

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
ESTRUTURAL APLICADAS**

**TAFAREL ANDRADE DE SOUZA**

**Efeitos da idade na glicosilação de histonas  
de núcleos de neurônios corticais de  
camundongos**

**Uberlândia  
2015**

TAFAREL ANDRADE DE SOUZA

# **Efeitos da idade na glicosilação de histonas de núcleos 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 à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

**Uberlândia  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S729e  
2015

Souza, Tafarel Andrade

Efeitos da idade na glicosilação de histonas de núcleos de neurônios  
corticais de camundongos / Tafarel Andrade Souza. - 2015.  
42 f.

Orientador: Alberto da Silva Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Glicoproteínas - Teses. 3. Cromatina - Teses.  
4. Neurônios - Teses. I. Moraes, Alberto da Silva. II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 581

---

TAFAREL ANDRADE DE SOUZA

# **Efeitos da idade na glicosilação de histonas de núcleos 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 à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

Uberlândia, 24 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos membros desta banca pela contribuição à qualidade deste trabalho.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, por me aceitar como aluno durante os últimos 5 anos, desde a Iniciação Científica na graduação, e agora no mestrado, pela sua excelente orientação, por ter confiado no meu trabalho, pelo ensino, incentivo e estímulo que foram fundamentais para o meu desenvolvimento, e também pela sua preocupação e compreensão nos momentos que precisei me ausentar. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalharmos juntos.*

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

*À Renata, à Flávia, e aos amigos de laboratório Igor, Isabella, Henrique e Moline, pela grande disponibilidade e ajuda na realização dos meus experimentos.*

*Aos técnicos do laboratório de Histologia, Ester, Fabrício e Mariani, pelo auxílio.*

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

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

*A todos os meus amigos da 3ª Turma de Biomedicina-UFU que mantiveram o companheirismo e apoio, me incentivando e motivando ao longo de toda essa jornada acadêmica, e fora dela também, pelas nossas conversas, risadas e encontros.*

*À minha mãe Eleusa, pelo amor incondicional, paciência e compreensão dedicados a mim. Por ser a minha força em todos os momentos. Ela é a minha inspiração de seguir em frente com meus sonhos.*

*Ao meu irmão e cunhada, Marcos e Érika, pela amizade e apoio.*

*Aos meus familiares, pela companhia, palavra e abraços que me trouxeram conforto.*

*Aos amigos de perto e de longe. Obrigado a vocês por estarem nos momentos felizes e tristes, me apoiando e me alimentando de certezas, carinho, força e alegria.*

*Muito obrigado nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do que recebi de cada um, pois nada disso seria possível sem vocês.*

## RESUMO

Diversas funções têm sido atribuídas à adição de radicais glicídicos em proteínas nucleares. Acredita-se que as mudanças estruturais e funcionais pelas quais passam os neurônios ao longo do envelhecimento estejam associadas com diferentes padrões de glicosilação protéica no núcleo dessas células. Estudos anteriores remetem que a glicosilação de proteínas nucleares, principalmente histonas, tem um importante papel epigenético no controle das funções nucleares. Nesse contexto, as alterações na estrutura da cromatina associadas com modificações epigenéticas tipo O-glicosilação dependem, por exemplo, do recrutamento de complexos de remodelamento da cromatina necessários à regulação da transcrição gênica, estando esse tipo de controle, ao longo do envelhecimento relacionado ao surgimento de doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer e outras. Dessa forma, entender a associação entre as mudanças da estrutura cromatínica devido à O-glicosilação de histonas e o envelhecimento é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida da população. Nesse sentido, este trabalho objetivou estudar a distribuição *in situ* de dois tipos de resíduos de açúcar ligados a proteínas, bem como se as histonas são glicosiladas e se há glicosilação diferencial dessas proteínas ao longo do envelhecimento em núcleos de neurônios corticais de camundongos. Para tanto, núcleos isolados de neurônios foram submetidos à análise citoquímica e ensaios bioquímicos para identificação e quantificação de marcadores glicídicos reativos às lectinas ConA e WGA. Os resultados demonstram que glicoproteínas contendo glicose/manose ou N-acetilglicosamina possuem diferenças no seu padrão de distribuição nuclear, que independem da idade do animal, evidenciando funções diferenciadas dependendo da composição glicídica dessas glicoproteínas. Adicionalmente, os dados indicam que todas as histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) são glicosiladas em neurônios, sendo que padrões diferenciados de marcação foram observados em cada uma delas para as diferentes idades. Acredita-se que tais alterações estejam relacionadas com as mudanças estruturais observadas na cromatina ao longo do envelhecimento, as quais podem ter um papel fundamental nos padrões alterados de expressão gênica observados com o avanço da idade.

**Palavras-chave:** cromatina, glicoproteína, histonas, lectina, neurônio, núcleo.

## ABSTRACT

Several functions have been attributed to the addition of glycidyl radicals in nuclear proteins. It is believed that the structural and functional changes through which they pass along the neurons of aging are associated with different patterns of protein glycosylation in the nucleus of these cells. Previous data refer that the glycosylation of nuclear proteins, mainly histones, plays an important role in epigenetic control of nuclear functions. In this context, the changes in chromatin structure epigenetic changes associates with type O-glycosylation depend, for example, the chromatin remodeling complex recruitment necessary for regulating gene transcription, with this type of control over the aging-related rise neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and others. Thus, to understand the association between changes in chromatin structure due to O-glycosylation of histones and aging is critical to the development of treatments that can improve the quality of life of the population. For this purpose, it propose to study the *in situ* distribution of two types of sugar residues attached to proteins, as well as histones are glycosylated and if there differential glycosylation of the proteins along with aging. To this end, isolated neuronal nuclei were underwent cytochemical analysis, and biochemical assays to identify and quantify reactive glycidyl markers to ConA and WGA lectins. Results indicate that glycoproteins containing glucose / mannose and N-acetylglucosamine have differences in their pattern of nuclear distribution, which depend on the animal age, indicating different functions depending on the composition glicidic of these glycoproteins. Our data show that all canonical (H2A, H2B, H3 e H4) in neurons are glycosylated, with different patterns are observed for each different ages. It is believed that these changes are related to structural changes in chromatin observed during the aging period, which may have a fundamental role in altered patterns of gene expression observed with increasing age.

**Keywords:** chromatin, glycoprotein, histones, lectin, neuron, nuclei.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Protocolo de isolamento de núcleos adaptado de Thompson (1973).....	21
<b>Figura 2.</b> Núcleos de neurônios corticais de fêmeas Balb/c corados com o método PAS e com as lectinas ConA e WGA .....	26
<b>Figura 3.</b> Quantificação de glicose/manose em histonas de núcleos de neurônios de camundongos jovens e idosos .....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**MPTs** – Modificação pós-traducionais

**HATs** – Acetiltransferases de histonas

**HDACs** – Desacetilases de histonas

**H3K9** – Lisina 9 da histona H3

**H3K27** – Lisina 27 da histona H3

**H4K20** – Lisina 20 da histona H4

**HMTs** – Metiltransferases de histonas

**HP1** – proteína de heterocromatina do tipo 1

**O-GlcNAc** – N-Acetil-O-Glicosamina

**Ser** – Serina

**Thr** – Treonina

**Con-A** – Lectina concanavalina A

**WGA-HRP** – Lectina de germe de trigo conjugada com peroxidase

**OGT** – O-GlcNAc transferase

**OGA** –  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase

**UDP-GlcNAc** – uridina 5'-difosfato-N-acetilglucosamina

**PAS** – Coloração Ácido Periódico de Schiff

**PMSF** - phenylmethylsulfonyl fluoride (inibidor de serino proteases)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Envelhecimento celular e modificações epigenéticas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Histonas .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Modificações epigenéticas em histonas e seu significado funcional .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Glicoproteínas nucleares.....</b>	<b>15</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Obejetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Animais .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Coleta de córtex cerebral .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Isolamento dos núcleos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Citoquímica .....</b>	<b>23</b>
4.4.1 Reação de PAS.....	24
4.4.2 Reação com lectina ConA.....	24
4.4.3 Reação com lectina de trigo WGA conjugada com peroxidase.....	25
4.4.4 Captura de imagens.....	25
<b>4.5 Bioquímica.....</b>	<b>26</b>
4.5.1 SDS-PAGE e Westernblotting.....	26
4.5.2 Detecção de glicoproteínas nas membranas de nitrocelulose .....	26
4.5.3 Identificação das glicoproteínas.....	27
4.5.4 Análise estatística .....	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Citoquímica .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Bioquímica.....</b>	<b>30</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Envelhecimento celular e modificações epigenéticas**

Durante muito tempo a teoria prevalente foi a de que o envelhecimento é uma consequência inevitável do uso continuado e do tempo, e atribuía-se isso a toxinas, radicais livres, radiação, doença e estresse que influenciavam o organismo a um ponto onde este não poderia mais ser reconstruído. Atualmente, sabe-se que processos genéticos controlados direcionam o envelhecimento (SHIN et al., 2010).

O processo de envelhecimento é causado por uma combinação de fatores inter-relacionados. De maneira geral, acredita-se que o envelhecimento celular esteja relacionado a modificações na estrutura da cromatina (DIMAURO e DAVID, 2009). Estas alterações podem ser resultado de mecanismos epigenéticos, que levam a alterações na expressão gênica, e consequentemente levam a uma desregulação da função normal da célula (SHIN et al., 2010).

Durante o processo de senescência celular, ocorrem várias alterações bioquímicas, levando à perda de suas funções e da sua capacidade proliferativa, com 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 e consequente perda de função tecidual (DIMAURO e DAVID, 2009). Sendo assim, o envelhecimento se caracteriza como um dos maiores fatores de risco para enfermidades humanas como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (FESER et al., 2010; SIKORA et al., 2010).

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, 2013; 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).

Alterações na estrutura da cromatina já foram observadas em diversas síndromes progeróides importantes, como a síndrome de Hutchinson-Gilford, síndrome de Werner e ataxia telangiectasia e em diversos tumores. Durante o processo de envelhecimento em

indivíduos saudáveis estas mesmas alterações celulares podem ser observadas, confirmando a importância de se estudar a estrutura da cromatina nesses processos, já que a mesma é um importante fator regulador da atividade gênica (SHIN et al., 2011). Além disso, há trabalhos na literatura indicando que alterações na estrutura da cromatina devido a modificações epigenéticas estão ligadas a doenças neurodegenerativas e alterações cognitivas, perda da memória, podendo levar até mesmo ao surgimento de síndromes como o mal de Alzheimer e a esquizofrenia (CHEUNG et al., 2000; PENNER et al., 2010). As proteínas nucleares estão sujeitas a um grande número de modificações, principalmente aquelas modificações pós-traducionais em proteínas-histônicas que resultam em alterações da expressão gênica ao longo do envelhecimento. Com base na importância das modificações pós-traducionais no envelhecimento, é nossa teoria de que a glicosilação de histonas pode ser considerada também um mecanismo epigenético de controle e, semelhante a outros marcadores epigenéticos que encontram-se alterados com a idade em neurônios, há motivos para acreditar que o padrão de glicosilação de histonas também se altere com a idade no mesmo tipo celular.

## 1.2 Histonas

A cromatina é um complexo formado por DNA e proteínas histônicas e não-histônicas que se encontra dentro do núcleo das células eucarióticas. Esse tipo de complexo formado pelo DNA está relacionado, principalmente, a funcionalidade do núcleo, pois regula a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA (DI BERNARDO et al, 2012; GILBERT et al, 2004). Tipicamente a cromatina contém cinco classes de histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4, que apresentam massa molecular entre 11 e 35 kDa. Cento e quarenta e seis pares de bases de DNA (1,75 voltas) enrolam-se num núcleo octamérico formado por duas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, formando uma partícula nucleossomal, a unidade repetitiva e estrutural básica da cromatina (KLUG et al., 1980). A interação de uma histona de ligação (H1) com o DNA entre duas partículas nucleossomais (DNA de ligação) aumenta o número de pares de bases para 165, o que corresponde a duas voltas (BEDNAR et al., 1998). Dessa forma, a adição da histona de ligação contribui para o aumento da condensação da cromatina (HORN e PETERSON, 2002). Um DNA de ligação curto, entre um nucleossomo e outro, também contribui para a compactação do DNA, enquanto um DNA de ligação longo, entre um nucleossomo e outro, produz efeito oposto. Assim, o nível primário da estrutura da cromatina é representado pela fibra de cromatina de 11nm, ou conformação “colar-de-contas”, que é um arranjo estendido de nucleossomos (WOODCOCK e DIMITROV, 2001). Daí

resulta que, todos os processos biológicos que requerem acessibilidade ao DNA genômico, tais como a replicação ou a transcrição, são dependentes das características precisas da cromatina nos eucariotos.

As histonas do núcleo octamérico (H2A, H2B, H3 e H4) são proteínas globulares, à exceção das suas caudas N-terminais, que possuem uma cadeia linear. Com uma alta proporção de lisinas e argininas, as histonas são fortemente básicas. Cada classe de histonas é suscetível a uma variedade de modificações pós-traducionais, principalmente nos domínios N-terminais (ex.: acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, sumoilação, ADP-ribosilação e/ou citrulinação) e, exceto pela histona H4, as classes de histonas possuem diversas variantes que diferem entre si nas suas sequências primárias de aminoácidos (BRADBURY, 1992; HANSEN 2002; ISENBERG, 1979; KOUZARIDES, 2007).

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). Com relação aos 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 transcricionalmente (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 talvez tirar (FEDOROVA e ZINK, 2008; GILBERT et al, 2004).

## **1.2 Modificações epigenéticas em histonas e seu significado funcional**

O termo epigenética tem origem do grego, onde “epi” significa “acima, perto, a seguir”, e estuda as mudanças nas funções dos genes, sem alterar as sequências de bases do

DNA. É definida como uma série de modificações do genoma que são herdadas pelas próximas gerações, mas que não alteram a sequência do DNA. Por muitos anos, considerou-se que os genes eram os únicos responsáveis por passar as características biológicas de uma geração à outra. Entretanto, esse conceito tem mudado e hoje os cientistas sabem que variações não-genéticas (ou epigenéticas) adquiridas durante a vida de um organismo podem frequentemente serem passadas aos seus descendentes. A herança epigenética depende de pequenas mudanças químicas no DNA e em proteínas associadas a este. Existem evidências científicas mostrando que hábitos da vida e o ambiente social em que uma pessoa está inserida podem modificar o funcionamento de seus genes (DI BERNARDO et al, 2012, HUIDOBRO et al, 2012).

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 (BÁRTOVÁ et al, 2008; DI BERNARDO et al, 2012; HUIDOBRO et al, 2012). Em se tratando de histonas, estas modificações pós-traducionais, ocorrem principalmente nos resíduos de lisina e arginina dos domínios das caudas N-terminais, que se estendem para fora do núcleo octaméricos e interagem com nucleossomos vizinhos e outras proteínas estruturais (KOUZARIDES, 2007).

Dentre os principais tipos de modificações de histonas, encontra-se: acetilação, metilação, fosforilação, ADPribosilação e ubiquitinação (DI BERNARDO et al, 2012). As histonas podem apresentar diferentes combinações, dando origem à hipótese do “código de histonas”. De acordo com esta hipótese, um conjunto de modificações dita um determinado resultado biológico. Neste sentido, as modificações pré-existent regulam a adição de modificações que servem como marcadores para o recrutamento de diferentes proteínas ou complexos proteicos para o nucleossomo. Através deste mecanismo, diversas atividades fisiológicas são reguladas, tais como a montagem e remodelação da cromatina (BERGER, 2002). Deste modo, o código de histonas influencia hierarquia estrutural da cromatina, afetando as interações entre diferentes histonas e entre histonas e DNA. As modificações específicas das histonas são responsáveis pela compartimentalização do genoma em domínios distintos, como a heterocromatina transcricionalmente silente e a eucromatina transcricionalmente ativada (MARTIN e ZHANG, 2005).

As histonas podem ser modificadas em muitos sítios, sendo mais de 60 resíduos diferentes de aminoácidos modificados que foram detectados por meio de anticorpos específicos ou por espectrometria de massa (KOUZARIDES, 2007).

O código de histonas da cromatina permite regular processos nucleares tais como replicação, transcrição, reparo de DNA e a condensação dos cromossomos. As marcações epigenéticas mais caracterizadas e conhecidas são a metilação do DNA e a acetilação e metilação de histonas (KOUZARIDES, 2007).

Um número crescente de estudos tende a demonstrar que o "Epigenoma" é capaz de integrar e transmitir informações de nutrientes através de gerações. Por exemplo, a ingestão do grupo metil através de uma dieta rica em folato e vitamina B12 para ratas grávidas, hipermetila o gene *Agouti*, que define a cor da pelagem dos filhotes, e influencia a sua expressão (COONEY et al., 2002). Tem sido demonstrado que camundongos jovens, que foram gerados a partir de mães desnutridas durante a gravidez, tiveram defeitos na metilação e na expressão do gene que codifica a leptina, um fator controlador da saciedade, levando a obesidade, e que esse fenótipo se manteve ao longo da idade (JOUSSE et al., 2011).

As trimetilações em H3K4, H3K36, ou H3K79 resultam em uma cromatina descondensada e, portanto, são características de eucromatina. A eucromatina também é caracterizada por um elevado nível de acetilação de histonas, que é mediada pelas acetiltransferases de histonas (HATs). Já as desacetilases de histonas (HDACs) têm a habilidade de remover esta marcação epigenética, o que leva a repressão da transcrição gênica. A heterocromatina condensada é enriquecida em trimetilações de H3K9, H3K27 e H4K20 (KOUZARIDES, 2007), sendo que esse silenciamento dos loci eucromatínicos é causado pelas desacetilases de histonas, e envolve o recrutamento de metiltransferases de histonas (HMTs). A H3K9 metilada, por exemplo, fornece um sítio de ligação no domínio de heterocromatina para as proteínas de heterocromatina do tipo 1 (HP1), que induzem a repressão transcricional e a heterocromatinização. Nos loci eucromáticos, este processo é mediado por co-repressores, tais como as proteínas retinoblastoma pRb ou KAP1 (NIELSEN et al, 2001).

Outras modificações como a fosforilação e ubiquitinação, não são tão intensamente estudadas (GRANT, 2001) embora, estas modificações tenham papel importante na transcrição, reparo de DNA, indução de apoptose, e condensação de cromossomos (CHEUNG, 2000). Por exemplo, a fosforilação da serina 10 na histona H3 está associada com a ativação transcricional em células de mamíferos (THOMSON, 1999) e a fosforilação da H2A tem papel importante na condensação dos cromossomos (GRANT, 2001).

Durante os últimos 5 anos, os dados acumulados de vários estudos revelam que a adição de N-Acetil-O-Glicosamina (O-GlcNAc) pode ser fundamental na remodelação da cromatina e na regulação da expressão gênica por fazer parte do "código de histonas"



(SAKABE et al.; 2010; SLAWSON e HART, 2011; XU et al., 2014). Estas observações revelam a importância e complexidade das modificações de histonas e seu papel nas funções nucleares e, consequentemente, nos processos celulares como um todo.

### 1.3 Glicoproteínas nucleares

Glicosilação é um termo genérico que é utilizado para definir a ligação covalente de carboidratos a proteínas. Contudo, este termo não reflete a enorme complexidade de diferentes tipos de modificações por açúcares observadas em biologia. Alterações na estrutura de carboidratos complexos de superfície celular são observadas em muitas doenças, e tem sido longamente associadas a etiologia do câncer e de doenças neurodegenerativas. Uma estimativa comumente citada sugere que mais de 50% de todas as proteínas são glicosiladas, mas mesmo essa estimativa pode ser menor que o real, já que não considera que muitas, senão a maioria, das proteínas nucleares e citoplasmáticas são dinamicamente modificadas pela ligação de  $\beta$ -D-N-acetilglicosamina (GlcNAc) ou glicose (Glc), aos radicais hidroxila de resíduos de serina ou treonina (HART e COPELLAND, 2010; TORRES e HART, 1984).

A GlcNAc, por exemplo, não é encontrada geralmente em oligossacarídeos de estruturas mais complexas, nem é encontrada na superfície celular ou matriz extracelular, à exceção dos proteoglicanos; dessa forma, a N-acetil-glicosilação O-ligada é um tipo de modificação intracelular. A maior parte das proteínas que recebem esse radical são proteínas solúveis citoplasmáticas ou nucleares, as quais são modificadas em resposta a estímulos celulares ou ambientais como fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras, fluxo de glicose e outros nutrientes, e estresse. Tais proteínas têm diversos papéis na sinalização celular, metabolismo, regulação da transcrição, controle do ciclo celular, tráfego de proteínas e regulação da estrutura celular (HART et al., 2007; CARRILLO et al., 2010).

A glicosilação é uma das mais abundantes modificações pós-traducionais em células eucariotas, pois se estima que 1-3% do genoma humano seja responsável pela codificação de enzimas que constroem e quebram complexos de carboidratos (HANOVER, 2012). Dentre as funções da glicosilação em uma célula, destacam-se: controlar o dobramento correto de proteínas, pois algumas proteínas não assumem estruturas corretas, a menos que estejam glicosiladas; conferir estabilidade, considerando que algumas proteínas não glicosiladas são degradadas mais rapidamente; permitir a adesão entre células como por exemplo, as glicoproteínas de membrana que estão diretamente envolvidas nas funções biológicas dos linfócitos; modular vias de sinalização intracelulares, tendo em vista que a glicosilação de

proteínas pode aumentar ou inibir a atividade de diversas proteínas sinalizadoras (VARKI et al., 2009; SPIRO 2002; TAYLOR et al., 2006).

Tem sido sugerido um envolvimento da O-glicosilação no processo de proliferação celular, e estudos mais recentes demonstram que proteínas que são modificadas reversivelmente por resíduos de O-GlcNAc, que ocorre pela adição de um grupamento de N-acetil-glicosamina no oxigênio da hidroxila de resíduos de serina (Ser) e Treonina (Thr), influenciam diretamente na função das proteínas *Polycomb* (PcG), que são um grupo de proteínas que contribuem para a manutenção da estrutura da cromatina, e que também interagem com toda a maquinaria de acetilação, metilação e ubiquitinação de histonas (HANOVER, 2010). Várias proteínas citoplasmáticas e nucleares, incluindo cinases, fosfatases, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, entre outras, são alvos da O-GlcNAc (HOLT et al., 1986; HART et al., 1989; WELLS et al., 2001, HART et al., 2007; FULOP et al., 2007).

Boa parte do que se sabe sobre a glicosilação de proteínas nucleares deve-se a estudos com lectinas. As lectinas são uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam, específica e reversivelmente, a carboidratos. Elas são sondas bastante úteis para detectar a presença de sacarídeos nas superfícies celulares, em componentes do interior da célula, e em glicoproteínas purificadas (HAWKES, 1982). Um exemplo de lectina com uma boa especificidade é a concanavalina A (Con-A), que se liga tanto a oligossacarídeos ricos em manose e glicose, quanto ao inositol (WASSEF et al., 1985). Existe clara evidência de que as histonas H1, H2A, H2B e H3 contêm resíduos de fucose e manose (LEVY- WILSON, 1983). Outro exemplo, de especificidade de lectina, é a lectina de gérmen de trigo (WGA), que se liga a ácido siálico e a N-acetilglicosamina (GOLDSTEIN et al., 1980).

Glicoproteínas ligantes à Con A foram também observadas *in situ* em núcleos de hepatócitos de camundongo (VIDAL et al. 1997), sendo que a quantidade detectável dessas proteínas está relacionada com o estado fisiológico desse tipo celular em condições normais ou patológicas (ex.: jejum, envelhecimento e diabetes) (MORAES et al., 2005; 2006; MELLO et al., 2009). Nesses achados não há, contudo, informações sobre a identidade das glicoproteínas detectadas e nem se as histonas somáticas fazem parte de seu universo.

Nos núcleos de hepatócitos de camundongos, glicoproteínas reativas à Con A podem ter um papel importante na formação da heterocromatina pericentromérica, já que elas foram encontradas concentradas nos cromocentros (VIDAL et al., 1997). A detecção citológica de glicoproteínas reativas à Con A em núcleos de hepatócitos após um período de jejum de 48 h é drasticamente diminuída, possivelmente por causa de um aumento no empacotamento da

cromatina e degradação protéica. A realimentação quase que restabeleceu a presença dessas glicoproteínas (MORAES et al., 2005), mostrando que o estado fisiológico da célula pode influenciar o conteúdo glicoproteico nuclear.

A O-GlcNAc é considerada uma modificação pós-traducional similar à fosforilação de proteínas, considerando que ambas ocorrem em resíduos de Ser e Thr, representam processos dinâmicos envolvidos na sinalização celular e alteram a função das proteínas modificadas. Entretanto, Hu e colaboradores (2010) demonstraram evidências de que, apesar de apresentarem muitas propriedades semelhantes, estas duas modificações são reguladas de modo muito diferentes. Várias cinases e fosfatases específicas, codificadas por genes distintos, regulam a fosforilação. Em contraste, a O-GlcNAc é controlada exclusivamente por duas enzimas, OGT e OGA, que são codificadas por um único gene altamente conservado em animais (HARTWECK et al., 2002). Em várias proteínas, O-GlcNAc e O-fosfato alternativamente ocupam os mesmos sítios ou sítios adjacentes, levando para a hipótese de que uma das funções desse sacarídeo é transitoriamente bloquear a fosforilação. A diversidade de proteínas modificadas por O-GlcNAc resulta na grande importância dessa modificação em muitos processos celulares fisiológicos e patológicos. (WELLS et al., 2001).

A absorção e o metabolismo de glicose são prejudicados em desordens neuronais, e este fenômeno está ligado a um aumento da fosforilação em diversas proteínas, como por exemplo a hiperfosforilação da proteína Tau que é acompanhada pela diminuição do conteúdo de proteínas Tau O-GlcNAc (LEFEBVRE et al., 2005).

A adição de O-GlcNAc é controlada diretamente pela atividade de duas enzimas: a O-GlcNAc transferase (OGT; uridina difosfo-N-acetil glucosamina, polipeptídeo  $\beta$ -N-acetilglucosaminil transferase ou UDP-Nac transferase) e  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase (OGA ou O-GlcNAcase). A enzima OGT catalisa a adição de N-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de Ser e Thr das proteínas alvo. Por outro lado, a OGA catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas (LACZY et al., 2009; LIMA VV et al., 2009). A atividade catalítica da OGT é controlada pela concentração do seu substrato, uridina 5'-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). A concentração de UDP-GlcNAc é altamente sensível ao fluxo de nutrientes tais como: glicose, ácidos graxos e aminoácidos através da via de biossíntese de hexosamina (HANOVER et al., 2010).

A enzima OGT é uma proteína solúvel encontrada no citosol, mitocôndrias e, preferencialmente, no núcleo (LUBAS et al., 2000; LAZARUS et al., 2006; KREPPEL et al., 1999); é composta por duas subunidades de 110 kDa e uma subunidade de 78 kDa (LUBAS et al., 2000; LAZARUS et al., 2006; KREPPEL et al., 1999).

A OGA foi inicialmente identificada como hexosaminidase C. No entanto, a atividade da OGA é específica para N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminídes (LACZY et al., 2009) sendo sua localização, principalmente, citosólica (DONG et al., 1994). A enzima OGA contém um domínio de glicosidase N-terminal e um domínio de histonas acetiltransferase C-terminal (TOLEMAN et al., 2004).

A enzima OGA pode interagir com proteínas específicas e possui duas isoformas distintas já descritas; uma variante de 130 kDa e uma de 75 kDa, que diferem pelo C-terminal. A variante de 130 kDa ou “OGA longa” contém o domínio de glicosidase N-terminal e o domínio de histonas acetiltransferase C-terminal bem distintos, já a porção de 75 kDa ou “OGA curta” não possui o domínio C-terminal (LIMA et al., 2011). Sabe-se que tanto OGT e OGA são enriquecidas no cérebro e que os genes que codificam as duas enzimas estão localizados em duas regiões que se encontram frequentemente mutadas em desordens neurológicas (WELLS et al., 2001; LEFEBVRE et al., 2005). A inibição das enzimas OGT e OGA representa uma ferramenta de grande importância nos estudos desta modificação pós-traducional, a qual tem merecido destaque em razão das recentes descobertas acerca de sua importância.

Diante disso, no presente trabalho foi estudada a glicosilação de histonas em neurônios corticais de camundongos, assim como foi avaliada a influência da idade nessa marcação.

## 2 JUSTIFICATIVA

De acordo com trabalhos anteriores, não está completamente elucidado se há alterações na glicosilação de histonas ao longo do envelhecimento, ou se esse tipo de marcação pós-traducional pode estar relacionada com alterações na atividade de transcrição gênica e, especificamente, nos núcleos de neurônios tem, de maneira geral, sido um problema não resolvido.

O neurônio é uma célula somática com o maior grau de diferenciação e de especialização no ser vivo. Esse tipo de célula tem seu metabolismo diretamente relacionado ao estado fisiológico do indivíduo e seu conteúdo genético apresenta poucas variações, tanto entre células do mesmo tipo, quanto entre fases da vida do indivíduo. É importante lembrar, que cada tipo celular sofre diferentes alterações ao longo da idade. Portanto, a comparação de resultados em diferentes tipos celulares deve ser feita cuidadosamente (LENT, 2012)

Existem evidências de que a N-acetilglicosaminação de proteínas, tanto citosólicas quanto nucleares, está intimamente relacionada com neuropatologias. Várias proteínas neuronais foram identificadas como sendo modificadas por O-GlcNAc, tais como a proteína Tau e o peptídeo Beta-amilóide que formam agregados proteicos encontrados, por exemplo, na doença de Alzheimer (LEFEBVRE et al., 2005).

Sabe-se que as enzimas responsáveis pela dinâmica de adição ou retirada de O-GlcNAc em proteínas nucleares, incluindo histonas, O-GlcNAc transferase e glicosaminidase são enriquecidas no cérebro e que os genes que codificam as duas enzimas estão localizados em duas regiões que se encontram frequentemente mutadas em desordens neurológicas (WELLS et al., 2001; LEFEBVRE et al., 2005).

As disfunções neuronais relacionadas com a idade envolvem uma gama de mudanças sutis abrangendo sinapses, receptores, neurotransmissores, alterações citológicas, e transmissão de impulsos elétricos, levando à disfunção cognitiva. Supõe-se então, que as mudanças estruturais e funcionais pelas quais passam os neurônios ao longo do envelhecimento estariam associadas com diferentes padrões de glicosilação protéica no núcleo dessas células.

Este trabalho será importante para ajudar a compreender as mudanças pós-traducionais que ocorrem nas histonas ao longo do envelhecimento, contribuindo para a pesquisa de base. Entender o processo de glicosilação de histonas ao longo do envelhecimento possibilitará adicionalmente, compreender o que isso implica na organização e função (atividade transcricional) da cromatina pela interação do DNA com essas histonas modificadas. Além

disso, entender como acontece o processo de envelhecimento neuronal possibilitará também compreender diversas doenças do sistema nervoso central relacionadas à idade, e ao longo prazo, ajudar no desenvolvimento de terapias epigenéticas para prevenir essas doenças.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Obejetivo Geral**

Avaliar a concentração de glicosilação de histonas de neurônios corticais de camundongos com o avanço da idade.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Comparar entre diferentes idades, para neurônios corticais de camundongo:

1. Distribuição intranuclear dessas glicoproteínas;
2. Tipos de radicais glicídicos presentes nas proteínas nucleares;
3. Nível de glicosilação das proteínas histônicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com idades na faixa de 8 (Grupo A) e 55-65 (Grupo B) semanas de idade, sendo aproximadamente 30 animais para cada grupo. Essa quantidade de animais é necessária para a obtenção de 1,2g de córtex cerebral a cada extração de neurônios. Os animais, adquiridos junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp, foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular, IB, Unicamp, sob condições normais, e alimentados *ad libitum* com ração extrusada até o 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 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo n° 1608-1) e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo n° 085/11).

### 4.2 Coleta de córtex cerebral

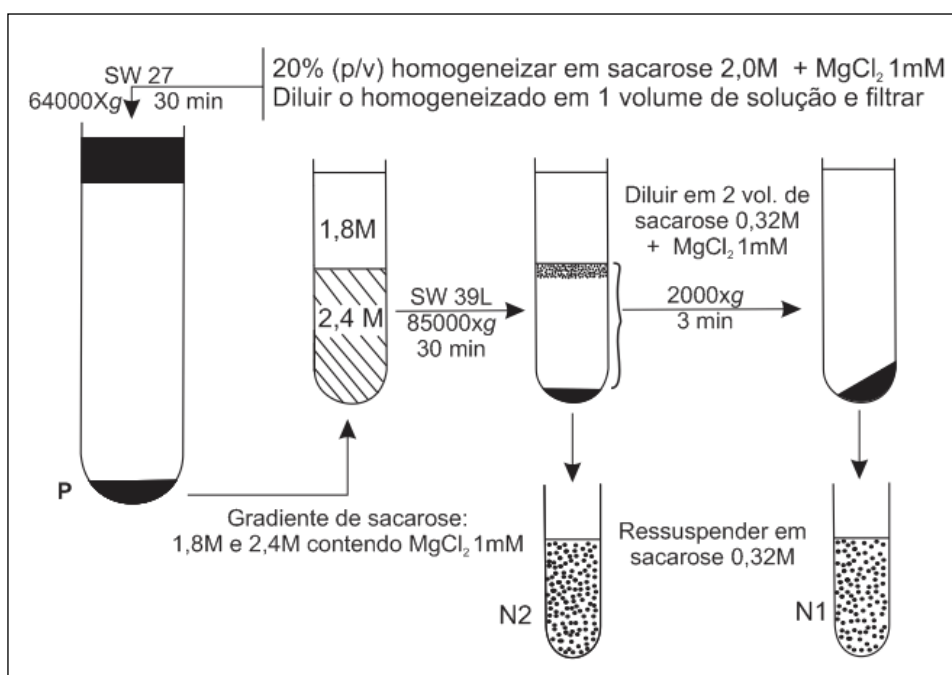
Sobre uma placa de vidro resfriada em gelo, o crânio foi aberto com tesoura cirúrgica e o cérebro retirado, sendo posteriormente fatiado. O material extraído do cérebro fatiado foram pedaços de córtices cerebrais, pois o córtice cerebral é formado por massa cinzenta, ou seja, é o principal lugar onde encontra-se a maior quantidade de corpos de neurônios, e portanto, onde encontra-se os núcleos desses neurônios. Esses pedaços de córtices foram dissecados das fatias com auxílio de lupa, e estocados de acordo com a idade do animal a -20°C até o momento de uso.

### 4.3 Isolamento dos núcleos

De acordo com os protocolos de Pearson e col. (1983) e Thompson (1973), o pool de todos os córtices dos camundongos de cada grupo, após serem extraídos e dissecados, foram homogeneizados (sacarose 2 M, MgCl<sub>2</sub> 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, seguido de filtração em membrana de nylon (poro de 100  $\mu\text{m}$ ). Como mostrado na Figura 1 o filtrado foi centrifugado a 64.000xg por 30 min e o precipitado nuclear ressuspenso em sacarose 2,4 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, PMSF 0,25 mM, solução sobre a qual foi gentilmente depositada a solução de sacarose 1,8 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, PMSF 0,25 mM, seguido de centrifugação a 85.000xg por 30 min, resultando em duas populações de núcleos separadas por suas densidades, a população neuronal (mais leve) na interface entre as duas soluções de sacarose, e a população glial (mais pesada) no precipitado. A solução de sacarose 1,8 M acima do gradiente foi descartada e a solução 2,4 M contendo os núcleos de neurônios na interface diluída em 2 volumes de solução de sacarose 0,32 M,  $\text{MgCl}_2$  1mM, PMSF 0,25 mM. Os núcleos purificados de neurônios foram precipitados a 2.000xg durante 3 min e ressuspenso em sacarose 0,32 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, PMSF 0,25 mM e glicerol 30% e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  (PEARSON et al., 1983; THOMPSON, 1973).



**Figura 1: Protocolo de isolamento de núcleos adaptado de Thompson (1973).** N1- População neuronal, N2- população glial.

#### 4.4 Citoquímica

Uma alíquota do pool dos núcleos isolados de cada grupo de idade foi aplicada em lâminas histológicas na forma de esfregaços e, imediatamente, fixados em solução etanol-ácido acético na proporção 3:1 (v/v) durante 1 min, seguido de lavagem em etanol 70% por 5 min e secagem ao ar.

Depois de fixadas, 3 lâminas de cada grupo, A e B (Fig. 2), foram submetidas à cada reação descrita abaixo e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

#### 4.4.1 Reação de PAS

As lâminas foram submetidas a reação de PAS para visualização de regiões positivas para carboidratos. Para tanto, as lâminas foram incubadas em ácido periódico (0,5%) por 1h para oxidação, lavadas em água destilada por 10 min, coradas em reativo de Shiff por 40 min em câmara úmida e escura para revelação dos carboidratos, e por fim lavadas em água corrente por 10 min até desenvolver a cor magenta, sendo posteriormente secas ao ar.

#### 4.4.2 Reação com lectina ConA

As lâminas foram submetidas ao método da Concanavalina A-peroxidase descrito por Kiernan (1975) e modificado por Moraes e Mello (2006) para identificação de resíduos de glicose e/ou manose nas proteínas nucleares.

As lâminas contendo esfregaços foram colocadas em 100 mL de solução de água oxigenada (0,3%) por 10 min para bloqueio de peroxidase endógena, lavadas 3 vezes de 5 min cada em água destilada, incubadas em câmara úmida por 1h em temperatura ambiente com 150 µL cada de solução de ConA (1mg/mL) em tampão fosfato 0,06 M, pH 6,5, suplementado com MgCl<sub>2</sub> 1mM e CaCl<sub>2</sub> 1mM, porque a ConA é uma metaloproteína que requer íons de metais de transição, como íons magnésio e íons cálcio para ligação (SUMNER; HOWELL, 1936). Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes de 5 min cada em tampão fosfato 0,06M, pH 6,5 e incubadas com 150 µL cada de solução de peroxidase (40 µg/mL) em tampão fosfato 0,06M, pH 6,5 durante 1h, lavadas 3 vezes de 5 min cada em tampão fosfato 0,06M, pH 6,5, incubadas em 100 mL de solução de diaminobenzidina (1mg/mL) em tampão fosfato 0,06M, pH 6,5 com 300 µL de água oxigenada (3%) por 15 min para revelação dos radicais glicídicos. Por fim as lâminas foram lavadas 3 vezes de 5 min cada em água destilada e secas ao ar.

#### 4.4.3 Reação com lectina de trigo WGA conjugada com peroxidase

As lâminas foram submetidas a essa reação para identificação dos resíduos de N-acetilglicosamina e/ou ácido siálico (HOZIER e FURCHT, 1980). Para tanto, as lâminas foram colocadas em 100 mL de solução de água oxigenada (0,3%) por 10 min para bloqueio de peroxidase endógena, lavadas 3 vezes de 5 min cada em água destilada, incubadas em câmara úmida com 150  $\mu$ L cada de solução de WGA-peroxidase (100  $\mu$ g/mL) em tampão PBS, pH 7,2 durante 1h em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes de 5 min cada em tampão PBS, e incubadas em 100 mL de solução de diaminobenzidina (1 mg/mL) em tampão PBS com 300  $\mu$ L de água oxigenada (3%) por 15 min para revelação dos radicais glicídicos. Por fim as lâminas foram lavadas 3 vezes de 5 min cada em água destilada e secas ao ar.

#### 4.4.4 Captura de imagens

Na captura das imagens foram selecionados os núcleos maiores e mais redondos, que são os núcleos de neurônios, facilmente, discerníveis dos núcleos da glia. Imagens dos núcleos corados pelo método de PAS foram capturadas utilizando-se um Microscópio Confocal Zeiss LM 510 Meta equipado com objetiva plan-apocromática 63x/1.40 Oil DIC M27 acoplada a uma câmera conectada a um microcomputador com o software de captura Zeiss LSM Image Browser,  $\lambda = 543$  nm, e filtros ChS1: 553-649. Essa microscopia foi utilizada, pois a coloração de PAS, que identifica os carboidratos totais, nos núcleos é visualizada através da sua fluorescência e, portanto é uma microscopia mais sensível a coloração obtida nesses núcleos.

As imagens dos núcleos corados pelas lectinas foram obtidas em um microscópio Leica DM500 equipado com objetiva Plan 100/1,25, condensador pré-focado e pré-centralizado, iluminação LED (3W temperatura 6000K), um potenciômetro para intensidade de luz mantido constantemente no nível máximo, e diafragma da condensadora ajustado para a posição 100x. As condições de iluminação foram mantidas constantes para todas as imagens capturadas. As imagens a serem processadas foram enviadas a um computador Intel Core i7 através de uma câmera digital de alta definição Leica ICC50 HD e software de captura Leica LAS EZ (v 1,8,1, Leica Microsystems Limited – Suíça). As condições de captura foram as seguintes: tempo de exposição 30,3 ms, ganho 3,9x, gamma 2,00 e saturação 115,00.

## 4.5 Bioquímica

### 4.5.1 SDS-PAGE e *Westernblotting*

Núcleos de animais de 8 (Grupo A) e 55-65 (Grupo B) semanas foram ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.75, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, e bromophenol blue) e analisados em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) a 17% de acordo com Laemmli (1970).

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 1:25h a 100 V (TOWBIN, 1979).

### 4.5.2 Detecção de glicoproteínas nas membranas de nitrocelulose

Como controle da concentração de histonas canônicas, antes da incubação com lectinas, a eficiência de transferência foi avaliada através de coloração das membranas com Ponceau S e coloração dos géis em azul de Coomassie. Como controle da quantidade de histona aplicada em cada amostra, as membranas foram incubadas com Ponceau S para fazer a densitometria de proteínas histônicas totais.

Para identificação das glicoproteínas ricas em manose/glicose as membranas foram bloqueadas em temperatura ambiente por 1h em PBS (pH 7.4), contendo albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, incubadas com Concanavalina A (Sigma) 10  $\mu$ g/ ml em PBS contendo 10  $\mu$ M dos íons  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$ ,  $\text{Mn}_2^+$  e Triton X-100 0,5 % por 1h em temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 5 vezes de 5 min cada em tampão PBS e incubadas em solução de peroxidase de rábano silvestre (Sigma) (50  $\mu$ g/ml) no mesmo tampão por mais 1h em temperatura ambiente, lavadas novamente e incubadas em solução recém-preparada de diaminobenzidina 0,06% e peróxido de hidrogênio 0,01% em PBS. As membranas coradas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e armazenadas ao abrigo da luz de acordo com o protocolo de Clegg (1982).

Para detecção das proteínas contendo GlcNAc, as membranas foram bloqueadas em BSA 3%, incubadas com WGA-HRP (Sigma) reveladas em diaminobenzidina e lavadas em água (KARLSSON, 1999).

#### 4.5.3 Identificação das glicoproteínas

Imagens dos filmes e das membranas coradas foram capturadas usando um “scanner” fotográfico HPScanjet G4050 e analisadas por densitometria no software ImageJ, o qual forneceu quantitativamente a densidade óptica das bandas das histonas modificadas por glicosilação.

#### 4.5.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Minitab<sup>TM</sup> 14. Dados de Western blot foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Mood. Foi aplicado o método de bootstrapping no software Arc, para calcular o erro padrão da mediana para essas amostras. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

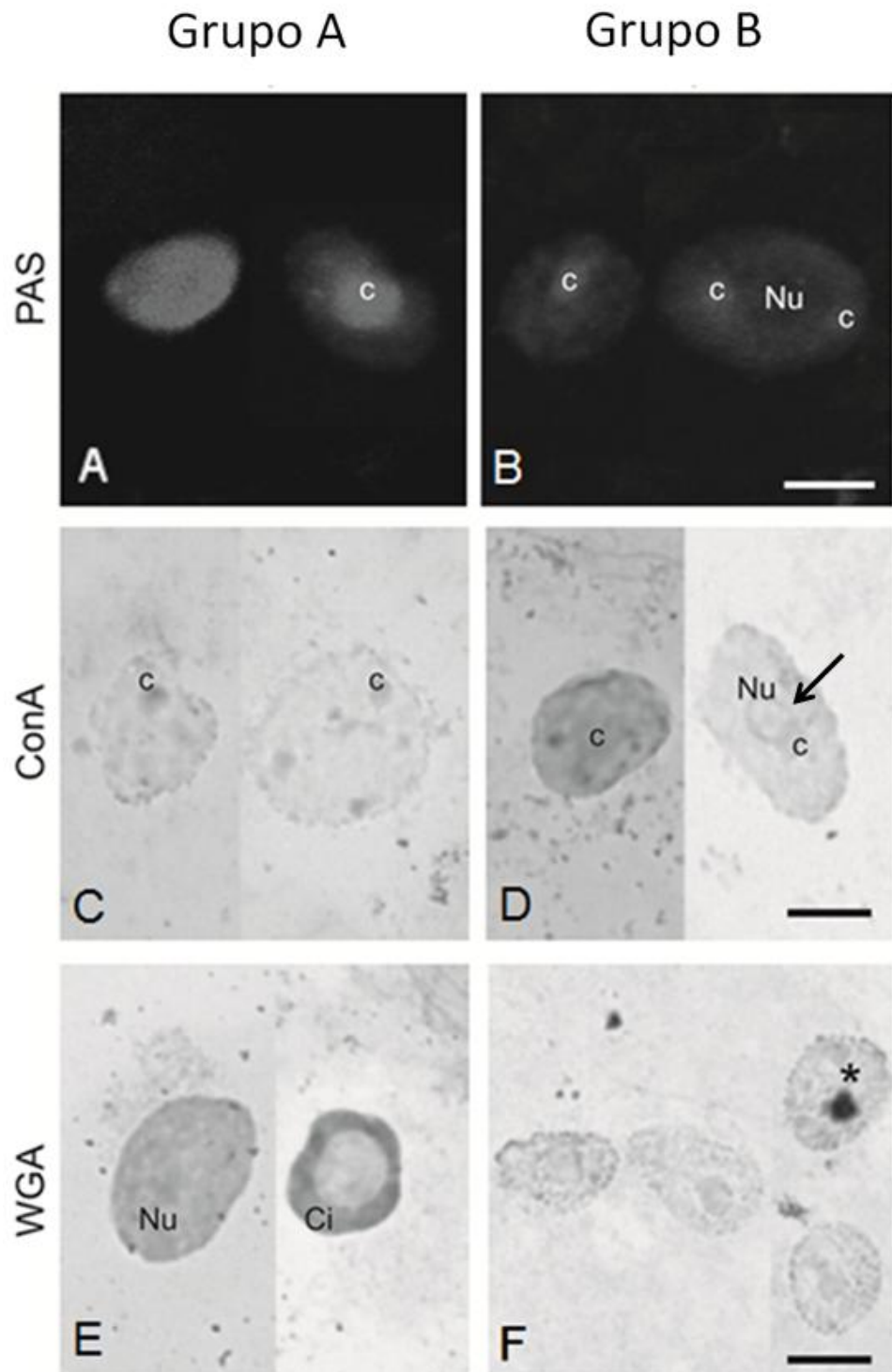
### 5.1 Citoquímica

Foram capturadas imagens de 100 núcleos para cada tipo de coloração e, posteriormente, foi feita uma análise qualitativa desses núcleos, levando em consideração a localização dos resíduos glicídicos no interior do núcleo e se estavam associados à estruturas nucleares, tais como a heterocromatina, eucromatina e o nucléolo. A coloração de carboidratos totais com o método PAS revelou, positivamente, a presença de glicoproteínas nos núcleos de neurônios corticais de camundongos de todas as idades. Em animais do grupo A (8 semanas) observou-se uma distribuição homogênea e difusa das glicoproteínas em alguns núcleos e, frequentemente, houve predominância de marcação em regiões de heterocromatina pericentromérica (cromocentros) nos núcleos observados (Fig. 2A). Padrão semelhante foi visto nos animais do grupo B (55-65 semanas) com concentração de glicoproteínas na heterocromatina, mas com marcação presente por todo o núcleo nos núcleos do grupo B (Fig. 2B). Em alguns núcleos foi possível observar que a marcação é excluída do nucléolo, e ainda assim concentra-se, principalmente, nos cromocentros (Fig. 2B – Seta).

Uma vez determinada a presença de glicoproteínas através do método PAS, partiu-se para a identificação de quais resíduos glicídicos estariam associados a essas proteínas. Como descrito anteriormente, geralmente resíduos de manose e N-acetil-glicosamina são observados em glicoproteínas nucleares. Dessa forma, foi utilizada marcação com as lectinas ConA e WGA, capazes de reconhecer esses dois resíduos de carboidratos, respectivamente.

Como observado na Figura 2(C-D), a marcação por ConA foi semelhante nos neurônios dos dois grupos de idade, distribuindo-se por todo o núcleo, mas concentrando-se nos cromocentros, dessa forma corroborando os resultados do PAS. Em alguns núcleos também foi possível observar uma exclusão da marcação nos nucléolos, onde é possível identificar o anel e o corpúsculo de heterocromatina mais fortemente corados e associados a este (Fig. 2D).

A marcação com WGA apresentou-se, por todo o núcleo, mais intensa que a marcação para ConA nas duas idades (Fig. 2E-F). O padrão de marcação foi semelhante, concentrando-se nos cromocentros. Entretanto, no grupo B alguns núcleos apresentaram cromocentros fracamente corados (Fig. 2E-F), enquanto em outros os cromocentros coraram-se fortemente (Fig. 2F). Diferentemente da marcação para ConA, não foi possível observar nos núcleos corados com WGA exclusão da marcação nucleolar.

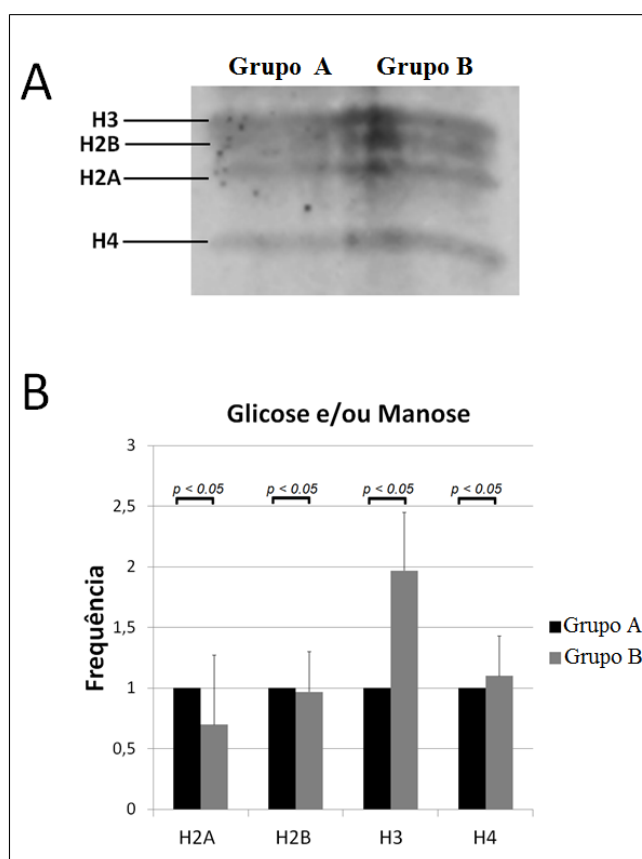


**Figura 2. Imagens dos núcleos de neurônios corticais de fêmeas Balb/c corados com PAS e com as lectinas ConA e WGA convertidas em escala de cinza.** Idade dos animais: Grupo A (8 semanas) e grupo B (55-65 semanas). C: cromocentro, Nu: nucléolo, Ci: citoplasma (neurônio menor, que não teve seu citoplasma rompido durante a extração dos núcleos devido ao clearance do homogeneizador, apresentou marcação forte para WGA). Seta indica marcação excluída do nucléolo, e concentra-se nos cromocentros. Asterisco indica cromocentro corado fortemente. Barra= 10  $\mu$ M.

## 5.2 Bioquímica

O *Westernblotting* evidenciou a presença de glicoproteínas nucleares em neurônios de ambos os grupos de animais (Grupos A e B), confirmando os resultados das marcações citoquímicas (Fig. 3A). A análise das membranas revelou bandas nas posições que correspondem às histonas do núcleo octamérico (H2A, H2B, H3 e H4) modificadas por glicose e/ou manose, marcadas com ConA (Fig. 3A) e as histonas também apresentaram marcação para N-acetilglicosamina, marcadas com WGA, mas os dados de quantificação ainda não são consistentes.

Os dados mostram que houve uma diminuição significativa, idade-dependente, na marcação das histonas H2A e H2B por glicose/manose (Fig. 3B). Já nas histonas H3 e H4, para o mesmo marcador, foi observada um aumento significativo com o avanço da idade (Fig. 3B).



**Figura 3. Quantificação de glicose/manose em histonas de núcleos de neurônios de camundongos do Grupo A (8 semanas) e do Grupo B (55-65 semanas).** (A) Westernblots. (B) Densitometria das bandas detectadas após a reação com ConA. As intensidades das bandas para animais do grupo A foram normalizadas para o valor de 1. Foram realizados 5 experimentos para cada grupo. As barras de erros indicam o erro padrão da mediana.



## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, evidenciou-se que não somente GlcNAc está presente em histonas somáticas de neurônios, mas também glicose e/ou manose, não sendo possível precisar, dada a especificidade da ConA, qual dos dois resíduos está presente. Alguns trabalhos anteriores, utilizando células HeLa, demonstraram a  $\beta$ -N-acetilglicosaminação do núcleo octamérico de histonas e mapearam alguns sítios dessa modificação por espectrometria de massas, como a H2A-Thr101, H2B-Ser36 e da H4-Ser47, e todas têm a função de competir com ou inibir a fosforilação desses sítios nessas histonas (SAKABE et al., 2010). Fujuki e colaboradores identificaram ainda que a histona H2B também é glicosilada no resíduo S112 pela OGT *in vitro*, e essa marcação promove monoubiquitinação da H2B-K120, presumivelmente para a ativação transcricional (FUJIKI et al., 2011). Todos esses trabalhos adicionaram um nível suplementar de complexidade para o código de histonas que está longe de ser totalmente decifrado.

Um estudo muito recente identificou uma proteína Kinase ativada por AMP (AMPK) como sendo um regulador da O-glicosilação com N-acetilglicosamina em H2B Ser 112 (XU et al., 2014). AMPK é um sensor de energia que ativa e controla os níveis de ATP / AMP. AMPK controla o metabolismo das células e o crescimento de células em resposta a mudanças da disponibilidade de nutrientes. Disfunções na AMPK estão associadas a doenças, incluindo diabetes e câncer (FAUBERT et al., 2013; HARDIE, 2013).

A quantificação bioquímica das histonas nucleares positivas para essas duas lectinas deixa claro que a idade influencia de modo considerável no aumento da concentração da modificação por glicose e/ou manose nas histonas H3 e H4, já nas histonas H2A e H2B acontece o contrário, havendo diminuição da sua concentração com o avanço da idade. Sabe-se que todas as modificações pós-traducionais regulam a interação das histonas com o DNA e a habilidade de recrutar complexos de remodelamento da cromatina necessários para a transcrição, replicação, recombinação, reparo, e mitose. Alguns trabalhos que revelaram que o core de histonas H3-H4-H2A-H2B são também modificados por glicosilação, mostraram que algumas dessas modificações estão relacionadas, por exemplo, com aumento de compactação da cromatina (SAKABE et al.; 2010; XU et al., 2014; SLAWSON e HART, 2011).

Apesar do presente trabalho não trazer informações sobre as enzimas responsáveis pela glicosilação de histonas, em 2013, vários estudos provaram com evidências convincentes que existe uma estreita relação entre OGT, O-glicosilação com GlcNAc, e as propriedades de hidroxilase de DNA da TET, uma família de proteínas envolvidas na desmetilação das ilhas

CpG no DNA. TET1, TET2, e TET3 são responsáveis por converter 5-metil-citosina (5mC) em 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC) e são necessárias para a transcrição de genes, no splicing do pré-mRNA, e na reprogramação genética no zigoto (ITO et al., 2011). Chen e col.(2013) demonstraram que OGT interage mas não atua glicosilando por O-GlcNAc ou influencia a função de TET2 e TET3. Entretanto, esses autores mostraram que TET2 e TET3 promovem o recrutamento de OGT para a cromatina para modificar histonas (CHEN et al, 2013). De fato, em um estudo mais recente, confirmou-se esse mesmo papel de TET3 no recrutamento de OGT para cromatina, e a partir disso regular a expressão gênica pela adição de N-acetilglicosamina (ITO et al., 2014).

A presença de radicais de glicose ou manose principalmente nos cromocentros e excluídos dos nucléolos, e a presença de N-acetilglicosamina nos cromocentros e possivelmente nos nucléolos, mostra diferenças na distribuição desses radicais em glicoproteínas nucleares, e deve ter relação com os diferentes papéis dessas modificações na estrutura e função proteicas das histonas. Assim como observado em hepatócitos de camundongos anteriormente, a presença de glicoproteínas ricas em glicose ou manose nos cromocentros é uma evidência da necessidade dessas proteínas como formadoras e/ou mantenedoras de heterocromatina (VIDAL et al., 1997; MORAES et al., 2005; 2007). E o fato das histonas H2A e H2B em núcleos de neurônios terem baixos níveis de modificações por glicose ou manose em animais idosos, sugere que essas modificações nas histonas não estejam diretamente envolvidas com a regulação da expressão gênica, mas de fato, elas estejam associadas com a heterocromatina em ambas as idades, como foi observado *in situ* em cromocentros fortemente corados com ConA, podendo ainda esses níveis mais baixos estarem relacionados com a troca de variantes de histonas com outras marcações epigenéticas, e assim modificar o “código de histonas”, pela remoção de histonas, como tem sido proposto que, a troca das histonas mais abundantes pela sua variante pode marcar ativamente os genes e regular o processo de transcrição (KAMAKAKA e BIGGINS, 2005). Ao mesmo tempo, proteínas ou histonas ricas em N-acetilglicosamina, mesmo estando presentes nos cromocentros, teriam papel importante também nas funções nucleolares, já que não foram excluídas desse compartimento nuclear.

A falta de diferenciação morfológica com relação à distribuição nuclear de cada um dos três tipos de glicoproteínas estudados deixa evidente que qualquer diferença relacionada à idade poderia ser observada somente com relação à concentração de tais glicoproteínas e/ou quantidade de modificações.

Após identificação neste estudo de que as histonas somáticas fazem parte do universo de proteínas nucleares glicosiladas em neurônios de camundongos, é necessário o sequenciamento e análise por espectrometria de massa dos peptídeos dessas proteínas glicosiladas, para caracterização dessas modificações por N-acetilglicosamina e glicose e/ou manose, e dessa forma obter informações mais detalhadas de suas funções na organização da cromatina. Também se faz interessante um estudo sobre os efeitos dessas glicosilações no padrão de expressão gênica para confirmar se tais modificações possuem algum papel epigenético, como já bem determinado para as acetilações, metilações e fosforilações nos domínios N-terminais das histonas.

## **7 CONCLUSÃO**

O trabalho mostrou que proteínas glicosiladas estão presentes em núcleos de neurônios, principalmente em focos heterocromáticos, e que alterações significativas ocorrem nas modificações de histonas por O-glicosilação em núcleos de neurônios de camundongos em diferentes idades. No grupo dos animais idosos ocorreu aumento da frequência de histonas H3 e H4 modificadas por glicose e/ou manose, e diminuição desse marcador nas histonas H2A e H2B.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÁRTOVÁ, E.; KREJČÍ, J.; HARNICAROVÁ, A.; GALIOVA, G.; KOZUBEK, S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 711-721, 2008.
- BEDNAR, HOROWITZ R. A.; GRIGORYEV S. A.; CARRUTHERS L. M.; HANSEN J. C.; KOSTER A. J.; WOODCOC C. L. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14173-14178, 1998.
- BERGER, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 2, p. 142-148, 2002.
- BRADBURY, E.M. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. **BioEssays**, v. 14, n.1, p. 9-16, 1992.
- CARRILLO, L. D.; FROEMMING, J. A.; MAHAL, L. K. Targeted in vivo O-GlcNAc sensors reveal discrete compartment-specific dynamics during signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6650-6658, 2010.
- CLEGG, J. C. S. Glycoprotein detection in nitrocellulose transfers of electrophoretically separated protein mixtures using concanavalin A and peroxidase: application to arenavirus and flavivirus proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 127, n. 2, p. 389-394, 1982.
- CHEN, Q.; CHEN, Y.; BIAN, C.; FUJIKI, R.; YU, X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 561-564, 2013.
- CHEUNG P.; ALLIS C. D.; SASSONE-CORSI P. Signaling to chromatin through histone modifications. **Cell**. v. 103, n. 2, p. 263-271, 2000.
- COONEY, C.A.; DAVE, A.A.; WOLFF, G.L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. **The Journal of Nutrition**. v. 132, n. 8, p. 2393S-2400S, 2002.
- 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. e.45166, 2012.

DI BERNARDO, G.; CIPOLLARO, M.; GALDERISI, U. Chromatin modification and senescence. **Current Pharmaceutical Desing**, 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, 2009.

DONG, D.L.; HART, G.W. Purification and characterization of na O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spllen cytosol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 30, p. 19321-19330, 1994.

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

EPEL, E. How “reversible” is telomeric aging? **Cancer Prevention Research**, v. 5, n.10, p. 1163-1168, 2013.

FAUBERT, B.; BOILY, G.; IZREIG, S. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 113-124, 2013.

FEDOROVA, E.; ZINK, D. Nuclear architecture and gene regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, n. 11, p. 2174-2184, 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, 2010.

FULOP, N.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Role of proteins O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 288-97, 2007.

FUJIKI, R.; HASHIBA, W.; SEKINE, H.; YOKOYAMA, A.; CHIKANISH, T.; ITO, S.; IMAI, Y.; KIM, J.; HE, H.H.; IGARASHI K. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. **Nature**, v. 480, n. 7379, p. 557-560, 2011.

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, 2004.

GOLDSTEIN, I.; HUGHES, R.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin?. **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 66-66, 1980.

GRANT, P. A. A tale of histone modifications. **Genome Biology**, v. 2, n. 4, REVIEWS0003.1, 2001.

GREWAL, S. I.; MOAZED, D. Heterochomatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 798-802, 2002.

HANOVER, J. A. Epigenetics gets sweeter: *O*-GlcNAc joins the “histone code”. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 12, p. 1272–1274, 2010.

HANOVER, J.A.; KRAUSE, M.W; LOVE, D.C. The hexosamine signaling pathway: *O*-GlcNAc cycling in feast or famine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, n. 2, p. 80-95, 2010.

HANOVER, J. A.; KRAUSE, M. W.; LOVE, D. C. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through *O*-GlcNAcylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 312-321, 2012.

HANSEN, J. C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: Determinants, mechanisms, and functions. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 31, n. 1, p. 361-392, 2002.

HARDIE, D. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2164-2172, 2013.

HART, G.W.; HALTIWANGER R.S.; HOLT G.D.; KELLY W.G. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. **Annual Review of Biochemistry**, v 58, n. 1, p. 841-74, 1989.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of *O*-linked  $\beta$ -N acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature** v. 446, n. 7139, p. 1017-1022, 2007.

HART, G. W.; COPELAND, R. J. Glycomics hits the big time. **Cell**. v.143, n. 5, p. 672–676, 2010.

HARTWECK, L.M.; SCOTT, C.L.; OLSZEWSKI, N.E. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1279-91, 2002.

HAWKES, R. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. **Analytical Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 143-146, 1982.

HORN, P. J.; PETERSON, C. L. Molecular biology: Chromatin higher order folding—wrapping up transcription. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1824-1827, 2002.

HOLT, G.D.; HART G.W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 17, p. 8049-57, 1986.

HOZIER, J.; FURCHT, L. T. Binding of lectins to mitotic chromosomes and interphase nuclear substructure. **Cell Biology International Reports**, v. 4, n. 12, p. 1091-1099, 1980.

HU, P.; SHIMOJI, S.; HART, G. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2526-2538, 2010.

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

ISENBERG, I. Histones. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, n.1, p. 159-191, 1979.

ITO, S.; SHEN, L.; DAI, Q. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1300-1303, 2011.

ITO, R.; KATSURA, S.; SHIMADA, H. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. **Genes to Cells**, v. 19, n. 1, p. 52-65, 2014.

JOUSSE, C.; PARRY, L.; LAMBERT-LANGLAIS, S. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 9, p. 3271-3278, 2011.

KARLSSON, A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. **Infection and Immunity**, v. 67, n.7, p. 3461-3468, 1999.



KAMAKAKA, R.; BIGGINS, S. Histone variants: deviants? **Genes & Development**, v. 19, n. 3, p. 295–316, 2005.

KIERNAN, J. A. Localization of alpha-D-glucosyl and alpha-Dmannosyl groups of mucosubstances with Concanavalin A and horseradish peroxidase. **Histochemistry**, v. 44, n.1, p. 39-45, 1975.

KLUG, A.; RHODES, D.; SMITH, J.; FINCH, J. T.; THOMAS, J. O. A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. **Nature**, v. 287, n. 5782, p. 509-516, 1980.

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

KREPPPEL, L.K.; HART, G.W. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAC transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 45, p. 32015-22, 1999.

LACZY, B.; HILL, B.G.; WANG, K.; PATERSON, A.J.; WHITE, C.R.; XING, D.; CHEN, Y.F.; DARLEY-USMAR, V.; OPARIL, S.; CHATHAM, J.C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v.296, n. 1, p. H13-28, 2009.

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

LAZARUS, B.D.; LOVE, D.C; HANOVER, J.A. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. **Glycobiology**, v. 16, n.5, p.415-21, 2006.

LEFEBVRE, T.; GUINEZ, C., DEHENNAUT, V., BESEME-DEKEYSER, O., MORELLE, W., MICHALSKI, J. Does O -GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 2, p.265-275, 2005.

LEVY-WILSON, B. Glycosylation, ADP-ribosylation, and methylation of *Tetrahymena* histones. **Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 484-489, 1983.

LIMA, V.V.; RIGSBY C.S; HARDY D.M.; WEBB, R.C. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 296, p. H13-28, 2009.

LIMA, V.V.; GIACHINI, F.R.; HARDY, D.M.; WEBB, R.C.; TOSTES, R.C. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, p. R236-50, 2011.

LUBAS, W.A.; HANOVER, J.A. Functional expression. of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 15, p. 10983-8, 2000.

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, 2013.

MARTIN C.; ZHANG Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 838-849, 2005.

MELLO, M. L. S.; ALDROVANI, M.; MORAES, A. S.; GUARALDO, A. M. A.; VIDAL, B. C. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. **Micron**, v. 40, n. 5-6, p. 577-585, 2009.

MORAES, A. S.; MELLO, M. L. S. The Con-A-peroxidase method for tissue localization of glucosyl and mannosyl groups applied to mouse hepatocytes and chicken erythrocytes. **Acta Histochemica**, v. 108, n. 6, p. 475-479, 2006.

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. 63A, n. 2, p.94-107, 2005.

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

NIELSEN S. J.; SCHNEIDER R.; BAUER U. M.; BANNISTER A. J.; MORRISON A, O'Carroll D., FIRESTEIN R. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. **Nature**, v. 412, n. 6846, p. 561-565, 2001.

PASSOS, J. F.; SIMILLION, C.; HALINAN, J.; WIPAT, A.; VON ZGLINICKI, T. Cellular senescence: Unravelling complexity. **Age**, v. 31, n. 4, p. 353-363, 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, 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, 2010.

SAITMURATOVA, O. K. Effect of nuclear glycoproteins on the activity of rat brain acetylcholinesterase and GABA-transferase. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 33, n. 3 p. 335-336, 1997.

SAKABE, K.; WANG, Z.; HART, G. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 19915-19920, 2010.

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. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 146-152, 2011.

SLAWSON, C.; HART, G. W. O-GlcNAc signaling: implications for cancer cell biology. **Nature Reviews Cancer** v. 11, n. 9, p. 678-684, 2011. 2011.

SPIRO, R.G. Proteins glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-53R, 2002.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The role of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 115, p. 583, 1936.

TAYLOR, M.E.; DRICKAMER K. Introduction to glycobiology. 2nd ed. **Oxford; New York: Oxford University Press**, 2006.

THOMSON S.; MAHADEVAN L. C.; CLAYTON A. L. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, n. 2, p. 205-214, 1999.

THOMPSON, R. J. Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 21, n. 1, p. 19-40, 1973.

TOLEMAN, C.; PATERSON, A.J.; WHISNHUNT, T.R.; KUDLOW, J.E. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53665-73, 2004.

TORRES, C. R.; HART, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3308-3317, 1984.

TOWBIN, H.; STAELHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. **PNAS** v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VARKI, A.; CUMMINGS R.D.; ESKO J.D.; FREEZE H.H.; STANLEY P.; BERTOZZI C.R.; HART G.W.; ETZLER M.E. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. TCoG Editor. **Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2009.

VIDAL, B. C.; MARIA, S. S.; KLACZKO, L. B. Concanavalin A-reactive nuclear matrix glycoprotein. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4, p. 39-45, 1997.

WASSEF, N. M.; RICHARDSON, E. C.; ALVING, C. R. Specific binding of concanavalin A to free inositol and liposomes containing phosphatidylinositol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 130, n. 1, p. 76-83, 1985.

WOODCOCK, C. L.; DIMITROV, S. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, n. 2, p. 130-135, 2001.

WELLS, L; VOSSELLER K.; HART G.W. Glycosylation of nucleocytoplasmatic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2376-8, 2001.

XU, Q.; YANG, C.; DU, Y. AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 9, p. 5594-5604, 2014.