



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP,

CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica
submetido para avaliação no Edital:
04/2022

Título do projeto: Análise dos níveis de H3K27me3 e balanço da maquinaria de metilação através das unidades catalíticas EZH2 e KDM6B após lesão medular por contusão em ratos

Palavras-chave do projeto: Neurodegeneração, Lesão medular, EZH2, KDM6B

Área do conhecimento do projeto: Neurobiologia

SUMÁRIO

RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3. MÉTODOS	5
3.1 Manipulação dos animais	5
3.2 Cirurgia de lesão medular por compressão	6
3.3 Avaliação dos níveis das proteínas H3K27, EZH2 e KDM6B através de WB	6
3.4 Níveis de H3K27, EZH2 e KDM6B por IF após a lesão medular	7
3.5 Contagem manual de células e análise da intensidade de pixel	7
4. CRONOGRAMA	8
5. DESCRIÇÃO DE VIABILIDADE DO PROJETO	8
6. REFERÊNCIAS	8

RESUMO

A lesão medular é um dano causado na medula espinhal, sendo a lesão dividida em primária e secundária. A primária é o trauma que causa a lesão, já a secundária é a cascata de eventos moleculares que ocorrem em resposta à primária. Esses eventos estão relacionados a processos epigenéticos, como a regulação da expressão gênica coordenada por modificações na cromatina. O estudo desses processos nos permite desenvolver soluções clínicas para a recuperação da lesão. A trimetilação das histonas H3K27 é realizada pelo potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e está relacionada ao silenciamento transcricional e à interrupção da expressão gênica. Já a demetilase lisina específica 6B (KDM6B) desmetila a H3K27 e é importante na resposta celular a estresses ambientais. Assim, o objetivo deste estudo é verificar os níveis de H3K27, EZH2 e KDM6B durante a lesão medular usando técnicas de imunofluorescência (IF) e western blotting (WB). Além disso, será feita a análise da densidade de pixel pelo software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) e a análise estatística por meio de uma regressão linear entre os níveis de EZH2 e KDM6B.

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular consiste em um dano à medula espinhal. A lesão pode ser tanto proveniente de um trauma mecânico como de acidentes automobilísticos, armas de fogo ou até mesmo de quedas. Além disso, o traumatismo raquimedular também pode ser um evento resultante não traumático, como os gerados por crescimento de diferentes tipos de cânceres, processo infecciosos ou até mesmo osteoartrite [1]. Fisiopatologicamente, a lesão medular pode ser dividida em primária e secundária. A primária é o evento mecânico propriamente dito na medula espinhal, que promove a destruição de circuitos neurais presentes. Já a secundária, é desencadeada por diversas cascatas inflamatórias que acontecem depois da lesão primária, causando danos químicos aos tecidos espinhais e agravando os primeiros eventos mecânicos [2][3]. Ao longo dos últimos anos, diversos desses processos secundários já foram descritos dependentes de modificações transcricionais não relacionadas a mutações gênicas. Esse processo é conhecido como epigenética.

Epigenética, como mencionado, refere-se à regulação da expressão gênica, coordenada por modificações na cromatina, alteração da estrutura e da acessibilidade física do DNA e não codificação de RNAs, tudo isso sem a transformação da sequência do DNA [4][5]. A regulação gênica possui um papel importante em múltiplos processos patológicos e fisiológicos no sistema nervoso central, incluindo a lesão medular. Tendo isso em vista, decodificar os controles regulatórios dessas alterações, assim como descrever suas correlações tem se demonstrado um promissor campo de estudo para desenvolver soluções clínicas para a recuperação da lesão [2].

Dentre diversas alterações epigenéticas já descritas envolvidas em respostas inflamatórias, de dano ou regeneração tecidual, as modificações associadas a trimetilação da lisina 27 na histona H3 tem se mostrado um importante regulador celular e molecular frente a lesões mecânicas, infecciosas e desenvolvimento tumorais [6][7].

A metilação de H3 em K27 está associada ao silenciamento transcricional e, consequentemente, a interrupção da expressão gênica [8]. Esse processo vem sendo descrito como dependente de diversas interações de proteínas e em especial o balanço entre metilases e demetilases. Canonicamente, o complexo repressor do grupo Polycomb (PcG) é o responsável por estimular a trimetilação da H3K27, causando a alteração da configuração do estado da heterocromatina e repressão transcricional transitória. Já em contra partida, o KDM6B, um metilase da família proteica com domínio UTX/ UTH jmJC desempenha o papel oposto, sendo capaz de desmetilar os resíduos da histona H3.

De maneira breve, o PcG se divide em: complexo repressivo polycomb 1 (PRC1) e o complexo repressivo polycomb 2 (PRC2). O PRC2 catalisa a H3K27me3, dando início ao silenciamento de gene. O H3K27me3 é o responsável por acionar o PRC1, que participa da compactação dos estados da cromatina [9].

O potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2), uma histona metiltransferase H3K27-específica e uma subunidade do PRC2 [10], atua no silenciamento gênico e tem bastante importância no controle da diferenciação e proliferação celular. Altos níveis de H3K27 trimetilada e EZH2 geram a diferenciação de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos [11].

Enquanto a demetilase de lisina específica 6B (KDM6B) regula muitos genes envolvidos na diferenciação, proliferação, senescência e apoptose e, por isso, ela é importante na resposta celular a estresses ambientais [12][13][14], apesar de desempenharem papéis opostos no controle da assinatura epigenética da histona H3. [15].

Desse modo, o objetivo deste estudo é investigar os níveis de H3K27, EZH2 e KDM6B durante a lesão medular, em diferentes janelas temporais agudas, tendo com o objetivo entender a regulação da metilação da H3K27 para proposta de novos tratamentos para a lesão medular.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar os padrões da metilação da H3K27 e de sua principal maquinaria de manutenção após lesão medular visando esclarecer relações entre as suas principais unidades enzimáticas (EZH2 e KDM6B).

2.2 Específicos

- I. Avaliar a distribuição tecidual da histona 3 lisina 27 trimetilada (H3K27me3) após lesão medular por meio das técnicas de imunofluorescência (IF) e Western Blotting (WB). Para isso, animais serão submetidos a lesão medular por compressão. Após 24h e 72h serão anestesiados e eutanasiados por perfusão ou decapitação respectivamente e suas medulas coletadas nos respectivos tampões.
- II. Avaliar o nível e a distribuição tecidual do potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) após lesão medular por meio das técnicas de imunofluorescência (IF) e Western Blotting (WB). Para isso, animais serão submetidos a lesão medular por compressão. Após 24h e 72h serão anestesiados e eutanasiados por perfusão ou decapitação respectivamente e suas medulas coletadas nos respectivos tampões.
- III. Avaliar o nível e a distribuição tecidual da demetilase de lisina específica 6B (KDM6B) após lesão medular por meio das técnicas de imunofluorescência (IF) e Western Blotting (WB). Para isso, animais serão submetidos a lesão medular por compressão. Após 24h e 72h serão anestesiados e eutanasiados por perfusão ou decapitação respectivamente e suas medulas coletadas nos respectivos tampões.

3. MÉTODOS

3.1 Manipulação dos animais

Neste trabalho, serão utilizados 26 ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 60 dias de vida pós-natal (P60). Os animais serão submetidos à eutanásia para a obtenção de amostras para a análise por imunofluorescência e western blotting. Serão utilizadas abordagens em diferentes janelas temporais: (i) eventos agudos - 24 horas após a injúria: utilização de métodos de biologia celular como IF (N=5) e WB (N=8) para avaliar o nível de H3K27, EZH2 e KDM6B na lesão; (ii) eventos de fase intermediária - 72 horas após a injúria: utilização de IF e WB para avaliar o nível de H3K27, EZH2 e KDM6B na lesão. Em ambas janelas temporais, os animais serão comparados aos animais controle que serão submetidos a lesão medular. Todos os animais serão mantidos em ciclo de claro-escuro (12:12h) assim como água e comida *ad libitum*.

3.2 Cirurgia de lesão medular por compressão

Uma hora após a cirurgia, será administrado cloridrato de tramadol (5,0 mg/kg) via intramuscular. A seguir, será utilizada uma caixa de acrílico onde os animais serão anestesiados com isoflurano (3 - 4 vol. %) em 100% de oxigênio. Após sedação parcial, uma máscara será colocada de modo a cobrir todo o focinho do animal, levando a um plano anestésico mais profundo (1.5 - 2.0 vol. %) em 100% de oxigênio. Somente neste momento é realizada a tricotomia e a limpeza da região dorsal para a incisão cirúrgica. Abre-se a pele com uma lâmina de bisturi e uma tesoura, para afastar a região subcutânea. É feito um corte de cada lado da coluna na fáscia dos músculos intercostais com o bisturi. Um afastador cirúrgico é utilizado para abrir os músculos e acessar a vértebra T8, onde é realizada a laminectomia e compressão da medula espinhal utilizando-se o dispositivo NYU Impactor com carga de 10g em queda livre a uma altura de 12.55 mm. Os músculos e a pele próximos à área de compressão são suturados separadamente, e o isoflurano é desligado. O oxigênio, por sua vez, é mantido até a recuperação do animal. Glicose para auxiliar na recuperação do animal e Pentabiótico serão administrados via intramuscular (5 mg/kg) como tratamento antibiótico por quatro dias. A mesma dose de cloridrato de tramadol será aplicada de oito em oito horas por quatro dias. Após a cirurgia, as bexigas dos animais se tornam neurogênicas, de modo que será realizada uma massagem para esvaziamento da bexiga duas vezes ao dia por quatro dias até a recuperação do seu funcionamento. (CEUA: 2066300916)

3.3 Avaliação dos níveis das proteínas H3K27, EZH2 e KDM6B através de WB

Os segmentos da medula espinal de T6 a T10 serão dissecados, lavados com tampão fosfato-salino (PBS), e homogeneizados no tampão RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% de desoxicolato de sódio, 1% triton X-100, e inibidores de protease). Os homogenatos serão centrifugados por 20 min a 14,000 g e 4°C para a remoção de materiais insolúveis, e a concentração proteica será determinada utilizando-se o método BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, catalog #23225), com soro bovino de albumina como padrão pelas especificações do fabricante. As proteínas nas preparações de membrana serão separadas utilizando-se o gel de eletroforese dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE; 10% gel) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Os blots serão incubados com leite desnatado 5% em

tampão TBST por duas horas à temperatura ambiente para bloquear a ligação inespecífica de anticorpos. Depois de lavar os blots com TBST, eles serão incubados de um dia para o outro com anticorpos primários específicos de marcadores proteicos de histona trimetilada H3 lisina 27 (H3K27me3), potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e demetilase de lisina específica 6B (KDM6B), diluídos em TBST/ leite desnatado a 3%. Após a incubação com os anticorpos primários, os blots serão lavados com TBST e incubados com goat anti-rabbit peroxidase (ECLTM kit; Amersham, Buckinghamshire, England) por 2h à temperatura ambiente. Para controle interno, será utilizada beta-tubulina (ab78078, ABCAM). A detecção das proteínas rotuladas será feita por meio do sistema quimioluminescente melhorado (ECLTM kit, Amersham). As densidades ópticas das bandas serão determinadas utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.4 Níveis de H3K27, EZH2 e KDM6B por IF após a lesão medular

Segmentos das medulas espinhais torácicas serão fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,3 por 8 horas (Schmittgen, Zakrajsek et al. 2000, Cao, Pfaff et al. 2007) e submetidos à crioproteção em diluições seriadas de sacarose (10%, 20% e 30%) a 4°C. Após serem embebidos em composto O.C.T., serão cortados no plano coronal (12 µm) em criostato. Os cortes serão incubados de um dia para o outro (overnight) com os seguintes anticorpos primários em solução contendo soro normal de cabra 5% e Triton X-100 0,3% diluídos em PBS em temperatura ambiente: anticorpos de histona trimetilada H3 lisina 27 (H3K27me3), potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e demetilase de lisina específica 6B (KDM6B). Após lavagem com PB 0,1M, os cortes serão incubados com anticorpo secundário acoplado a compostos fluorescentes (Alexa 488) na diluição 1:500. As lâminas serão marcadas com 4'-6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) para detecção dos núcleos (diluição 1:60000), também diluído em Triton X-100 0,3%/PB 0,1M por duas horas em temperatura ambiente. Finalmente será feita uma lavagem com PB 0,1M e as lâminas serão fechadas com meio de montagem e lamínula para visualização em microscópio de fluorescência.

3.5 Contagem manual de células e análise da intensidade de pixel

A contagem manual de células e análise da intensidade de pixel serão realizadas com o auxílio do *software* ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Trata-se de um *software* de código aberto e domínio público voltado para o processamento de imagens [16]. Diversas *toolboxes* disponíveis permitem a execução das mais diferentes funções, como a *Multi-point tool*, voltada para a contagem manual de partículas [16,17]. Serão consideradas células positivas as marcações restantes após a subtração do limiar e com disposições perinucleares com a marcação do núcleo (DAPI). Cinco campos diferentes de cada imagem serão analisados e a mediana dos valores obtidos, considerados. Em seguida, os dados serão plotados no Microsoft Excel® para uma análise estatística da correlação entre os níveis de EZH2 e KDM6B, através de uma regressão linear.

4. CRONOGRAMA

2022/2023	Quadrimestre 1	Quadrimestre 2	Quadrimestre 3
Revisão bibliográfica sobre lesão medular e regulações epigenéticas	X		
Padronização dos anticorpos (H3k27me3, EZH2 e KDM6b)	X		
Cirurgias e obtenção de amostras de medula espinhal 24h e 72h	X		
Redação relatório parcial		X	
Ensaio de Western blotting - 24h e 72h		X	
Ensaio imunofluorescência - 24h e 72h		X	
Redação relatório final			X

5. DESCRIÇÃO DE VIABILIDADE DO PROJETO

O laboratório no qual o projeto pretende ser realizado conta com estrutura consolidada para realização de análises protéicas, sejam elas através de níveis totais, utilizando-se a técnica de *western blotting*, ou em relação à distribuição subcelular e tecidual, por meio das técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica. Ademais, o projeto possui aproximação e complementaridade com projetos de pós-graduação financiados pela FAPESP. Com isso, consideramos o projeto viável e bem auxiliado quanto à sua realização.

6. REFERÊNCIAS

1. Venkatesh, K., et al. (2019). "Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications." Cell Tissue Res **377**(2): 125-151.
2. Zhang, B. Y., et al. (2020). "Decoding epigenetic codes: new frontiers in exploring recovery from spinal cord injury." Neural Regen Res **15**(9): 1613-1622.
3. Anjum, A., et al. (2020). "Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular

Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms." Int J Mol Sci **21**(20).

4. Carson, W. F., et al. (2011). "Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression." Epigenetics **6**(3): 273-283.
5. Liberman, N., et al. (2019). "Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms." Curr Opin Neurobiol **59**: 189-206.
6. Marsolier, J., et al. (2022). "H3K27me3 conditions chemotolerance in triple-negative breast cancer." Nat Genet **54**(4): 459-468.
7. Behling, F., et al. (2021). "H3K27me3 loss indicates an increased risk of recurrence in the Tübingen meningioma cohort." Neuro Oncol **23**(8): 1273-1281.
8. Li, Y., et al. (2020). "EZH2-mediated H3K27me3 inhibits ACE2 expression." Biochem Biophys Res Commun **526**(4): 947-952.
9. Murao, N., et al. (2016). "Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult." Neuroepigenetics **5**: 1-10.
10. Yan, J., et al. (2016). "EZH2 phosphorylation by JAK3 mediates a switch to noncanonical function in natural killer/T-cell lymphoma." Blood **128**(7): 948-958.
11. Yadav, R. and H. R. Weng (2017). "EZH2 regulates spinal neuroinflammation in rats with neuropathic pain." Neuroscience **349**: 106-117.
12. Lagunas-Rangel, F. A. (2021). "KDM6B (JMJD3) and its dual role in cancer." Biochimie **184**: 63-71.
13. Cao, Z., et al. (2021). "KDM6B is an androgen regulated gene and plays oncogenic roles by demethylating H3K27me3 at cyclin D1 promoter in prostate cancer." Cell death & disease **12**(1): 1-15.
14. Wang, P., et al. (2020). "Histone Demethylase JMJD3 Mediated Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Suppressing SESN2 Expression." Front Cell Dev Biol **8**: 548605.
15. McLaughlin-Drubin, M. E., et al. (2011). "Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 2130-2135.
16. Grishagin, I. V. (2015). "Automatic cell counting with ImageJ." Analytical biochemistry **473**: 63-65.
17. Ferreira, T. and W. Rasband (2012). "ImageJ user guide." ImageJ/Fiji **1**: 155-161.