

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

HENRIQUE FERREIRA RODRIGUES

O AVANÇO DA IDADE INDUZ ALTERAÇÕES NA ORGANIZAÇÃO DA
CROMATINA E NA PLOIDIA DE NEURÔNIOS CORTICais DE
CAMUNDONGOS

Uberlândia

2013

HENRIQUE FERREIRA RODRIGUES

O AVANÇO DA IDADE INDUZ ALTERAÇÕES NA ORGANIZAÇÃO DA
CROMATINA E NA PLOIDIA DE NEURÔNIOS CORTICAIS DE
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Uberlândia

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Alberto da Silva Moraes, por me orientar, direcionar e aconselhar durante estes anos de trabalho, por todos os seus ensinamentos que pode compartilhar, por contribuir para a minha formação e me ajudar tanto dentro quanto fora do laboratório.

À professora Maria Luiza Silveira Mello, por participar da banca de defesa, pelo fornecimento de vários reagentes e materiais essenciais e por contribuir com seus conhecimentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Emílio Beletti, por participar da banca de defesa e pelas suas inestimáveis contribuições.

Ao professor Tiago Wilson Patriarca Mineo, por fornecer animais para obtenção de material de pesquisa e contribuir com os experimentos em citometria de fluxo.

À Taísa Carrijo de Oliveira Camargos, por ajudar no fornecimento e sacrifício dos animais para experimentação.

Aos técnicos Ana Cláudia Pajuaba e Robson José de Oliveira Júnior, por auxiliarem durante a citometria de fluxo.

À Flávia Gerelli Ghiraldini, por realizar os experimentos com a MNase.

Ao professor Foued Salmen Espíndola, por disponibilizar seu laboratório e seus equipamentos.

À técnica Renata Roland Teixeira, por ajudar no isolamento dos núcleos.

Ao meu colega de trabalho e amigo Tafarel Andrade de Souza, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos técnicos do laboratório de histologia e biologia celular da Universidade Federal de Uberlândia, por manterem e preservarem o ambiente do laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, por disponibilizar sua infraestrutura para o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, pela bolsa e às agências de fomento CNPq, FAPESP, FAPEMIG e PROPP-UFU, pelo auxílio relacionado à participação em eventos e à compra de reagentes.

A todos os meus amigos, por todo companheirismo e apoio.

À minha querida Daiane, por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e nos ruins, me incentivando e motivando, pelo seu amor e companheirismo.

À minha irmã Taís e a toda minha família, pelo seu carinho e apoio.

Aos meus amados pais, Eduardo e Regina, pela criação e educação que me forneceram, por todo seu amor, apoio e dedicação.

RESUMO

O envelhecimento é um processo inerente a todos os seres vivos e constitui um dos principais fatores de risco para várias doenças crônico-degenerativas. Ele se caracteriza por uma série de alterações celulares que levam ao comprometimento da função normal dos tecidos, com perda de sua capacidade regenerativa. Neste contexto, a organização estrutural da cromatina possui um papel central nos mecanismos envolvidos no envelhecimento, pois ela regula a expressão gênica, mecanismos de reparo de macromoléculas e a susceptibilidade do DNA a agentes genotóxicos. Mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA e modificações pós-traducionais de histonas são os principais reguladores da organização da cromatina. Estudos anteriores descrevem alterações na organização da cromatina com o envelhecimento. Dessa forma, o entendimento da associação entre estrutura cromatínica e envelhecimento é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida da população idosa e retardar ou evitar doenças crônicas relacionadas à idade, como câncer, mal de Alzheimer e outras. Nesse sentido, este trabalho objetivou avaliar as alterações estruturais e epigenéticas em núcleos de neurônios corticais de camundongos com o avanço da idade. Para tanto, núcleos isolados de neurônios foram submetidos à Reação de Feulgen seguida de análise de imagem para avaliação da organização da cromatina (analisada também por cinética de degradação com nuclease) e conteúdo de DNA (este último analisado também por citometria de fluxo), além de ensaios bioquímicos (SDS-PAGE e western blotting) para quantificação de marcadores epigenéticos. Os resultados indicam alterações significativas na organização da cromatina dos núcleos de neurônios com o avanço da idade, cujas fibras sofrem descompactação, além de aumento do marcador epigenético H3K9Ac, o qual está associado com cromatina descompactada. Adicionalmente, há indícios de que neurônios apresentam poliploidia, confirmando dados prévios da literatura e, semelhantemente ao que já foi relatado em estudos anteriores para fígado, essa poliploidia aumenta com a idade. Como o aumento da taxa de transcrição não é característico de células senis, o aumento na descompactação deve-se provavelmente a um aumento de instabilidade genômica e alteração da organização cromatínica de células em animais mais velhos.

Palavras-chave: Cromatina. Envelhecimento. Epigenética. Neurônios. Poliploidia.

ABSTRACT

Aging is a process inherent to all living beings and constitutes a major risk factor for several degenerative and chronic diseases. It is characterized by a series of cellular alterations which lead to impaired normal tissue function with loss of its regenerative capacity. In this context, chromatin organization plays a major role in the mechanisms of aging, because it regulates gene expression, repair of macromolecules, and accessibility of genotoxic agents to DNA. Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and histone post-translational modifications (PTMs) are the main regulators of chromatin structure. Previous studies have described alterations on chromatin organization and epigenetic marks along aging. Thus, the knowledge of the association between chromatin structure and aging is fundamental for the development of treatments that would increase life quality on the elderly population and delay or prevent the onset of several age-associated disorders, such as cancer, Alzheimer's disease and others. In this context, the objective of this work was to evaluate the structural and epigenetic alterations of nuclei of cortical neurons from mice with the advancing of age. To this end, isolated neuronal nuclei were Feulgen-stained, followed by image analysis to evaluate chromatin organization (analyzed also by enzymatic digestion kinetics with nuclease) and DNA content (analyzed also by flow cytometry), in addition to biochemical assays (SDS-PAGE and westernblotting) to quantify epigenetic marks. Results indicate significant alterations on chromatin organization of cortical neurons from mice with advancing age, whose fibers seem to undergo unpackaging, as well as increased levels of the epigenetic mark H3K9Ac, which is associated with unpackaged chromatin. Additionally, there is evidence that neurons undergo polyploidy, according to previous data on hepatocytes, being this polyploidy increased with increasing age. Since increased transcriptional activity is not characteristic of aged cells, the decreased chromatin packaging state may be correlated with impaired genome stability, along with activation of repair mechanisms triggered by the accumulation of DNA damage during life span, which is characteristic of aged cells.

Key-words: Aging. Chromatin. Epigenetics. Neurons. Polyploidy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 – Protocolo para isolamento dos núcleos de neurônios	19
Tabela 1 – Valores de Feulgen-DNA por grupo de idade	24
Tabela 2 – Percentual de neurônios diploides e tetraploides por grupo de idade.....	24
Figura 2 – Distribuição dos valores Feulgen-DNA por grupo de idade.....	25
Figura 3 – Citometria de fluxo de neurônios corticais e de hepatócitos de camundongo	25
Tabela 3 – Parâmetros de análise de imagem dos núcleos corados após Reação de Feulgen por grupo de idade	26
Figura 4 – Imagens dos núcleos de neurônios corados com Feulgen	26
Figura 5 – Parâmetros de análise de imagem dos núcleos corados após Reação de Feulgen por grupo de idade	27
Figura 6 – Ensaio de acessibilidade da cromatina à digestão enzimática	28
Figura 7 – Quantificação dos marcadores epigenéticos H3K9me3 e H3K9Ac por grupo de idade	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Envelhecimento e senescência	9
1.2	Organização da cromatina.....	10
1.3	Epigenética.....	11
1.4	Alterações cromatínicas com o envelhecimento	13
2	JUSTIFICATIVA.....	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo geral.....	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	METODOLOGIA	18
4.1	Animais	18
4.2	Isolamento dos núcleos de neurônios.....	18
4.3	Citometria de fluxo	19
4.4	Citoquímica.....	20
4.5	Análise de imagem.....	20
4.6	Ensaio com MNase	21
4.7	SDS-PAGE e Westernblotting	22
4.8	Análise estatística.....	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Neurônios de camundongos apresentam poliploidia, a qual aumenta com a idade	24
5.2	A cromatina de neurônios sofre alterações estruturais com o avanço da idade	25
5.3	As alterações estruturais da cromatina estão associadas com alterações epigenéticas na histona H3	28
6	DISCUSSÃO	30
6.1	Poliploidia em neurônios e a influência da idade	30
6.2	A cromatina de neurônios descompacta com a idade	31
6.3	Possível redistribuição de marcadores epigenéticos no genoma com o envelhecimento	32
7	CONCLUSÃO	34
8	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento e senescência

O envelhecimento é um processo inerente aos seres vivos e representa um importante fator de risco para diversas doenças crônicas como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares e muitos tipos de câncer (FESER et al, 2010; HARRIES et al, 2011; SIKORA et al, 2011). No nível celular, ele se caracteriza por uma série de alterações bioquímicas e estruturais em diversas organelas, sendo o núcleo uma das mais afetadas. Estas alterações podem levar à perda das funções celulares, como por exemplo, sua capacidade proliferativa, com consequente interrupção do ciclo celular, o que caracteriza a senescência replicativa. O processo de senescência celular reflete-se no envelhecimento do organismo, pois pode levar a uma redução da capacidade regenerativa seguida de perda ou prejuízo das funções teciduais (DIMAURO e DAVID, 2009).

A perda de capacidade replicativa em humanos tem sido associada ao encurtamento dos telômeros. Durante cada ciclo de divisão, a célula perde parte dos telômeros, e na maioria das células somáticas a enzima responsável por sintetizá-los possui baixa ou nenhuma expressão e não consegue compensar o encurtamento gradativo após sucessivas divisões (DER et al, 2012; EPEL, 2012; PASSOS et al, 2009). Adicionalmente, o acúmulo de erros no DNA, causados pela exposição a agentes físico-químicos ou como consequência do metabolismo oxidativo durante toda a vida do indivíduo, também contribui para o seu envelhecimento, pois está relacionado com a redução, dependente da idade, da eficiência dos mecanismos de reparo celular (PEGORARO e MISTELI, 2009; SHIN et al, 2011).

De maneira geral, pode-se dizer que o envelhecimento é uma combinação de vários fatores inter-relacionados que levam a alterações na estrutura da cromatina, resultando em comprometimento do padrão normal de expressão gênica (DIMAURO e DAVID, 2009; SHIN et al, 2011). Alterações na estrutura da cromatina foram observadas em diversas síndromes progeróides importantes, como a síndrome de Hutchinson-Gilford, síndrome de Werner e ataxia telangiectasia (A-T). Durante o processo de envelhecimento estas alterações podem ser observadas também em células de indivíduos normais, confirmado a importância de se estudar a estrutura da cromatina, pois ela é um importante fator que regula a atividade gênica e pode, dessa forma, ter relação com alterações transcricionais observadas nas células com o avanço da idade (SEDIVY et al, 2008; SHIN et al, 2011).

1.2 Organização da cromatina

A cromatina está organizada em unidades estruturais chamadas nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por uma região central e uma região de DNA de ligação. A região central é formada por uma sequência de aproximadamente 145~147 pares de bases (pb) de DNA enrolados em um octâmero de proteínas básicas denominadas histonas. Cada octâmero é formado por pares das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (denominadas histonas canônicas), que possuem caudas flexíveis que podem interagir com outras proteínas estruturais, caudas dos nucleossomos vizinhos, assim como diversos fatores nucleares (LUGER et al, 2013; THAKUR, 1984). A região ligante ou DNA de ligação é formada por uma sequência de aproximadamente 10-80 pb, que pode estar associada a outras proteínas estruturais e conecta os núcleos octaméricos de nucleossomos vizinhos. O comprimento do DNA enrolado no octâmero de histonas sofre pouca variação, mas juntamente com o comprimento da região ligante, pode ser alterado de acordo com o grau de compactação do DNA (LUGER et al, 2013; THAKUR, 1984).

A sequência linear de nucleossomos constitui a fibra de 10 nm, que por sua vez, interagem entre si e com nucleossomos adjacentes, se dobrando e enovelando em uma conformação tridimensional formando estruturas secundárias, por exemplo, as fibras de 30 nm, que podem estar organizadas na forma de solenóides ou em zigue-zague. Estas fibras, por sua vez, se enovelam entre si formando níveis adicionais de organização da cromatina (LUGER et al, 2013).

Para que a transcrição ocorra, fatores de transcrição difusos no nucleoplasma devem interagir com as regiões promotoras dos genes. O grau de compactação e organização da cromatina está relacionado com a atividade genética, pois regula a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA (DI BERNARDO et al, 2012; GILBERT et al, 2004). Nesse sentido, os diferentes níveis de organização estrutural da cromatina proporcionam uma barreira para que os fatores de transcrição possam chegar até o DNA. Além disso, as diversas proteínas estruturais associadas à cromatina protegem ou competem com esses fatores pela ligação com os genes (LUGER et al, 2013).

No que diz respeito à compactação, dois tipos de arranjos cromatínicos podem ser discernidos, a heterocromatina e a eucromatina. A eucromatina é composta de fibras abertas, descondensadas e bem espaçadas entre si, devido à fraca interação entre nucleossomos adjacentes, facilitando a difusão e a interação da cromatina com fatores de transcrição, reparo ou replicação, sendo assim ela é relativamente rica em genes e ativa transcrecionalmente

(ELGIN e GREWAL, 2003). A heterocromatina, por outro lado, consiste de um arranjo nucleossômico regular denso composto de fibras bem compactadas, devido à ligação da cromatina com outras proteínas estruturais, como a HP1 (proteína formadora de heterocromatina do tipo 1). Este arranjo dificulta o acesso de nucleases e fatores de transcrição, sendo assim ela está relacionada principalmente com repressão gênica e se concentra principalmente em regiões de sequências repetitivas, intercaladas por um número relativamente pequeno de genes (GREWAL e MOAZED, 2003). Contudo, estas diferenças não são sempre tão claras, já que algumas regiões de heterocromatina possuem genes ativos e algumas regiões de eucromatina contêm genes inativos (FEDOROVA e ZINK, 2008; GILBERT et al, 2004).

A heterocromatina tem um papel importantíssimo na manutenção da estabilidade genômica, principalmente em regiões de sequências repetitivas, como centrômeros e telômeros (BERNARD et al, 2001; GREWAL e ELGIN, 2002; GUARENTE, 2000; HALL et al, 2003). Adicionalmente, a heterocromatina tem um papel central na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular (AVNER e HEARD, 2001; CAVALLI, 2002). Várias propriedades da heterocromatina a tornam particularmente adequada para processos que requerem uma manutenção estável de estados de expressão gênica por longos períodos. Primeiramente, o estado heterocromático é herdado epigeneticamente (ver item 1.3) e de maneira estável mesmo depois de muitas divisões celulares, as quais acontecem sob diferentes condições de desenvolvimento e influência ambiental. Segundo, o mecanismo de montagem da heterocromatina e o espalhamento desta a partir dos sítios de nucleação para as regiões adjacentes de DNA promovem uma transição de um controle genético relacionado a sequencia para um controle epigenético independente da sequencia do DNA. Embora diversos estudos nas últimas décadas tenham estabelecido as propriedades básicas da cromatina e tenham identificado muitos dos seus blocos estruturais, somente recentemente se começou a entender como esses domínios de DNA, os quais compreendem praticamente metade de todo o DNA genômico em alguns eucariotos, são organizados e epigeneticamente regulados.

1.3 Epigenética

Visto que a organização estrutural da cromatina depende também da interação do DNA com diversas proteínas nucleares, mudanças epigenéticas constituem outra forma de regulação da expressão gênica, além daquela já bem conhecida dependente de fatores de

transcrição e reconhecimento de promotores. Os principais mecanismos epigenéticos incluem as metilações de DNA, os pequenos RNAs de interferência não-codificantes e modificações pós-traducionais (MPTs) de histonas, que alteram as interações moleculares destas com a fita de DNA e, consequentemente, o estado de compactação e acessibilidade desta (DI BERNARDO et al, 2012; HUIDOBRO et al, 2012). Em se tratando de histonas, estas modificações ocorrem principalmente nos resíduos de lisina e arginina dos domínios das caudas N-terminais, que se estendem para fora do núcleo octamérico e interagem com nucleossomos vizinhos e outras proteínas estruturais (KOUZARIDES, 2007).

Existem 8 tipos principais de modificações de histonas: metilação, acetilação, fosforilação, glicosilação, ubiquitilação, ADP-ribosilação, sumoilação, deaminação e isomerização de prolina (DI BERNARDO et al, 2012). As histonas podem ser modificadas de várias formas em diferentes resíduos de aminoácidos, sendo que uma mesma modificação pode produzir efeitos opostos dependendo do resíduo de aminoácido onde está presente. Por exemplo, a metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me) está associada com ativação gênica, enquanto que a metilação da mesma histona na lisina 9 (H3K9me) está relacionada à repressão gênica. Modificações pós-traducionais de histonas podem agir de diferentes maneiras, regulando a interação do DNA com histonas e outras proteínas estruturais não-histônicas ou regular a atividade de proteínas efetoras (KOUZARIDES, 2007; BERGER, 2007; GIBNEY e NOLAN, 2010).

Esta regulação da interação DNA-proteína é acompanhada de uma reorganização da cromatina, com alteração do seu estado de compactação. A quantidade de combinações possíveis de modificações de histonas em uma mesma célula é enorme e o efeito conjunto de todas essas modificações determina seu fenótipo, levando a que se proponha um código de histonas. Cada tipo celular possui o seu código e cada célula pode alterar o seu código para alterar o seu metabolismo a fim de se adaptar a alterações fisiológicas ou mediante estímulo (EVERTTS et al, 2013; JENUWEIN e ALLIS, 2001).

Modificações epigenéticas específicas caracterizam a heterocromatina e a eucromatina. Sabe-se que a eucromatina está relacionada com hiperacetilação de histonas e metilação da lisina 4 na H3 (H3K4me), enquanto que a heterocromatina se caracteriza por hipoacetilação de histonas, metilação de DNA e metilação da lisina 9 na H3 (H3K9me). Esta última é importante para a ligação com proteínas formadoras de heterocromatina, como HP1. A H3K4me é particularmente importante na manutenção de áreas transcrionalmente ativas, pois impede a propagação da heterocromatina a partir de sítios de nucleação e impede a ligação do complexo de desacetilase e remodelação de nucleossomo (NuRD), um repressor de

transcrição (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011). O conjunto destas modificações mantém as diferenças estruturais entre os estados de eucromatina e heterocromatina, pois cada um destes marcadores epigenéticos possui especificidade para proteínas estruturais ou fatores de transcrição, reparo ou replicação diferentes (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011; ELGIN e GREWAL, 2003; GREWAL e MOAZED, 2003).

As modificações de histonas mais estudadas são as acetilações e as metilações. De maneira geral, considera-se que as acetilações estejam associadas à descompactação e ativação gênica, enquanto que as metilações estariam envolvidas tanto em ativação ou inativação, dependendo do resíduo de lisina modificada (HUIDOBRO et al, 2012; KOUZARIDES, 2007). Essas modificações são reguladas por enzimas nucleares, que incluem as acetil-transferases (HATs), metil-transferases (HMTs), desacetilases (HDACs) e desmetilases (HDMs) de histonas. A atividade e/ou expressão destas enzimas constantemente sofrem alterações, o que permite que a célula regule sua atividade para se adaptar a novas condições fisiológicas e funcionais (EVERTTS et al, 2013). Visto que estas modificações podem se acumular ao longo da vida de um indivíduo, acredita-se que elas estejam relacionadas com o processo de envelhecimento, porém não se sabe ao certo se tais modificações surgem como causa ou consequência (DEHGHANI et al, 2005; DIMAURO e DAVID, 2009; THAKUR, 1984).

1.4 Alterações cromatínicas com o envelhecimento

O processo de envelhecimento é acompanhado de diversas mudanças em nível molecular, que levam a uma redução da síntese de RNA *in vivo* e *in vitro*, redução da capacidade de reparo do DNA e redução da atividade da DNA polimerase (BERKOWITZ et al, 1983).

Estudos anteriores descrevem que a cromatina de animais de diferentes idades difere-se em parâmetros qualitativos e quantitativos, citando como exemplo, a proporção entre DNA, RNA, histonas e proteínas não-histônicas, e a estabilidade da dupla fita de DNA (BERKOWITZ et al, 1983; THAKUR, 1984). Por meio de curvas de hidrólise, foi descrito que a instabilidade do DNA aumenta com a idade (MIYOSHI e FUKUDA, 1986).

Contudo, outros experimentos utilizando técnicas de digestão enzimática com nucleases descrevem aumento de compactação em núcleos de neurônios de camundongos idosos comparados a adultos, indicando aumento de estabilidade genômica (THAKUR, 1984;

THAKUR et al, 1999), diferindo de dados obtidos em hepatócitos, que indicam descompactação com a idade (GHIRALDINI et al, 2012; MORAES et al, 2007).

Em neurônios corticais de ratos há uma proporção maior entre DNA livre / DNA ligado a histonas em animais jovens quando comparados a animais idosos, o que pode ser explicado devido à alta capacidade metabólica do tecido nervoso em animais jovens. Durante o processo de senescência a atividade transcrecional reduz e o DNA se estabiliza tornando-se menos termolábil por meio da interação com proteínas, devido ao aumento da compactação (THAKUR, 1984).

Várias alterações epigenéticas, associadas com a idade, têm sido descritas em mamíferos, dentre as quais, as mais estudadas até o momento, são as acetilações e as metilações de histonas (HAN e BRUNET, 2012; KREILING et al, 2011). Em leveduras, *C. elegans* e *Drosophila*, as sirtuínas, classe de desacetilases de histonas associadas com a via de sinalização da insulina, promovem silenciamento gênico e estão relacionadas com aumento da longevidade nestas espécies (DI BERNARDO et al, 2012; HUIDOBRO et al, 2012; LONGO e KENNEDY, 2006; TISSENBAUM e GUARENTE, 2001). Os estados de metilação de histonas também sofrem alteração com o envelhecimento (NOTTKE et al, 2009). Foi descrito que a trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3), um marcador de formação de heterocromatina, aumenta com o envelhecimento (KREILING et al, 2011), o que, junto com a redução nos níveis de HATs, contribuem para o silenciamento gênico, característico do fenótipo de envelhecimento.

Padrões alterados de expressão gênica associados ao envelhecimento foram descritos para genes relacionados ao reparo celular, resposta ao estresse e reconhecimento de nutrientes, destacando a importância do metabolismo celular no processo de envelhecimento (KENYON, 2010), assim também como de genes para proteínas estruturais como a lamina A, ou a proteína *tau* associada a microtúbulos, ambas associadas a patologias importantes como a síndrome de Hutchinson-Gilford e o mal de Alzheimer, respectivamente (HARRIES et al, 2011). As razões pelas quais essas mudanças associadas à idade ocorrem permanecem obscuras, mas dado que a estrutura da cromatina regula a integridade genômica e a expressão gênica (BUSUTTIL et al, 2007), mudanças na estrutura da cromatina durante o envelhecimento possivelmente tenham um papel chave nesse processo e podem explicar, pelo menos em parte, as mudanças nas funções biológicas das células e um aumento da incidência de estados de doença com a idade (VILLEPONTEAU, 1997; MORAES et al, 2007; OBERDOERFFER e SINCLAIR, 2007).

Indivíduos com a Síndrome Progeróide de Hutchinson-Gilford (HGPS) exibem características de envelhecimento precoce tais como perda de cabelo, pouca mobilidade articular e doenças cardíacas que representam pelo menos uma parte dos problemas relacionados com a idade (HENNEKAM, 2006). Digno de nota, A HGPS é acompanhada de desestruturação da cromatina e da organização nuclear. Além do mais, as mudanças aceleradas na estrutura da cromatina que ocorrem nessa doença parcialmente mimetizam as mudanças que ocorrem normalmente em humanos, sugerindo uma relação causal entre estrutura alterada da cromatina e envelhecimento (SEDIVY et al, 2008; SHIN et al, 2011). De fato, estudos recentes em leveduras e em fibroblastos humanos mostraram que a cromatina é profundamente alterada durante o envelhecimento devido a uma diminuição do nível de proteínas histônicas e aumento de modificações de histonas (FESER e TYLER, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores descrevem que os processos de memória e plasticidade sináptica requerem a transcrição de genes específicos, cuja atividade está reduzida em modelos de perda de memória e durante o processo de envelhecimento (PENNER et al, 2010). Os mecanismos que levam à redução da expressão gênica ainda são desconhecidos, mas dado que a estrutura da cromatina regula os processos de transcrição, é possível que mudanças epigenéticas no sistema nervoso central possuam um papel chave no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e esquizofrenia (CHEUNG et al, 2010; KOSIK et al, 2012; PENNER et al, 2010).

A redução da capacidade cognitiva associada à idade está se tornando um problema cada vez mais comum, devido ao aumento da longevidade média da população. Sendo assim entender os mecanismos envolvidos neste processo se torna cada vez mais importante, o que poderá levar ao desenvolvimento, em longo prazo, de estratégias terapêuticas para prevenir ou retardar doenças relacionadas à idade e melhorar a qualidade de vida da população idosa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as diferenças na organização da cromatina de neurônios corticais de camundongos com o avanço da idade.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar alterações no conteúdo de DNA e poliploidia.
- Avaliar o grau de compactação da cromatina e seu padrão de distribuição.
- Avaliar se os marcadores epigenéticos H3K9Ac e H3K9me3 sofrem alterações com a idade.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, nas idades de 8 (grupo A), 19-29 (B) e 55-65 (C) semanas de idade.

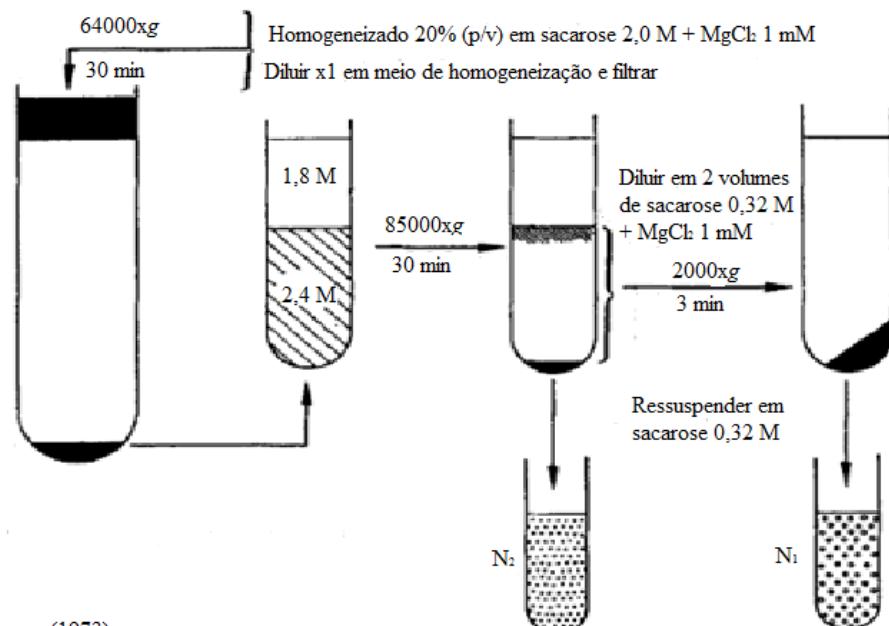
Os animais, adquiridos junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (Unicamp), foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da mesma universidade, sob condições normais, e alimentados *ad libitum* com ração extrusada até sacrifício. Após o sacrifício dos animais, as cabeças foram retiradas e congeladas a -20°C e transportadas até a Universidade Federal de Uberlândia, onde os cérebros foram dissecados e os córtices isolados, sendo estes armazenados a -20°C até o momento de uso.

Todos os experimentos envolvendo o cuidado e uso dos animais de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo nº 085/11).

4.2 Isolamento dos núcleos de neurônios

De acordo com o protocolo de Thompson (1973), modificado por Pearson e colaboradores (1983) (Figura 1), os córtices dos camundongos foram extraídos, cortados, reunidos de acordo com a idade dos animais, e homogeneizados em solução de sacarose 2 M, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 0,5%, PMSF 0,25 mM, na proporção de 10-20% peso/volume, utilizando-se um homogeneizador tipo Potter manual. Depois de homogeneizada, a mistura foi filtrada em uma camada de membrana de nylon (poro de 100 µm) ou musselina. A mistura foi centrifugada a 64.000xg por 30 min e o precipitado nuclear ressuspensos em sacarose 2,4 M, MgCl₂ 1 mM, PMSF 0,25 mM, solução sobre a qual foi colocada sacarose 1,8 M, MgCl₂ 1 mM, PMSF 0,25 mM, seguida de centrifugação a 85.000xg por 30 min, resultando em duas populações de núcleos, a população neuronal, na interface entre as duas soluções de sacarose, e a população glial no precipitado. A solução de sacarose 1,8 M foi descartada e a solução 2,4 M contendo os núcleos de neurônios na interface foi diluída em 2 volumes de solução de sacarose 0,32 M, MgCl₂ 1 mM, PMSF 0,25 mM. Os núcleos de neurônios foram então precipitados a 2000xg durante 3 min, e ressuspensos em sacarose 0,32 M, MgCl₂ 1 mM,

PMSF 0,25 mM e glicerol 30% e armazenados a -20 °C (PEARSON et al, 1983; THOMPSON, 1973).



Adaptado de Thompson (1973).

Figura 1: Protocolo para isolamento dos núcleos de neurônios. N₁, população neuronal; N₂, população glial.

4.3 Citometria de fluxo

Uma amostra de 100 µl (contendo aproximadamente 10^4 núcleos isolados de cada grupo de idade) foi diluída em PBS com Triton X-100 a 0,1% e 1 µg/ml de iodeto de propídeo. Os núcleos foram corados por 5 minutos e o excesso de iodeto de propídeo foi lavado em 2 etapas de centrifugação a 500xg e os núcleos ressuspensos em PBS. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e *software* FACSDiva, ou em citômetro Accuri C6 (BD Biosciences). A análise final dos parâmetros obtidos foi realizada no *software* FlowJo versão 10.1. Amostras não coradas de neurônios de cada idade e de hepatócitos foram utilizadas para padronização dos parâmetros de voltagem do aparelho, e hepatócitos de camundongos idosos foram usados como controle de ploidia.

4.4 Citoquímica

Os núcleos isolados foram aplicados em lâminas histológicas na forma de esfregaços, os quais foram posteriormente fixados em solução etanol-ácido acético na proporção 3:1 (v/v) durante 1 min, seguida de lavagem em etanol 70% por 5 min e secagem ao ar.

Depois de fixadas, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen para evidenciação de DNA. Para tanto, foram hidrolisadas em HCl 4 M a 25 °C durante 55 minutos. O tempo de hidrólise foi determinado previamente após curva de hidrólise.

Depois de hidrolisadas, as lâminas foram lavadas rapidamente em HCl 0,1 M gelado, coradas em reativo de Schiff por 45 min em câmara úmida e escura, e lavadas 3 vezes, 5 min cada vez, em água sulfurosa. Posteriormente foram lavadas com água, secas ao ar e montadas em bálsamo do Canadá.

Para os experimentos envolvendo análise de conteúdo de DNA e ploidia, foram também preparados esfregaços de núcleos isolados de hepatócitos de camundongo, os quais foram submetidos aos protocolos descritos acima.

4.5 Análise de imagem

Imagens dos núcleos corados após a Reação de Feulgen foram obtidas em um microscópio Leica DM500 equipado com objetiva planocromática 100/1,25, condensadora pré-focalizada e pré-centralizada, iluminação LED (3 W, temperatura de 6000 K), intensidade da iluminação mantida sempre ao máximo e o diafragma da condensadora rotacionado na posição 100x. As condições de iluminação foram mantidas constantes para todos os núcleos analisados. As imagens a serem processadas foram capturadas por uma câmera digital Leica ICC50 HD acoplada ao microscópio e *software* de captura Leica LAS EZ (versão 1.8.1, Leica Microsystems Limited – Suíça). As condições de captura foram as seguintes: tempo de exposição 6,8 ms, ganho 1,5x, gamma 2,00 e saturação 100,00. Sob as condições ópticas utilizadas, 1 μm corresponde a 15,9 pixels.

A análise das imagens capturadas foi realizada no software “*open source*” ImageJ, através do qual obteve-se informações relativas à área nuclear (μm^2), média dos níveis de cinza por núcleo (convertida posteriormente em densidade óptica, OD = absorbância) e densidade óptica integrada (IOD, que é o produto da integração da OD pela área nuclear, e representa o conteúdo Feulgen-DNA). A conversão dos níveis de cinza em absorbância foi feita através do uso da ferramenta “Optical Density Calibration” do ImageJ, com base na

barra de escala calibrada No. 3 da Kodak, de acordo com instruções obtidas no website do software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>).

Contraste e entropia são parâmetros de textura baseados em matrizes de correlação de escala de cinza (GLCM) (HARALICK et al, 1973). O contraste é uma medida da variação local de escala de cinza presente na imagem, e reflete a variação no estado médio de compactação da cromatina por núcleo. Quanto maior for a variação de compactação entre diferentes áreas nucleares, maior o contraste. A entropia quantifica o grau de desordem espacial dos diferentes níveis de cinza na GLCM e reflete a heterogeneidade do núcleo (áreas com diferentes graus de compactação).

Para a análise de imagem foram selecionados, de forma aleatória, aproximadamente 1000 núcleos por grupo de idade. A seleção dos núcleos a serem medidos foi automatizada no software com base na análise prévia de dados como absorbância do fundo (background) e eliminação por *threshold*, tamanho da partícula e circularidade, para eliminar gliócitos contaminantes ou fragmentos nucleares decorrentes do processo de purificação, assim como núcleos agregados.

Os núcleos de hepatócitos foram analisados somente com relação ao parâmetro IOD, para as análises de conteúdo de DNA e ploidia.

4.6 Ensaio com MNase

Para cada situação experimental, uma alíquota de aproximadamente 300 µg de DNA foi centrifugada a 800xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, contendo 65 mM KCl, 15 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂ e 250 µM PMSF.

Posteriormente foi adicionada 1 U/mg de DNA de nuclease microcócica (MNase). Esta concentração foi escolhida após padronização para hepatócitos de camundongos, levando-se em consideração que concentrações mais elevadas da enzima promovem clivagem total e indiscriminada do DNA.

O material foi coletado depois de 2, 7 e 10 min de tratamento com MNase à 25°C, sendo este interrompido com a adição de 0,025 M de EDTA e 0,01 M de EGTA por 15 min a 4°C (THAKUR et al, 1999).

Logo após o tratamento com MNase, os núcleos foram centrifugados a 800xg por 5 min e ressuspensos em tampão de extração Tris-HCl 10 mM, pH 8, contendo 1% SDS, e 10 mM EDTA. A amostra foi incubada por 30 min à 37°C. Posteriormente foi realizada extração

por clorofórmio por duas vezes. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 100% e 1/10 volume de acetato de sódio 1,3 M, pH 5,5 por 30 min à -20°C, sendo centrifugado à 10000 rpm a 4°C por 15 min (LU e RICHARDSON, 2004). O material foi então lavado em etanol 70% e deixado secar. Após eliminação de todo o resíduo de etanol, foi realizada a ressuspensão em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (Merck®, USA) previamente coradas com brometo de etídio, e em presença de um padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen®) a 2 V/cm em tampão TAE 1x. O gel foi fotografado em Transiluminador (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Sweden). As modificações do protocolo inicial foram realizadas por necessidade de adaptação da técnica ao material.

Os géis de agarose dos núcleos tratados com MNase foram analisados também no software ImageJ. O background foi subtraído da imagem para evitar interferências e gerado um histograma com a intensidade da fluorescência do brometo de etídio captada. A área dos picos foi determinada e sua proporção em relação à de todos os picos plotada para posterior análise. Degradações encontradas no controle, provenientes do processo de preparo das amostras e possível presença de endonucleases na solução estoque, foram subtraídas dos ensaios com a MNase para normalização, pois como os experimentos foram realizados na presença de excesso de cálcio, isso não influenciaria a análise final dos dados (CASTRO e SEVALL, 1980; VONHIPPEL e FELSENFELD, 1964). O Índice de Acessibilidade da Cromatina (IAC) foi determinado como a razão entre quantidade de DNA degradado “Cut” pela MNase e DNA não degradado “Uncut” (CRUICKSHANK et al, 2008), para cada grupo de idade. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 SDS-PAGE e Westernblotting

Núcleos de neurônios de camundongos dos grupos B e C foram ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,06 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, 2-mercaptoetanol 5%, pH 6,8, LAEMMLI, 1970), aquecidos a 95 °C por 5 min e submetidos a SDS-PAGE, com gel de separação a 15%. A corrida foi realizada em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) a 100 V no gel de empilhamento e a 150 V no gel de separação e deixada até a amostra correr aproximadamente 80% do gel. Em seguida as bandas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,025%, pH 8,3) durante 1:15 h a 100 V.

A eficiência de transferência foi avaliada através de coloração da membrana com Ponceau S e coloração dos géis em azul de Coomassie. O bloqueio da membrana foi feito em tampão Tris salino (TBS) com leite desnatado em pó a 4% e Triton X-100 0,1% por 1h, sob agitação.

Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-H3K9me3 ou anti-H3K9Ac de camundongo (MilliporeTM), diluídos na solução de bloqueio (1:1000) e incubadas por 12 h em geladeira e sob agitação constante.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos cada em TBST (tampão TBS + Triton X-100 0,1%), e depois incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (MilliporeTM) diluído em TBST (1:7500) durante 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada vez, em TBS.

As membranas foram incubadas por 1 min em solução de quimioluminescência (SuperSignal[®] West Pico Trial Kit, Thermo Scientific) e expostas a um filme fotográfico para quimioluminescência (GE Healthcare[®]). Os filmes foram revelados, escaneados e as bandas quantificadas no software ImageJ. Foram analisadas 4 membranas para cada marcador epigenético.

Como controle da quantidade de histona aplicada em cada amostra, as membranas foram em seguida incubadas com anticorpo primário de coelho anti-H4 não modificada de camundongo, e submetidas aos procedimentos acima descritos. As histonas do núcleo octamérico existem no núcleo em quantidades equimolares e, portanto, para evitar sobreposição de sinal da histona modificada e da histona não modificada, foi utilizada como controle a histona H4 e não a H3 não modificada.

4.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software MinitabTM 14. ANOVA de uma via foi o teste de escolha, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Neurônios de camundongos apresentam poliploidia, a qual aumenta com a idade

Núcleos isolados de neurônios corticais dos três grupos de idade foram espalhados em lâminas histológicas na forma de esfregaços e corados após Reação de Feulgen. A análise do conteúdo de DNA dos núcleos corados revelou aumento desse conteúdo com o avanço da idade (Tabela 1). Também foram analisados hepatócitos de camundongo como controle de poliploidia, submetidos à mesma metodologia. De acordo com a Figura 2, os histogramas da distribuição de valores Feulgen-DNA deixam claro que a grande maioria dos neurônios corticais corresponde a células diploides (2C). É possível, entretanto, observar que valores Feulgen-DNA correspondentes aos núcleos tetraploides (4C) existem em neurônios, assim como existem em hepatócitos, sendo que a frequência de aparecimento de tais núcleos aumenta conforme os animais envelhecem, sendo praticamente inexistente nos animais mais jovens. Para confirmar os resultados obtidos *in situ*, núcleos isolados de neurônios foram também analisados em citometria de fluxo, após coloração com iodeto de propídeo. A citometria de fluxo (Figura 3) confirmou, com mais precisão, dado que o tamanho de amostra analisada é 10 vezes maior que as análises *in situ*, a presença de núcleos tetraploides em neurônios de todas as idades, havendo, novamente, aumento da frequência de tais núcleos nos animais mais velhos (Tabela 2).

Tabela 1. Valores Feulgen-DNA por grupo de idade.

Grupo	n	x	s
A	838	13,9a	±1,47
B	862	14,7b	±2,14
C	936	15,1c	±1,99
D	758	17,1d	±9,23

n, número de núcleos analisados, x, média aritmética; s, desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2. Percentual médio de núcleos diploides e tetraploides em populações neuronais de camundongos.

Grupo	2C (%)	4C (%)	4C/2C
A	61,4	17,6	0,29*
B	58,9	21,4	0,36
C	61,5	22,8	0,37*

2C, diploides; 4C, tetraploides. %, percentual frente ao total de núcleos da população. * representa diferença estatística entre os dois grupos marcados ($p < 0,05$).

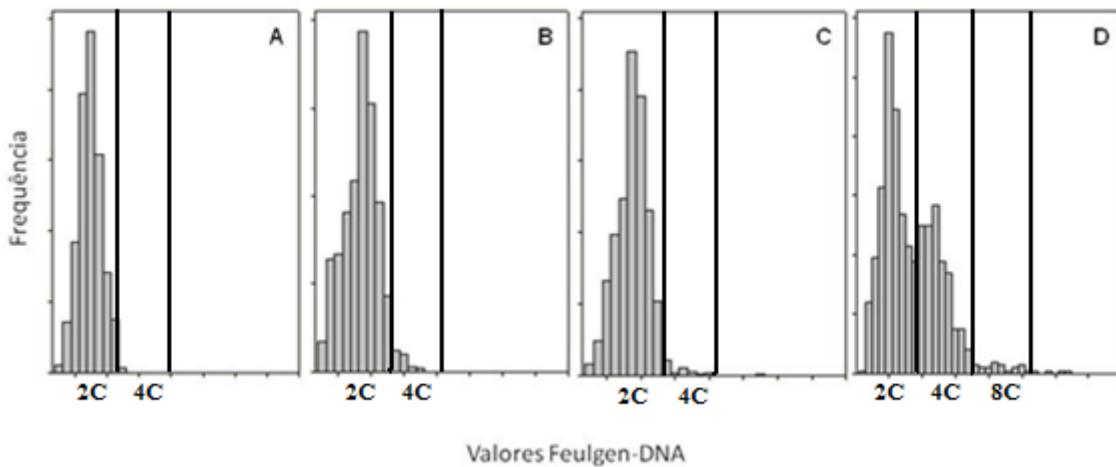


Figura 2: Distribuição dos valores Feulgen-DNA de neurônios corticais de 8 (A), 19-29 (B) e 55-65 (C) semanas de idade, e de hepatócitos (D) de camundongos. 2C, população diploide; 4C, população tetraploide; 8C, população octoploide. Linhas verticais delimitam os picos de ploidia.

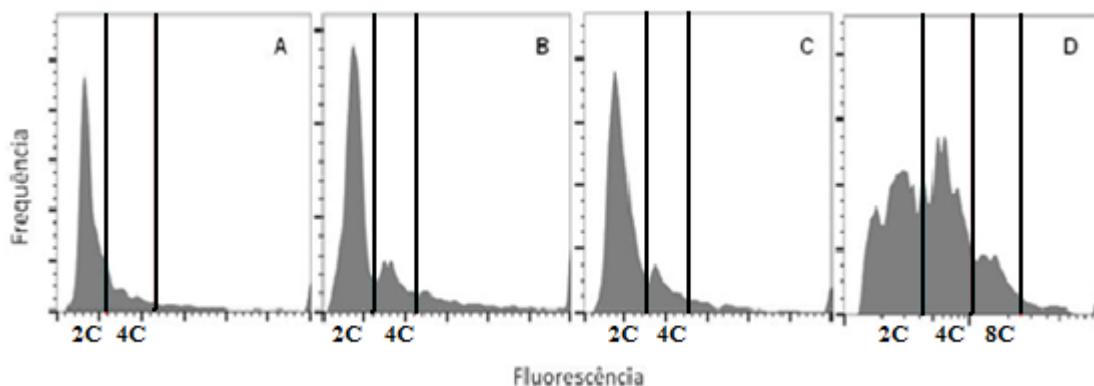


Figura 3: Citometria de fluxo dos núcleos corados com iodeto de propídeo de neurônios corticais de 8 (A), 19-29 (B) e 55-65 (C) semanas de idade, e de hepatócitos (D) de camundongos idosos. 2C, população diploide; 4C, população tetraploide; 8C, população octoploide. Linhas verticais delimitam os diferentes picos de ploidia.

5.2 A cromatina de neurônios sofre alterações estruturais com o avanço da idade

Análise de imagem dos núcleos corados após Reação de Feulgen (Figura 4) indicou diferenças significativas na organização da cromatina de neurônios de camundongos com o avanço da idade (Tabela 3 e Figura 5). À medida que o animal envelhece, os núcleos tendem a aumentar de tamanho e a cromatina tende a descompactar, o que se reflete no aumento da área nuclear e na redução das absorbâncias médias por núcleo (ODs). Os aumentos dependentes da idade observados no conteúdo Feulgen-DNA (IOD) estão relacionados com o aumento da população poliploide, como já descrito anteriormente.

A análise textural revelou uma redução no contraste com o avanço da idade, não sendo significativa entre os grupos A e B. Este resultado, junto com a redução da densidade óptica

média dos núcleos, indica que as regiões de cromatina normalmente mais condensadas em núcleos de neurônios estão se descondensando com a idade, o que corrobora com dados anteriores da literatura (SEDIVY et al, 2008; VILLEPONTEAU, 1997). Além disso, a redução na entropia nos núcleos do grupo C indica que a cromatina de neurônios de camundongos está se reorganizando com o avanço da idade.

Tabela 3: Parâmetros da análise de imagem dos núcleos após a Reação de Feulgen.

Grupo	n	Área nuclear (μm^2)		OD		IOD		Contraste		Entropia	
		x	s	x	s	x	s	x	s	x	s
A	893	44,84	$\pm 15,95$	0,36	$\pm 0,09$	14,71	$\pm 1,19$	21,6	$\pm 19,9$	7,22	$\pm 0,22$
B	667	55,60	$\pm 22,35$	0,31	$\pm 0,08$	15,54	$\pm 1,52$	21,9	$\pm 18,3$	7,19	$\pm 0,28$
C	864	61,94	$\pm 20,20$	0,27	$\pm 0,07$	15,79	$\pm 1,34$	16,2	$\pm 15,3$	7,04	$\pm 0,28$

n, número de núcleos analisados; x, média aritmética; s, desvio padrão; OD, densidade óptica; IOD, densidade óptica integrada.

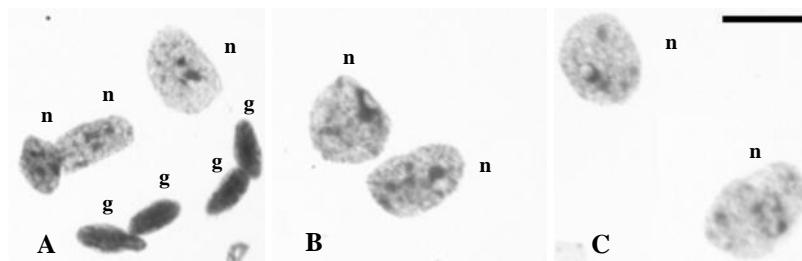


Figura 4: Imagens dos núcleos de neurônios corticais de camundongos corados com a reação de Feulgen convertidos em escala de cinza dos grupos de idade A, B e C, representados pelas imagens A, B e C respectivamente. n; núcleos de neurônios, g; núcleos de gliócitos. A barra equivale a 10 μm .

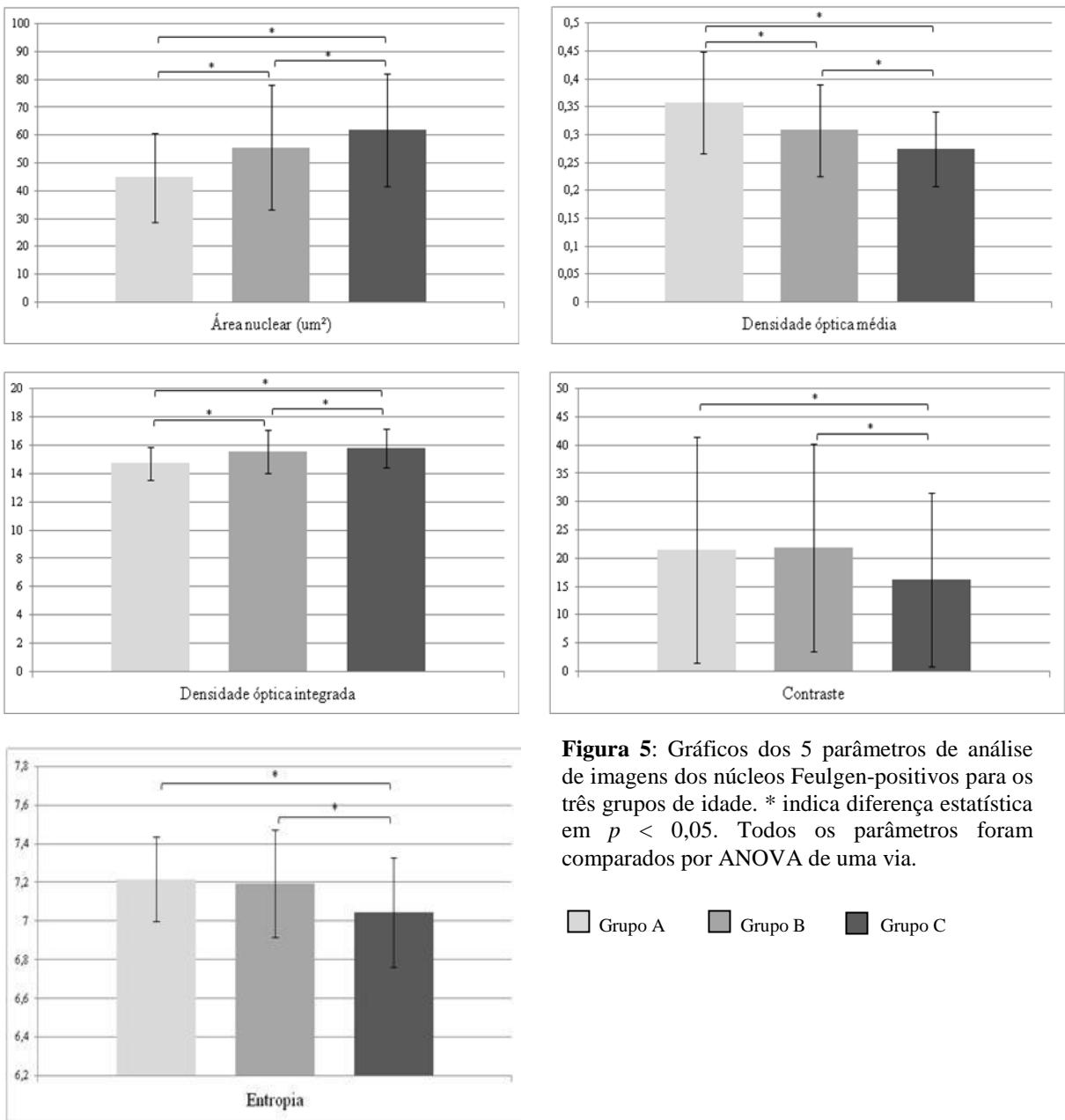


Figura 5: Gráficos dos 5 parâmetros de análise de imagens dos núcleos Feulgen-positivos para os três grupos de idade. * indica diferença estatística em $p < 0,05$. Todos os parâmetros foram comparados por ANOVA de uma via.

■ Grupo A ■ Grupo B ■ Grupo C

De forma a confirmar os dados morfométricos, núcleos isolados de neurônios dos três grupos de idade foram submetidos à degradação enzimática controlada com nuclease microcócica (MNase), após a qual foi calculado o índice de acessibilidade da cromatina (IAC). Este índice é um parâmetro que está diretamente relacionado ao grau de compactação da cromatina, no sentido de que, quanto mais compactado está o DNA, menos a enzima consegue penetrá-lo e, portanto degradá-lo (THAKUR, 1984; THAKUR et al, 1999).

Como mostrado na Figura 6, o IAC aumenta consideravelmente nos animais mais velhos, o que reflete uma cromatina mais descompactada nesses animais, corroborando os dados morfométricos obtidos após análise de imagem.

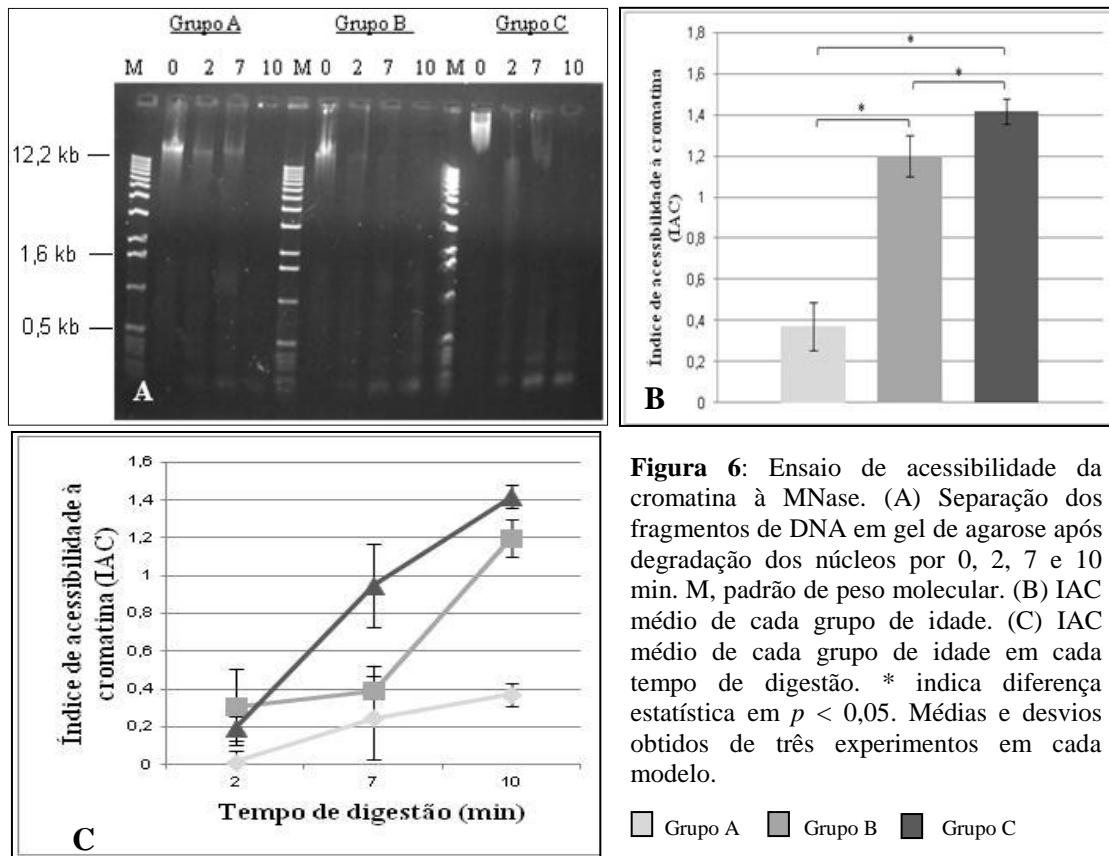


Figura 6: Ensaio de acessibilidade da cromatina à MNase. (A) Separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose após degradação dos núcleos por 0, 2, 7 e 10 min. M, padrão de peso molecular. (B) IAC médio de cada grupo de idade. (C) IAC médio de cada grupo de idade em cada tempo de digestão. * indica diferença estatística em $p < 0,05$. Médias e desvios obtidos de três experimentos em cada modelo.

5.3 As alterações estruturais da cromatina estão associadas com alterações epigenéticas na histona H3

Regiões de heterocromatina constitutiva são caracterizadas pela trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) enquanto que regiões de cromatina descompactada e ativa são caracterizados por acetilação do mesmo resíduo (H3K9Ac). Para tanto, núcleos isolados de neurônios corticais foram analisados por SDS-PAGE, seguido de *western blotting* para os marcadores mencionados. Os resultados apresentados na Figura 7 deixam claro que o marcador relacionado à descompactação e ativação gênica H3K9Ac está aumentado com a idade, dando suporte aos resultados de análise de imagem e digestão enzimática, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no marcador relacionado à formação de heterocromatina e silenciamento gênico H3K9me3, apesar da tendência de aumento desse marcador nos animais mais velhos.

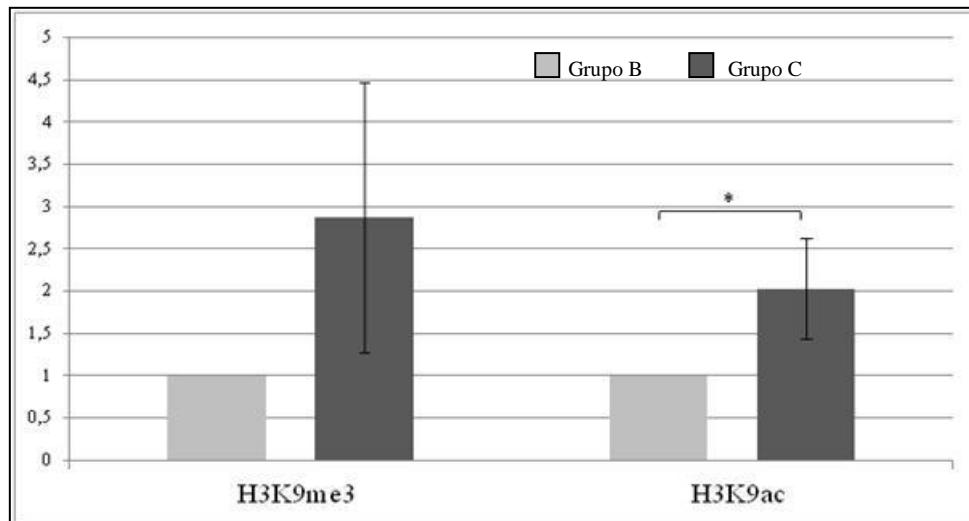


Figura 7: Quantificação dos marcadores epigenéticos H3K9me3 e H3K9Ac em núcleos dos animais dos grupos B e C. A média de cada marcador no grupo C foi normalizada para um valor padrão de 1 unidade na média do grupo B. * indica diferença significativa em $p < 0,05$. Barras representam as médias obtidas de quatro experimentos, cada modelo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Poliploidia em neurônios e a influência da idade

Todas as células de um organismo possuem uma série de mecanismos de reparo e controle do ciclo celular, cuja função é assegurar que cada célula possa funcionar corretamente e se replicar em duas células idênticas. Estes mecanismos, portanto, regulam a replicação correta do material genético, assegurando que cada cromossomo seja replicado uma vez e que cada célula filha receba uma cópia deste cromossomo, de modo que o genoma tende a ser conservado e que todas as células de um mesmo organismo possuam quantidades iguais de DNA. Existem, contudo, estudos que indicam a ocorrência de aneuploidias e poliploidias em alguns tipos celulares, onde o conteúdo de DNA pode aumentar 16 vezes ou mais em alguns casos, o mais caracterizado deles sendo o hepatócito (GHIRALDINI et al, 2012; GUPTA, 2000; MORAES et al, 2005; 2007; ROSZELL et al, 1978; URYVVAEVA, 1981). Neurônios são células pós-mitóticas e, portanto, seu ciclo celular está interrompido em G0. Entretanto, estudos anteriores descreveram variações na quantidade de DNA em neurônios, na forma de poliploidia (BREGNARD et al, 1975; LAPHAM, 1968) ou de aneuploidias (ARENDELT et al, 2009; FAGGIOLI et al, 2011; PACK et al, 2005). Rehen e colaboradores (2001) mostraram que aproximadamente um terço das células precursoras neurais sofrem aneuploidia, sendo a maioria (cerca de 90%) eliminada por apoptose antes da vida adulta. Já foi descrito que a ocorrência de aneuploidia em neurônios parece estar relacionada a patologias importantes como o mal de Alzheimer e alguns tumores cerebrais (ARENDELT et al, 2009; MOSCH et al, 2007). O aumento da incidência de neurônios hiperplóides com a idade parece também estar relacionado com menor viabilidade celular e maior susceptibilidade desses neurônios à morte celular em pacientes com Mal de Alzheimer (ARENDELT et al, 2010).

As implicações fisiológicas desta aneuploidia ainda são pouco conhecidas, mas acredita-se que, com o aumento da idade, há aumento de instabilidade genômica. É possível que tal efeito esteja associado com a descompactação da cromatina, também observada neste estudo, e pode afetar a expressão gênica e a sobrevivência da população neuronal (ARENDELT et al, 2010; KAUSHAL et al, 2003), levando a apoptose neuronal, o que poderia ter grande impacto no funcionamento normal do tecido.

Contrariamente, alguns estudos descrevem a população de células aneuplóides no cérebro como funcionalmente ativas e importantes para o funcionamento correto do sistema

nervoso central (KINGSBURY et al, 2005; PACK et al, 2005). É possível também que o conteúdo aumentado de DNA contribua para atender a demanda transcrecional da célula, aumentando a produção metabólica para compensar o aumento da quantidade de moléculas danificadas não-funcionais ou até mesmo surgir como um mecanismo de proteção a mutações ou estresse oxidativo, visto que o DNA ou genes “em excesso” funcionariam como uma garantia, caso a cópia original fosse danificada (GHIRALDINI et al, 2012; GUIDOTTI et al, 2003; URYVAEVA, 1981). De fato, estudos recentes em hepatócitos descrevem aumento no conteúdo Feulgen-DNA (poliploidia) em camundongos diabéticos (GHIRALDINI et al, 2012). Nesta situação o estresse oxidativo está aumentado, evidenciando uma possível correlação positiva entre poliploidia e estresse oxidativo nestas células.

6.2 A cromatina de neurônios descompacta com a idade

Os resultados indicam que a cromatina dos núcleos de neurônios corticais de camundongos assume uma configuração mais aberta à medida que os animais envelhecem, principalmente em regiões que em animais mais jovens são mais compactas. Esses resultados corroboram com dados anteriores, mostrando que o envelhecimento é acompanhado de redução das áreas heterocromáticas em alguns modelos experimentais (BURGESS et al, 2012; SEDIVY et al, 2008; TSURUMI e LI, 2012; VILLEPONTEAU, 1997).

Tal descompactação é, à princípio intrigante, por dois motivos: 1, tal fenômeno geralmente está relacionado com aumento da expressão gênica (LI et al, 2007), o que não costuma ser o caso de células senis; e 2, a formação de focos heterocromáticos associados ao envelhecimento (SAHFs) que é uma característica típica de células senescentes (SEDIVY et al, 2008).

No primeiro caso, temos como contraponto que não necessariamente a acetilação de histonas leva à transcrição gênica. De fato, para alguns genes, o efeito é exatamente o contrário (ELLIS et al, 2008), o que demonstra claramente que a acetilação de histonas pode não ser um previsor preciso de expressão gênica. Sendo assim, o aumento de H3K9Ac em neurônios ao longo do envelhecimento, apesar de estar relacionado com alterações estruturais importantes, não necessariamente significa ativação gênica global.

No segundo caso, acreditamos que o aparecimento de SAHFs não necessariamente elimina a possibilidade de uma descompactação global da cromatina. Como proposto por Sedivy e col. (2008) o que há durante o processo de envelhecimento celular é uma redistribuição da heterocromatina, argumento com o qual concordamos e para o qual

apresentamos evidência (alterações nos valores entrópicos dos núcleos). Dessa forma, um modelo que embase a perda de heterocromatina com o envelhecimento é bastante plausível (TSURUMI e LI, 2012). Somado a isso, temos motivo para acreditar que, mais do que uma alteração estrutural metabolicamente determinada, talvez estas alterações estejam relacionadas com aumento de instabilidade genômica, o que é uma característica de células senis (MIYOSHI e FUKUDA, 1986; OBERDOERFFER et al, 2008). Uma possível explicação para a redução na compactação seja a necessidade dessas células tornarem-se mais acessíveis a proteínas de reparo, o que seria plausível visto a quantidade de erros e defeitos que as células acumulam ao longo da vida. De fato, já foi descrito que o aumento de acetilação de histonas em células senis favorece a ação de mecanismos de reparo (DI BERNARDO et al, 2012). Não descartamos, contudo, que as alterações estruturais aqui descritas sejam uma mera consequência dos processos celulares associados ao envelhecimento do organismo.

6.3 Possível redistribuição de marcadores epigenéticos no genoma com o envelhecimento

Nossos resultados indicam aumento do marcador H3K9Ac com a idade em neurônios corticais de camundongo. Sabe-se que o marcador H3K9Ac está relacionado à descompactação nuclear e ativação gênica (BERGER, 2007; LI et al, 2007; STRAHL e ALLIS, 2000), estando este resultado, portanto, de acordo com as alterações estruturais da cromatina observadas com o aumento da idade. Os dados da literatura acerca desse assunto são ainda inconclusivos, dado que alguns estudos relatam diminuição de H3K9Ac com a idade (KAWAKAMI et al, 2009), enquanto outros relatam redução na atividade da SIRT1, uma desacetilase de histonas de mamíferos (CORBI et al, 2012; O'SULLIVAN e KARLSEDER, 2012), sem a qual os níveis de acetilação tendem a aumentar.

A não redução do marcador H3K9me3 com a idade é um dado inesperado. Sabe-se que esse marcador está relacionado à formação de heterocromatina e, especialmente, heterocromatina constitutiva (FISCHLE et al, 2005; LACHNER et al, 2001; LI et al, 2007; RICHARDS e ELGIN, 2002), e portanto possui função antagônica a H3K9Ac. Pelos dados de análise de imagem é impossível precisar quais áreas condensadas em animais mais jovens acabaram descondensando com a idade, áreas de heterocromatina pericentromérica (constitutiva) ou áreas de eucromatina condensada e silente (heterocromatina facultativa). Porém é possível que o motivo de não haver diferenças significativas na quantidade de H3K9me3 entre os grupos de idade seja porque a redução da compactação das regiões de heterocromatina com a idade seja de heterocromatina facultativa, pois sabe-se que H3K9me3

é um marcador específico de heterocromatina constitutiva, como as regiões de cromatina pericentromérica, sendo H3K27me o marcador de heterocromatina facultativa (DI BERNARDO et al, 2012).

Outra possível explicação para este resultado é que uma redistribuição dos marcadores epigenéticos esteja ocorrendo. Alguns trabalhos já descreveram que o mesmo marcador epigenético pode ter efeitos contrários dependendo se este está presente na região promotora ou no corpo do gene (LI et al, 2007; SHILATIFARD, 2006). Sendo assim, é possível que o marcador H3K9me3 esteja sofrendo uma redistribuição, se localizando em um ponto no genoma onde este favoreça a descompactação da cromatina e ativação gênica, o que estaria de acordo com os resultados anteriores. Porém, não é possível afirmar isso com precisão baseado na metodologia utilizada, portanto, mais experimentos devem ser realizados para podermos concluir quais regiões do genoma estão sofrendo alterações de marcadores específicos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho indicam uma reorganização estrutural da cromatina de neurônios corticais de camundongos com o avanço da idade, cujas fibras sofrem descompactação e alterações epigenéticas importantes associadas com cromatina descompactada. Além disso, o aumento da idade está associado com um aumento no conteúdo total de DNA, indicando uma poliploidia dependente da idade, que pode estar associada com as alterações estruturais aqui observadas.

8 REFERÊNCIAS

- ARENDT, T.; BRÜCKNER, M. K.; MOSCH, B.; LÖSCHE, A. Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 1, p. 15-20, julho 2010.
- ARENDT, T.; MOSCH, B.; MORAWSKI, M. Neuronal aneuploidy in health and disease: A cytomic approach to understand the molecular individuality of neurons. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1609-1627, abril 2009.
- AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: Counting, choice and initiation. **Nature Reviews: Genetics**, v. 2, n. 1, p. 59-67, janeiro 2001.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, março 2011.
- BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407-412, maio 2007.
- BERKOWITZ, E. M.; SANBORN, A. C.; VAUGHAN, D. W. Chromatin structure in neuronal and neuroglial cell nuclei as a function of age. **The Journal of Neurochemistry**, v. 41, n. 2, p. 516-523, agosto 1983.
- BERNARD, P.; MAURE, J. F.; PARTRIDGE, J. F.; GENIER, S.; JAVERZAT, J. P.; ALLSHIRE, R. C. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. **Science**, v. 294, n. 5551, p. 2539-2542, dezembro 2001.
- BREGNARD, A.; KNÜSEL, A.; KUENZLE, C. C. Are all the neuronal nuclei polyploid? **Histochemistry**, v. 43, n. 1, p. 59-61, 1975.
- BURGESS, R. C.; MISTELI, T.; OBERDOERFFER, P. DNA damage, chromatin and transcription: The trinity of aging. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 724-730, dezembro 2012.
- BUSUTTIL, R.; BAHAR, R.; VIJG, J. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1341-1347, abril 2007.
- CASTRO, C. E.; SEVALL, J. S. Alteration of higher order structure of rat liver chromatin by dietary composition. **The Journal of Nutrition**, v. 110, n. 1, p. 105-116, 1980.
- CAVALLI, G. Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 269-278, junho 2002.

CHEUNG, I.; SHULHA, H. P.; JIANG, Y.; MATEVOSSIAN, A.; WANG, J.; WENG, Z.; AKBARIAN, S. Developmental regulation and individual differences of neuronal H3K4me3 epigenomes in the prefrontal cortex. **PNAS**, v. 107, n. 19, p. 8824-8829, maio 2010.

CORBI, G.; CONTI, V.; SCAPAGNINI, G.; FILIPPELLI, A.; FERRARA, N. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 768-778, janeiro 2012.

CRUICKSHANK, M.; FENWICK, E.; ABRAHAM, L. J.; ULCIATI, D. Quantitative differences in chromatin accessibility across regulatory regions can be directly compared in distinct cell-types. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, n. 2, p. 349-355, março 2008.

DEHGHANI, H.; DELLAIRE, G.; BAZETT-JONES, D. P. Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. **Micron**, v. 36, n. 2, p. 95-108, 2005.

DER, G.; BATTY, G. D.; BENZEVAL, M.; DEARY, I. J.; GREEN, M. J.; MCGLYNN, L.; MCINTYRE, A.; ROBERTSON, T.; SHIELS, P. G. Is telomere length a biomarker for aging: Cross-sectional evidence from the west of Scotland? **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45166, setembro 2012.

DI BERNARDO, G.; CIPOLLARO, M.; GALDERISI, U. Chromatin modification and senescence. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 13, p. 1686-1693, 2012.

DIMAURO, T.; DAVID, G. Chromatin modifications: The driving force of senescence and aging? **Aging**, v. 1, n. 2, p. 182-190, fevereiro 2009.

ELGIN, S. C.; GREWAL, S. I. Heterochromatin: Silence is golden. **Current Biology**, v. 13, n. 23, p. R895-R898, dezembro 2003.

ELLIS, D. J. P.; LAWMAN, Z. K.; BONHAM, K. Histone acetylation is not an accurate predictor of gene expression following treatment with histone deacetylase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, n. 3, p. 656-662, março 2008.

EPEL, E. How “reversible” is telomeric aging? **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 10, p. 1163-1168, outubro 2012.

EVERTTS, A. G.; ZEE, B. M.; DIMAGGIO, P. A.; GONZALES-COPE, M.; COLLER, H. A.; GARCIA, B. A. Quantitative dynamics of the link between cellular metabolism and histone acetylation. **The Journal of Biological Chemistry**, doi: 10.1074/jbc.M112.428318, março 2013.

FAGGIOLI, F.; VIJG, J.; MONTAGNA, C. Chromosomal aneuploidy in the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 8-9, p. 429-436, agosto 2011.

FEDOROVA, E.; ZINK, D. Nuclear architecture and gene regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 11, p. 2174-2184, novembro 2008.

FESER, J.; TRUONG, D.; DAS, C.; CARSON, J. J.; KIEFT, J.; HARKNESS, T.; TYLER, J. K. Elevated histone expression promotes life span extension. **Molecular Cell**, v. 39, n. 5, p. 724-735, setembro 2010.

FESER, J. TYLER, J. Chromatin structure as a mediator of aging. **FEBS Letters**, v. 585, n. 13, p. 2041-2048, julho 2011.

FISCHLE, W.; TSENG, B. S.; DORMANN, H. L.; UEBERHEIDE, B. M.; GARCIA, B. A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; FUNABIKI, H.; ALLIS, D. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1116-1122, dezembro 2005.

GHIRALDINI, F. G.; SILVA, I. S.; MELLO, M. L. S. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice. **Cytometry A**, v. 81, n. 9, p. 755-764, setembro 2012.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4-13, julho 2010.

GILBERT, N.; BOYLE, S.; FIEGLER, H.; WOODFINE, K.; CARTER, N. P.; BICKMORE, W. A. Chromatin architecture of the human genome: Gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. **Cell**, v. 118, n. 5, p. 555-566, setembro 2004.

GREWAL, S. I.; ELGIN, S. C. Heterochromatin: New possibilities for the inheritance of structure. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 2, p. 178-187, abril 2002.

GREWAL, S. I.; MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 798-802, agosto 2003.

GUARENTE, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. **Genes & Development**, v. 14, n. 9, p. 1021-1026, maio 2000.

GUPTA, S. Hepatic polyploidy and liver growth control. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 3, p. 161-171, junho 2000.

GUIDOTTI, J. E.; BRÉGERIE, O.; ROBERT, A.; DEBEY, P.; BRECHOT, C.; DESDOUETS, C. Liver cell polyploidization: A pivotal role for binuclear hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19095-19101, maio 2003.

HALL, I. M.; NOMA, K.; GREWAL, S. I. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. **PNAS**, v. 100, n. 1, p. 193-198, janeiro 2003.

HAN, S.; BRUNET, A. Histone methylation marks its mark on longevity. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 1, p. 42-49, janeiro 2012.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAN, K.; DINSTEIN, I. Textural features for image classification. **IEEE Transact Syst Man Cybernet**, v. 3, p. 610-621, 1973.

HARRIES, L. W.; HERNANDEZ, D.; HENLEY, W.; WOOD, A.; HOLLY, A. C.; BRADLEY-SMITH, R. M.; YAGHOOTKAR, H.; DUTTA, A.; MURRAY, A.; FRAYLING, T. M.; GURALNICK, J. M.; BANDINELLI, S.; SINGLETON, A.; FERRUCCI, L.; MELZER, D. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. **Aging Cell**, v. 10, n. 5, p. 868-878, outubro 2011.

HENNEKAM, R. C. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. **American Journal of Medical Genetics: Part A**, v. 140, n. 23, p. 2603-2624, dezembro 2006.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Aging epigenetics: Causes and consequences. **Molecular Aspects of Medicine**, julho 2012.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, agosto 2001.

KAUSHAL, D.; CONTOS, J. J. A.; TREUNER, K.; YANG, A. H.; KINGSBURY, M. A.; REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; OKABE, M.; BARLOW, C.; CHUN, J. Alterations of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5599-5606, 2003.

KAWAKAMI, K.; NAKAMURA, A.; ISHIGAMI, A.; GOTO, S.; TAKAHASHI, R. Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. **Biogerontology**, v. 10, n. 4, p. 415-421, agosto 2009.

KENYON, C. J. The genetics of aging. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504-512, março 2010.

KINGSBURY, M. A.; FRIEDMAN, B.; MCCONNELL, M. J.; REHEN, S. K.; YANG, A. H.; KAUSHAL, D.; CHUN, J. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. **PNAS**, v. 102, n. 17, p. 6143-6147, abril 2005.

KOSIK, K. S.; RAPP, P. R.; RAZ, N.; SMALL, S. A.; SWEATT, J. D.; TSAI, L. H. Mechanisms of age-related cognitive change and targets for intervention: Epigenetics. **The Journals of Gerontology**, v. 67, n. 7, p. 741-746, junho 2012.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their functions. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, fevereiro 2007.

KREILING, J. A.; TAMAMORI-ADACHI, M.; SEXTON, A. N.; JEYAPALAN, J. C.; MUÑOZ-NAJAR, U.; PETERSON, A. L.; MANIVANNAN, J.; ROGERS, E. S.; PCHELIINTSEV, N. A.; ADAMS, P. D.; SEDIVY, J. M. Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. **Aging Cell**, v. 10, n. 2, p. 292-304, abril 2011.

LACHNER, M.; O'CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 116-120, março 2001.

LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, agosto 1970.

LAPHAM, L. W. Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. **Science**, v. 159, n. 3812, p. 310-312, janeiro 1968.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 707-719, fevereiro 2007.

LONGO, V. D.; KENNEDY, B. K. Sirtuins in aging and age-related disease. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 257-268, julho 2006.

LU, Q.; RICHARDSON, B. DNaseI hypersensitivity analysis of chromatin structure. **Methods in Molecular Biology**, v. 287, p. 77-86, 2004.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: An ordered state or a disordered affair? **Nature Reviews on Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 436-447, janeiro 2013.

MIYOSHI, N.; FUKUDA, M. Quantitative detection of DNA damage in the neuronal cells of the cerebellum and cerebrum by the analysis of Feulgen hydrolysis curves. **Histochemistry**, v. 84, n. 4-6, p. 561-565, 1986.

MORAES, A. S.; GUARALDO, A. M. A.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. **Cytometry part A**, v. 71, n. 1, p. 28-37, janeiro 2007.

MORAES, A. S.; VIDAL, B. C.; GUARALDO, A. M. A.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes following starvation and refeeding. **Cytometry part A**, v. 63, n. 2, p. 94-107, fevereiro 2005.

MOSCH, B.; MORAWSKI, M.; MITTAG, A.; LENZ, D.; TARNOK, A.; ARENDT, T. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6859-6867, junho 2007.

NOTTKE, A.; COLAIACOVO, M. P.; SHI, Y. Developmental roles of the histone lysine demethylases. **Development**, v. 136, n. 6, p. 879-889, março 2009.

O'SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. The great unraveling: Chromatin as a modulator of the aging process. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 11, p. 466-476, novembro 2012.

OBERDOERFFER, P.; MICHAN, S.; MCVAY, M.; MOSTOSLAVSKY, R.; VANN, J.; PARK, S. K.; HARTLERODE, A.; STEGMULLER, J.; HAFNER, A.; LOERCH, P.; WRIGHT, S. M.; MILLS, K. D.; BONNI, A.; YANKNER, B. A.; SCULLY, R.; PROLLA, T. A.; ALT, F. W.; SINCLAIR, D. A. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. **Cell**, v. 135, n. 5, p. 907-918, novembro 2008.

OBERDOERFFER, P.; SINCLAIR, D. A. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 692-702, setembro 2007.

PACK, S. D.; WEIL, R. J.; VORTMEYER, A. O.; ZENG, W.; LI, J.; OKAMOTO, H.; FURUTA, M.; PAK, E.; LUBENSKY, I. A.; OLDFIELD, E. H.; ZHUANG, Z. Individual adult human neurons display aneuploidy: Detection by fluorescence in situ hybridization and single neuron PCR. **Cell Cycle**, v. 4, n. 12, p. 1758-1760, dezembro 2005.

PASSOS, J. F.; SIMILLION, C.; HALLINAN, J.; WIPAT, A.; VON ZGLINICKI, T. Cellular senescence: Unravelling complexity. **Age**, v. 31, n. 4, p. 353-363, julho 2009.

PEARSON, E. C.; BUTLER, P. J. G.; THOMAS, G. O. Higher-order structure of nucleosome oligomers from short repeat chromatin. **The EMBO journal**, v. 2, n. 8, p. 1367-1372, 1983.

PEGORARO, G.; MISTELI, T. The central role of chromatin maintenance in aging. **Aging**, v. 1, n. 12, p. 1017-1022, dezembro 2009.

PENNER, M. R.; ROTH, T. L.; BARNES, C. A.; SWEATT, J. D. An epigenetic hypothesis of age-related cognitive dysfunction. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, n. 9, março 2010.

REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M. A.; YANG, A. H.; CHUN, J. Chromosomal variations in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **PNAS**, v. 98, n. 23, p. 13361-13366, 2001.

RICHARDS, E. J.; ELGIN, S. C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 489-500, fevereiro 2002.

- ROSZELL, J. A.; FREDI, J. L.; IRVING, C. C. The development of polyploidy in two classes of rat liver nuclei. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 519, n. 2, p. 306-316, julho 1978.
- SEDIVY, J. M.; BANUMATHY, G.; ADAMS, P. D. Aging by epigenetics – a consequence of chromatin damage? **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 9, p. 1909-1917, junho 2008.
- SHILATIFARD, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: Implications in the regulation of gene expression. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 243-269, 2006.
- SHIN, D. M.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Nuclear and chromatin reorganization during cell senescence and aging – a mini-review. **Gerontology**, v. 57, n. 1, p. 76-84, 2011.
- SIKORA, E.; ARENDT, T.; BENNETT, M.; NARITA, M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. **Aging Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 146-152, janeiro 2011.
- STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41-45, janeiro 2000.
- THAKUR, M. K. Age-related changes in the structure and function of chromatin: A review. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 27, n. 3, p. 263-286, outubro 1984.
- THAKUR, M. K.; ASAITHAMBI, A.; MUKHERJEE, S. Sex-specific alterations in chromatin conformation of the brain of aging mouse. **Molecular Biology Reports**, v. 26, n. 4, p. 239-247, dezembro 1999.
- THOMPSON, R. J. Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. **The Journal of Neurochemistry**, v. 21, n. 1, p. 19-40, julho 1973.
- TISSENBAUM, H. A.; GUARENTE, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 227-230, março 2001.
- TSURUMI, A.; LI, W. X. Global heterochromatin loss: A unifying theory of aging? **Epigenetics**, v. 7, n. 7, p. 680-688, julho 2012.
- URYVAEVA, I. V. Biological significance of liver cell polyploidy: An hypothesis. **The Journal of Theoretical Biology**, v. 89, n. 4, p. 557-571, abril 1981.
- VILLEPONTEAU, B. The heterochromatin loss model of aging. **Experimental Gerontology**, v. 32, n. 4/5, p. 383-394, 1997.
- VONHIPPEL, P. H.; FELSENFELD, G. Micrococcal nuclease as a probe of DNA conformation. **Biochemistry**, v. 3, p. 27-39, janeiro 1964.