysis of isolated image analysis parameters as shown in Table 3.

Chromatin Accessibility to MNase

MNase accessibility increased in the chromatin of hyperglycemic adult NOD and normoglycemic aged BALB/c hepatocytes compared with normoglycemic adult controls. MNase accessibility was further increased by extending digestion times (Fig. 4). For the 10 min MNase digestion period, the CAI value of the chromatin of the hepatocytes from adult NOD mice under moderate hyperglycemia did not differ from the respective normoglycemic control but was higher than that of the BALB/c normoglycemic control (Fig. 5). The CAI values for hepatocyte chromatin under conditions of severe hyperglycemia were significantly higher than those for the hepatocytes from normoglycemic mice, including those for the aged BALB/c mice, which displayed CAI values that were sig-

nificantly higher than those obtained for the normoglycemic adult NOD and the BALB/c mice (Figs. 4 and 5).

DISCUSSION

Polyplodization

This study demonstrates that polyplodization is elevated in mouse hepatocytes with increasing levels of hyperglycemia. A single hyperglycemic condition had previously been reported to induce a level of nuclear ploidy as high as 8 C in NOD mouse hepatocytes (11). Other cell types, such as tail tendon fibroblasts, had also been known to develop polyplodity in diabetes-expressing NOD mice (23). In the present investigation, very high ploidy degrees (16 C and 32 C DNA classes) were observed in some of the cell nuclei under conditions of severe hyperglycemia. This situation has been anticipated in moderately hyperglycemic mice that have demonstrated some nuclei with DNA in the 16 C class.

Interestingly, a trend toward increased levels of polyplodity in liver cells was detected in the NOD mice even under normoglycemic conditions in comparison with the BALB/c mice of the same age and glycemia level. This trend possibly results from the remodeling of the NOD mouse epigenome early in the lifetime of this mouse strain, provided that mechanisms that generate polyplodization are in some way affected by epigenetic programming. For instance, although

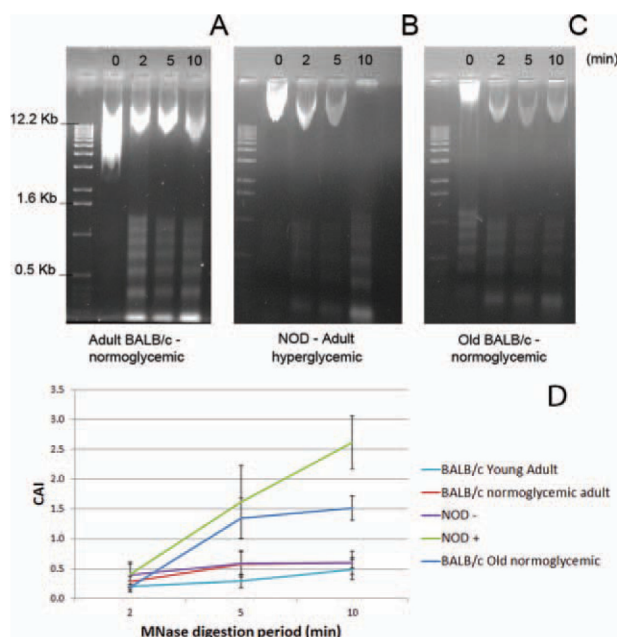


Figure 4. Chromatin accessibility to MNase digestion in mouse hepatocytes. Representative samples of DNA incubated for different times with MNase are shown for normoglycemic BALB/c adults (A), severely diabetic NOD adults (B), and normoglycemic BALB/c aged mouse hepatocytes (C). The DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel with ethidium bromide. DNA marker sizes are shown in kilobases. Naked DNA patterns correspond to the lane positioned at the left side of A–C. D: Chromatin accessibility indices (CAI) increase with increasing MNase digestion times.

no data on DNA methylation are available for NOD mice, genomic DNA hypomethylation has been reported in the liver cells of nonobese Type 1 diabetic rats (24). The observation that “DNA methylation levels are generally established early in development and are stably maintained thereafter” (25,26) has been recently supported by Toperoff et al. (26) who reported abnormal methylation levels in a tissue that is not directly involved in insulin secretion or action (blood) in young human adulthood, before major tissue differentiation and the appearance of Type 2 diabetes manifestations.

The hepatocyte nuclei of aged normoglycemic BALB/c mice exhibited a Feulgen-DNA amount that shifted to higher values, consistent with previously reported findings (8). However, the increase in the Feulgen-DNA amounts in aged BALB/c mice compared with the adult controls was not as substantial as the increase observed for the diabetic NOD mice. We propose that this result is because the genomic effects for the 56-week-old BALB/c mice are not totally comparable to the diabetic conditions in the NOD mice or because the BALB/c female mice at this age do not fully represent advanced aging, as reported for instance in A/Uni male mice (27). If considering epigenetic markers to the genome, the age-related dysregulation of cytosine methylation that occurs in the rat and mouse liver (28–30) is not fully comparable to the pattern (cytosine hypomethylation) reported for liver cells from Type 1 diabetic rat (24). Age-associated DNA hypermethylation has

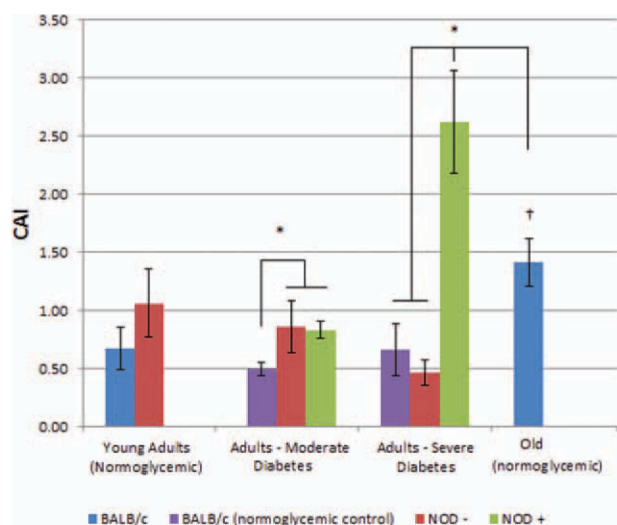


Figure 5. Comparison of chromatin accessibility indices (CAI) for mouse hepatocytes digested with MNase for 10 min. CAI values were calculated as described in the text from five independent sets of experiments.

been reported for 18 S and 28 S ribosomal RNA genes in liver cells from CBA/Ca mice (28). Regarding the comprehensive DNA methylation profiling of promoter regions in aged C57BL/6 mice, 21% out of 3,627 detectable autosomal genes showed cytosine hypermethylation, whereas 13% showed cytosine hypomethylation in intestinal cells (30). Seven out of 11 changed genomic loci for age-related DNA methylation in the intestine showed similar changes in the liver (30).

In regard to whether polyploidization alters epigenetic processes in the hepatocytes, no specific data for hyperglycemic mice are available. According to Lu et al. (31), no major changes in gene expression patterns have been found for differently polyploid hepatocytes in BALB/c mice. However, DNA methylation increases with aging in the mouse liver, although no direct correlation of DNA methylation with gene expression has been established in this organism (32). In contrast, as DNA methylation generally affects the accumulation of other epigenetic modifications (33), gene expression is potentially affected directly and indirectly in mouse hepatocytes by aging (32). Of note, this does not completely confirm a correlation with polyploidy. However, Anatskaya and Vinogradov (10) have reported a link between polyploidy and gene expression by indicating that many ploidy-responsive genes are expressed in the liver. In conclusion, it is not yet clear whether these reported similarities or differences in gene expression with polyploidization are orchestrated epigenetically.

The understanding of the consequences of polyploidization for hepatocytes is quite limited (34). Increased polyploidy in the mouse liver is potentially associated with liver protection, which might specifically involve the activation of sirtuin-mediated pathways, as proposed by Anatskaya and Vinogradov (10). Indeed, preliminary data from our laboratory with hepatocytes from severely hyperglycemic NOD mice, which

had the largest increase in polyploidy in this study, demonstrated an increase in the abundance of Sirt1 and PGC-1 alpha (35). These proteins may participate in a protective response of the hepatocytes against diabetic stress.

Incomplete cytokinesis might represent the major event for generating polyploidy in the liver (34). Several different molecules have been implicated in polyploidization mechanisms, and their effects even vary depending on the cell type. The transcription factors GATA-1 and RUNX-1 interactome have been reported to control polyploidization in some animal cells, such as in the case of megakaryocytes (36). Kinases of the Aurora family are apparently also involved in the attainment of polyploidy in some cell types. Perturbations in Aurora A signaling, which is required for mitotic spindle assembly and chromosome segregation (37), result in mitotic arrest in pancreatic cell lines (38). Depletion of Aurora B in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* also induces polyploidy, as a result of a failure in cytokinesis; in contrast, overexpression of this kinase in other cell types leads to centrosome amplification and increased ploidy (37). Despite the involvement of these molecules on polyploidization in different cell types, no published data on this subject exist that could demonstrate polyploidization in liver cells and, particularly, those patterns found in mice under hyperglycemic and aging conditions.

Chromatin remodeling

The results obtained from the analysis of individual image textural parameters indicated that chromatin remodeling occurred in mouse hepatocytes with insulin-dependent diabetes (NOD) and in aged mouse hepatocytes (BALB/c). Values for SDtd, entropy, and energy indicated lower variability in chromatin condensation levels (more homogeneously packed chromatin) (8,11,16,17,39,40) under moderate hyperglycemia in the NOD mice. No apparent changes in chromatin texture were verified in the hepatocytes of NOD mice under severe hyperglycemia in comparison with the normoglycemic control. The variability in the chromatin packing states of the NOD mice increased with increasing hyperglycemia.

While matching information on entropy versus Feulgen-DNA amounts, a different trend regarding entropy increase (or decrease) as a function of increasing ploidy degrees could be demonstrated for hepatocytes from hyperglycemic adult mice compared with normoglycemic aged mice. This interpretation could not be demonstrated by the MNase assay alone, although this assay revealed a different elevated status of chromatin accessibility in the hepatocytes from hyperglycemic adult NOD and normoglycemic aged BALB/c mice in comparison with their respective controls. We cannot distinguish between the different classes of hepatocyte nuclei regarding their participation in chromatin accessibility on the basis of the MNase assay because this test requires that a pool of cell nuclei be prepared. In the case of liver, nuclei with various ploidy degrees are mixed together, but the highest polyploid nuclei are not the most representative nuclei. Regardless, because of the results obtained with the plotting of entropy versus Feulgen-DNA amounts and the MNase assay, it is assumed that the highest polyploid nuclei probably differ in

their chromatin accessibility when compared under hyperglycemic and aging states in mice.

NOD mice under a single hyperglycemic condition were previously reported to have lower variability in their chromatin condensation and less extensively condensed chromatin compared with normoglycemic BALB/c mice (11). Indeed, the increased chromatin accessibility to MNase digestion in hepatocytes from severely hyperglycemic mice, especially with a digestion time of 10 min, confirmed that the open state of the chromatin predominates in these cells. Furthermore, there is increased homogeneity in chromatin packaging (a decrease in entropy) with increasing polyploidy in the severe hyperglycemic NOD mouse hepatocytes.

NOD and BALB/c mouse strains seem to differ in their chromatin supraorganization, even under normoglycemic conditions. This finding, like that regarding polyploidy and discussed above, might be attributed to differences in epigenetic programming in the mouse strains compared here. Epigenetic markers are well known to affect chromatin supraorganization in other cell types, and this effect can be studied by image analysis (e.g., 41–43).

The textural characteristics of the Feulgen-stained nuclei in the hepatocytes from 56-week-old BALB/c mice demonstrated that the chromatin was packed in a more heterogeneous manner compared with the chromatin of young adult mice. The variability in the observed higher-order packing states of chromatin was particularly striking given that the nuclei with the highest degrees of ploidy degrees in the 56-week-old mice had higher entropy values. This finding is consistent with previously reported data for older Uni/A specimens (8), in which the detachment of nuclear scaffold components from transcriptionally inactive DNA sequences favored an increase in the frequency of extended chromatin fiber formation (44). This finding would also explain the observed chromatin accessibility in the MNase assay, which was high in 56-week-old BALB/c mice compared with the young adult mice, though not as high as in the diabetic NOD mice.

In tail tendon fibroblasts, which also undergo polyploidization, the levels of chromatin condensation and heterogeneity in chromatin higher-order packing states have been found to increase (23). This finding is in contrast to the results from our study and suggests that different cell types may be differently prepared to respond to hyperglycemia depending on their unique metabolic program.

Although the presence of microRNAs (miRNAs), a family of small noncoding RNAs, in hepatocytes of hyperglycemic NOD mice compared with aged BALB/c mice differs and is differentially meaningful to the polyploidization and the chromatin remodeling phenomena reported here, published data on this characteristic are not available. Indeed, the up-regulation of four miRNAs (miR-93, miR-214, miR-669, and miR-709) correlated to protein decline, and vulnerability to oxidative stress has been reported for the aging liver in C57BL/6 mice (45). Although the overexpression of a pancreatic islet cell-specific miRNA (miR-375) regulates insulin secretion (46), the role of miR-93, miR-214, miR-669, and miR-709 in the insulin/IGF pathway is not yet clear (45).

CONCLUSIONS

The present study demonstrates that increased polyploidy, decreased heterogeneity packing, and decreased distribution of chromatin are present in NOD mouse hepatocytes with increasing hyperglycemia. These changes in chromatin properties also appear in normoglycemic NOD specimens to a lesser degree. Even in early life and normoglycemic conditions, the hepatocytes from NOD mice have a tendency to develop a different chromatin supraorganization in comparison with that of the BALB/c mice. This phenomenon is possibly a function of differences in their epigenetic markers, which result in different functional implications for these mouse strains.

Despite certain similarities in polyploidy in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and aged mice, chromatin remodeling under these conditions was not identical. This dissimilarity is likely associated with differences in their metabolic states consequent to specific adaptive responses built into their gene regulatory programs (2,47).

LITERATURE CITED

1. Gorla GR, Malhi H, Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci* 2001;114:2943–2951.

2. Anatskaya OV, Vinogradov AE. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* 2007;89:70–80.

3. Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation: Central role of insulin signaling. *Cell Cycle* 2010;9:460–466.

4. Brodsky VY, Uryvaeva IV. Cell polyploidy: Its relation to cell growth and function. *Int Rev Cytol* 1977;50:272–332.

5. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 2000;10:161–171.

6. Vinogradov AE, Anatskaya OV, Kudryavtsev BN. Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals. *Genome* 2001;44:350–360.

7. Williams GM, Iatropoulos MJ. Alterations of liver cell function and proliferation: Differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol* 2002;30:41–53.

8. Moraes AS, Guaraldo AMA, Mello MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. *Cytometry Part A J Int Soc Anal Cytol* 2007;71A:28–37.

9. Funk-Keenan J, Haire F, Woolard S, Atchley WR. Hepatic endopolyploidy as a cellular consequence of age-specific selection for rate of development in mice. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2008;310:385–397.

10. Anatskaya OV, Vinogradov AE. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: Evidence from tissue-specific mammal transcriptome. *Funct Integr Genomics* 2010;10:433–446.

11. Mello MLS, Aldrovani M, Moraes AS, Guaraldo AMA, Vidal BC. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 2009;40:577–585.

12. Yang Y, Santamaria P. Dissecting autoimmune diabetes through genetic manipulation of non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2003;46:1447–1464.

13. Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidization of liver cells. *Adv Exp Med Biol* 2010;676:123–135.

14. Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet (Genet Mol Biol)* 1997;20:257–264.

15. Kontron Elektronik Imaging System KS400, User's Guide, Vol. 1. Eching/Munich: Kontron Elektronik GmbH; 1995.

16. Mello MLS, Russo P, Russo J, Vidal BC. Entropy of Feulgen-stained 17- β -estradiol-transformed human breast epithelial cells as assessed by restriction enzymes and image analysis. *Oncol Rep* 2009;21:1483–1487.

17. Doudkine C, Macaulay C, Poulin N, Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry. *Pathologica* 1995;87:286–299.

18. Blobel G, Potter VR. Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science* 1966;154:1662–1665.

19. Matunis MJ. Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes. *Methods* 2006;39:277–283.

20. Thakur MK, Asaithambi A, Mukherjee S. Sex-specific alterations in chromatin conformation of the brain of aging mouse. *Mol Biol Rep* 1999;26:239–247.

21. Lu Q, Richardson B. DNase I hypersensitivity analysis of chromatin structure. In: Tollefsbol TO, editor. *Epigenetics Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2004. pp 77–86.

22. Cruickshank M, Fenwick E, Abraham LJ, Ulgianti D. Quantitative differences in chromatin accessibility across regulatory regions can be directly compared in distinct cell-types. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:349–355.

23. Aldrovani M, Mello MLS, Guaraldo AMA, Vidal BC. Nuclear phenotypes and DNA fragmentation in tendon fibroblasts of NOD mice. *Caryologia* 2006;59:116–124.

24. Williams KT, Garrow TA, Schalinske KL. Type I diabetes leads to tissue-specific DNA hypomethylation in male rats. *J Nutr* 2008;138:2064–2069.

25. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009;10:295–304.

26. Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, Wainstein J, Friedlander Y, Levy-Lahad E, Glaser B, et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Human Mol Genet* 2012;21:371–383.

27. Mello MLS, Moraes AS, Vidal BC. Extended chromatin fibers and chromatin organization. *Biotech Histochem* 2011;86:213–225.

28. Swisselme K, Disteche CM, Thorvaldsen J, Nelson A, Salk D. Age-related increase in methylation of ribosomal genes and inactivation of chromosome-specific rRNA gene clusters in mouse. *Mut Res* 1990;237:131–146.

29. Thompson RF, Atzman G, Gheorghe C, Liang HQ, Lowes C, Greally JM, Brazilai N. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 2010;9:506–518.

30. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, Zhang N, Liang S, Donehower LA, Issa JPJ. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res* 2010;20:332–340.

31. Lu P, Prost S, Caldwell H, Tugwood JD, Betton GR, Harrison DJ. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. *Mamm Genome* 2007;18:617–626.

32. Takasugi M. Progressive age-dependent DNA methylation changes start before adulthood in mouse tissues. *Mech Ageing Dev* 2011;132:65–71.

33. Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol* 2009;53:203–214.

34. Gendric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:29–34.

35. Ghiraldini FG, Toni IM, Mello MLS. Chromatin structure and Sirt 1 and PGC-1 α expressions in liver cells of NOD mice. *Diabetologia* 2010;53(Suppl 1):1343.

36. Muntean AG, Pang L, Poncz M, Dowdy SE, Blobel GA, Crispino JD. Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood* 2012;109:5199–5207.

37. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:1–10.

38. Warner SL, Munoz RM, Stafford P, Koller E, Hurley LH, von Hoff DD, Han H. Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2450–2458.

39. Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 1996;105:333–355.

40. Yogesan K, Jorgensen T, Albrechtsen F, Tveter KJ, Danielsen HE. Entropy-based texture analysis of chromatin structure in advanced prostate cancer. *Cytometry* 1996;24:268–276.

41. El-Khoury V, Gomez D, Liautaud-Roger F, Trussardi-Regnier A, Dufer J. Effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on nuclear texture and c-jun gene expression in drug-sensitive and drug-resistant human H69 lung carcinoma cells. *Cytometry Part A J Int Soc Anal Cytol* 2004;62A:109–117.

42. Toth KE, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stohr M, Stohr M. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 2004;117:4277–4287.

43. Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One* 2011;6:e29144.

44. Moraes AS, Mondin M, Beletti ME, Aguiar-Perecin MLR, Guaraldo AMA, Mello MLS. Age-related association of rDNA and telomeres with the nuclear matrix in mouse hepatocytes. *Cell Biol Int* 2010;34:925–931.

45. Maes OC, An J, Sarojini H, Wang E. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev* 2008;129:534–541.

46. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226–230.

47. Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10630–10635.

9. Anexo II

Lista de genes superexpressos em hepatócitos de camundongos NOD hiperglicêmicos em relação a animais NOD normoglicêmicos ($P < 0,05$; *Fold Change* > 1,6).

Entrez GeneID	Gene	<i>Fold Change</i>
Transcrição/ Tradução		
12013	<i>Bach1</i>	2.354
108857	<i>Eif4bp3</i>	3.220
14056	<i>Ezh2</i>	1.656
103537	<i>Mbtd1</i>	1.731
545289	<i>Nr1d2</i>	2.530
19017	<i>Ppargc1a</i>	2.166
Inflamação		
56066	<i>Cxcl11</i>	2.652
16161	<i>Il12rb1</i>	2.212
107527	<i>Il1rl2</i>	1.849
11988	<i>Slc7a2</i>	2.038
239081	<i>Tlr11</i>	1.753
22256	<i>Ung</i>	1.800
Metabolismo de Carboidratos		
14377	<i>G6pc</i>	1.720
14378	<i>G6pc2</i>	1.634
16369	<i>Irs3</i>	1.669
69541	<i>Lyg1</i>	1.848
18534	<i>Pck1</i>	3.351
19017	<i>Ppargc1a</i>	2.166
Transporte		
14088	<i>Fancc</i>	1.635
237636	<i>Npc1l1</i>	1.612
18534	<i>Pck1</i>	3.351
140919	<i>Slc17a6</i>	2.356
434203	<i>Slc28a1</i>	1.836
224674	<i>Slc37a1</i>	1.987
11988	<i>Slc7a2</i>	2.038
Metabolismo de Lipídeos		
57875	<i>Angptl4</i>	2.176
14377	<i>G6pc</i>	1.720
237636	<i>Npc1l1</i>	1.612
18534	<i>Pck1</i>	3.351
19017	<i>Ppargc1</i>	2.166
Ritmos Biológicos		

12457	<i>Ccrn4l</i>	1.642
217166	<i>Nr1d1</i>	2.530
18626	<i>Per1</i>	1.987
Respiração Celular/Oxidação		
13088	<i>Cyp2b10</i>	2.196
14088	<i>Fancc</i>	1.635
Organização da Cromatina		
14056	<i>Ezh2</i>	1.656
319155	<i>Hist2h4</i>	2.016
Desenvolvimento		
15431	<i>Hoxd11</i>	2.335
100044656	<i>Ren1</i>	1.857
Outros		
13178	<i>Agxt2l1</i>	2.277
71760	<i>Alas1</i>	1.648
13178	<i>Dck</i>	1.820
14945	<i>Gzmk</i>	1.965
18113	<i>Nnmt</i>	3.282
223775	<i>Pim3</i>	1.641
67702	<i>Rnf149</i>	1.741
74637	<i>Shpk</i>	1.638
96935	<i>Susd4</i>	1.871

10. Anexo III

Lista de genes repressos em hepatócitos de camundongos NOD hiperglicêmicos em relação a animais NOD normoglicêmicos ($P < 0,05$; *Fold Change* > 1,6).

Entrez GeneID	Gene	Fold Change
Transcrição/ Proliferação celular		
12223	<i>Btc</i>	-2.665
12301	<i>Cacybp</i>	-2.462
12389	<i>Cav1</i>	-1.892
98828	<i>Cdc123</i>	-1.973
13591	<i>Ebf1</i>	-1.964
13631	<i>Eef2k</i>	-3.225
12497	<i>Entpd6</i>	-1.697
14456	<i>Gas6</i>	-1.799
18048	<i>Klk1b4</i>	-2.999
75660	<i>Lin37</i>	-1.947
17295	<i>Met</i>	-2.173
59126	<i>Nek6</i>	-1.640
18089	<i>Nkx2-3</i>	-1.655
19015	<i>Ppard</i>	-1.723
72147	<i>Zbtb46</i>	-1.922
Metabolismo de Lipídeos		
67758	<i>Aadac</i>	-2.661
93961	<i>B3galt5</i>	-1.604
1289	<i>Cav1</i>	-1.892
16592	<i>Fabp5</i>	-3.694
103988	<i>Gck</i>	-1.892
14732	<i>Gpam</i>	-1.987
15496	<i>Hsd3b5</i>	-4.433
17295	<i>Met</i>	-2.173
17837	<i>Mug2</i>	-1.919
18823	<i>Plp1</i>	-1.931
116939	<i>Pnpla3</i>	-4.760
75772	<i>Pnpla5</i>	-5.119
19015	<i>Ppard</i>	-1.723
20787	<i>Srebf1</i>	-1.623
Inflamação		
100042493	<i>Ccl21B</i>	-2.044
102657	<i>Cdc276</i>	-2.446
14103	<i>Fasl</i>	-2.070
15007	<i>H2-q10</i>	-2.443
16186	<i>Il2rg</i>	-1.938
54123	<i>Irf7</i>	-2.488
16643	<i>Klrd1</i>	-2.293

18089	<i>Nkx2-3</i>	-1.655
246728	<i>Oas2</i>	-3.199
230979	<i>Tnfrsf14</i>	-2.617
Transporte		
76507	<i>Abp1</i>	-2.132
100041585	<i>Amd2</i>	-2.063
93961	<i>B3galt5</i>	-1.604
12389	<i>Cav1</i>	-1.892
103988	<i>Gck</i>	-1.822
16429	<i>Itln1</i>	-1.738
103806	<i>Maml1</i>	-2.368
98396	<i>Slc41a1</i>	-2.622
50934	<i>Slc7a8</i>	-1.640
Sinalização		
12389	<i>Cav1</i>	-1.892
16429	<i>Itln1</i>	-1.738
17295	<i>Met</i>	-2.173
244238	<i>Mrgpre</i>	-2.329
52033	<i>Pbk</i>	-1.945
72433	<i>Rab38</i>	-2.056
52250	<i>Reep1</i>	-2.487
84112	<i>Sucnr1</i>	-2.575
70652	<i>Tmem144</i>	-2.193
Metabolismo de Carboidratos		
103988	<i>Gck</i>	-1.822
20787	<i>Srebef1</i>	-1.623
Outros		
76507	<i>Abp1</i>	-2.132
12160	<i>Bmp5</i>	-1.743
12349	<i>Car2</i>	-2.021
239447	<i>Colec10</i>	-1.948
244653	<i>Hydin</i>	-2.013
16416	<i>Itgb3</i>	-1.752
74435	<i>Lrriq3</i>	-2.471
67182	<i>Pdzk1ip1</i>	-2.722
67182	<i>Pdzk1ip1</i>	-2.722
58235	<i>Pvrl1</i>	-1.762
20612	<i>Siglec1</i>	-2.164

11. Anexo IV

Lista de genes superexpressos em hepatócitos de camundongos Balb/c idosos em relação a animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; *Fold Change* > 1,6).

Entrez GeneID	Gene	<i>Fold Change</i>
Transcrição/tradução		
13170	<i>Dbp</i>	5.981
226982	<i>Eif5b</i>	1.785
72699	<i>Lime1</i>	2.505
217166	<i>Nr1d1</i>	4.354
353187	<i>Nr1d2</i>	3.509
18627	<i>Per2</i>	1.623
18628	<i>Per3</i>	4.416
18985	<i>Pou2af1</i>	2.543
78912	<i>Sp2</i>	1.703
21685	<i>Tef</i>	1.979
228913	<i>Zfp217</i>	2.314
Ritmos Biológicos		
12457	<i>Ccrn4l</i>	1.625
13170	<i>Dbp</i>	5.981
353187	<i>Nr1d2</i>	3.509
217166	<i>Nrdr1</i>	4.354
18627	<i>Per2</i>	1.623
18628	<i>Per3</i>	4.416
21685	<i>Tef</i>	1.979
Sinalização		
18835	<i>Ar</i>	2.217
26381	<i>Esrrg</i>	1.754
217166	<i>Nrdr1</i>	4.354
19734	<i>Rgs16</i>	3.754
20257	<i>Stmn2</i>	1.667
84112	<i>Sucnr1</i>	2.306
58217	<i>Trem1</i>	1.826
Proteólise		
58860	<i>Adamdec1</i>	1.737
109660	<i>Ctrl</i>	7.364
16612	<i>Klk1</i>	5.378
17318	<i>Mid1</i>	1.634
66222	<i>Serpinb1a</i>	2.492
75788	<i>Smurf1</i>	1.617
22074	<i>Try4</i>	9.142
Respiração/Oxidação		
12862	<i>Cox6a2</i>	4.554
545288	<i>Cyp2c40</i>	1.803

13116	<i>Cyp46a1</i>	1.963
13119	<i>Cyp4a14</i>	1.61
Inflamação		
20304	<i>Ccl5</i>	1.819
11537	<i>Cfd</i>	2.661
15000	<i>H2-Dmb2</i>	1.655
72699	<i>Lime1</i>	2.505
56312	<i>Nupr1</i>	2.373
19694	<i>Reg3a</i>	1.838
Metabolismo de Lipídeos		
12613	<i>Cel</i>	8.325
14077	<i>Fabp3</i>	3.341
18778	<i>Pla2g1b</i>	6.86
69060	<i>Pnlip</i>	10.481
20859	<i>Sult2a1</i>	1.767
Ciclo celular/Proliferação		
100048323	<i>1190002h23rik</i>	2.151
13197	<i>Gadd45a</i>	2.462
237436	<i>Gasl3</i>	1.848
69716	<i>Trip13</i>	1.604
Transporte		
239273	<i>Abcc4</i>	2.302
69065	<i>Chach1</i>	3.317
217826	<i>Kcnk13</i>	1.652
20278	<i>Scnn1g</i>	1.681
Diferenciação		
229715	<i>Amigo1</i>	1.955
18212	<i>Ntrk2</i>	1.723
18551	<i>Pcsk4</i>	1.632
Metabolismo de Carboidratos		
11754	<i>Aoc3</i>	1.931
56386	<i>B4galt6</i>	1.628
Outros		
68737	<i>Angel1</i>	2.513
67510	<i>Fam18b</i>	2.077
15507	<i>Hspb1</i>	1.867
18551	<i>Pcsk4</i>	1.632
19693	<i>Reg2</i>	3.487
76438	<i>Rftn1</i>	2.359
21953	<i>Tnni2</i>	4.752
269023	<i>Zfp608</i>	1.633

12. Anexo V

Lista de genes repressos em hepatócitos de camundongos Balb/c idosos em relação a animais Balb/c adulto-jovens ($P < 0,05$; *Fold Change* > 1,6).

Entrez GeneID	Gene	<i>Fold Change</i>
Cancer		
11651	<i>Akt1</i>	-2.789
12575	<i>Cdkn1a</i>	-2.007
13649	<i>Egfr</i>	-1.609
22416	<i>Wnt3a</i>	-2.028
235230	<i>Zbtb16</i>	-2.268
Proliferação/ Ciclo celular		
11651	<i>Akt1</i>	-2.789
12575	<i>Cdkn1a</i>	-2.007
13649	<i>Egfr</i>	-1.609
19015	<i>Ppard</i>	-2.701
235320	<i>Zbtb16</i>	-2.268
Respiração Celular/Oxidação		
208665	<i>Akr1d1</i>	-2.056
13088	<i>Cyp2b10</i>	-2.063
13105	<i>Cyp2d9</i>	-1.873
15496	<i>Hsd3b5</i>	-3.651
320878	<i>Mical2</i>	-1.640
Desenvolvimento		
13649	<i>Egfr</i>	-1.609
19015	<i>Ppard</i>	-2.701
22044	<i>Trh</i>	-1.790
22416	<i>Wnt3a</i>	-2.028
Sinalização		
246709	<i>Rgs13</i>	-1.981
321018	<i>Serpina4-ps1</i>	-3.269
71907	<i>Serpina9</i>	-2.571
76367	<i>Tp53rk</i>	-1.770
Transcrição/Tradução		
1088112	<i>Eif4ebp3</i>	-2.468
269854	<i>Nat14</i>	-2.150
68028	<i>Rpl22l1</i>	-2.578
Inflamação		
110382	<i>C8b</i>	-1.704
16177	<i>Il1r1</i>	-1.785
65099	<i>Irak1bp1</i>	-1.785
Transporte		
68267	<i>Slc25a22</i>	-1.608
20531	<i>Slc34a2</i>	-2.069

Ritmos biológico		
18143	<i>Npas2</i>	-3.168
19215	<i>Ptgds</i>	-2.066
Metabolismo		
217700	<i>Acot6</i>	-2.074
Regulação da Cromatina		
83797	<i>Smarcd1</i>	-2.090
Outros		
117750	<i>Mt2</i>	-2.158

13. Anexo VI



CEEAA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp

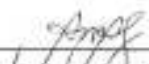
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1608-1, sobre "Efeitos do envelhecimento e do diabetes mellitus do tipo I sobre a estrutura da cromatina de hepatócitos de camundongos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello / Flávia Gerelli Ghiraldini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

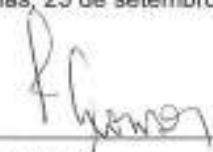
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1608-1, entitled "Aging and diabetes mellitus type I effect on mouse hepatocyte chromatin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

