

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA CHEQUIN

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA MSAP-PCR PARA CARACTERIZAÇÕES DE REGIÕES
DE DNA DIFERENCIALMENTE METILADOS EM PACIENTES COM RINITE
ALÉRGICA

CURITIBA

2013

ANDRESSA CHEQUIN

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA MSAP-PCR PARA CARACTERIZAÇÕES DE REGIÕES
DE DNA DIFERENCIALMENTE METILADOS EM PACIENTES COM RINITE
ALÉRGICA

Monografia apresentada para conclusão do Curso
de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Karin Braun-Prado

CURITIBA

2013

RESUMO

A metilação de ilhas CpG do DNA é uma importante forma de regular a expressão de genes, podendo, inclusive, colaborar com o aparecimento de doenças multifatoriais, como a rinite alérgica. Por se tratar de uma doença complexa (causas genéticas, epigenéticas e ambientais), a rinite alérgica não tem ainda um completo entendimento sobre seu funcionamento e nem formas eficazes de minimizar os efeitos colaterais de seus tratamentos, de maneira que projetos que contribuam para uma melhor compreensão da mesma são necessários. Uma das formas de caracterização do perfil de metilação é através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase realizado com Iniciadores Aleatórios Sensíveis à Metilação (MSAP-PCR). Esta técnica permite a diferenciação entre padrões de metilação presentes em controles saudáveis e em pacientes com rinite alérgica através uma análise global do genoma. Previamente nosso grupo no laboratório de Epigenética da UFPR identificou polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no locus *IL4-IL13* e dando continuidade ao estudo caso-controle na rinite alérgica foi utilizada a técnica de MSAP-PCR. Para padronização, inicialmente foram utilizadas amostras de DNA obtidas a partir de 20 ml de sangue periférico de oito indivíduos, quatro considerados controles e quatro considerados casos (com rinite). Após a obtenção do DNA através da técnica de fenol/clorofórmio, utilizou-se 0,8 µg de DNA para restrição enzimática com cada uma das enzimas: *MspI* e *HpaII* (isoesquizômero de *MspI*, sensível a metilação). Em seguida foram realizadas PCR para amplificação dos genes *MLH1* e *P53* para verificar a eficácia da digestão e a integridade do DNA digerido, respectivamente. Após essa etapa, procedeu-se a execução da técnica de MSAP-PCR com o uso do par de primers MGF0/MGF2 e do primer simples MLG2. Para visualização das amplificações foram realizadas corridas eletroforéticas a 200V em géis de poliacrilamida 8% por 4 horas à 4°C. Após padronização das quantidades de enzimas de restrição, tempos e temperaturas de anelamento nas PCRs, concentração de poliacrilamida e tempos de corrida nos géis, foi observada a presença de uma banda de DNA de aproximadamente 350pb, obtida na PCR com o par de primers MGF0/MGF2, metilada em duas das amostras dos DNAs controles (50%) e ausente em 100% das amostras dos DNAs dos pacientes. O fragmento de DNA encontrado na amostra controle foi purificado do gel de agarose e clonado no vetor pGEMTeasy. Os clones recombinantes foram coletados e o fragmento foi sequenciado e identificado como a proteína com os domínios PDZ/LIM. Esta proteína apresenta características de sinalização intracelular, o que poderia influenciar na formação preferencial de linfócitos Th2, promovendo as reações inflamatórias exacerbadas nos pacientes com rinite alérgica analisados.

Palavras-chave: Rinite alérgica, Metilação do DNA, MSAP-PCR.

ABSTRACT

Methylation of CpG islands of DNA is an important way to regulate gene expression, and may also collaborate with the appearance of multifactorial diseases, such as allergic rhinitis. Because it is a complex disease (genetic, epigenetic and environmental), allergic rhinitis is not yet a complete understanding of its functioning nor effective ways to minimize the side effects of their treatments, so that projects that contribute to a better understanding thereof are required. One way of characterizing the methylation profile is by the technique of Polymerase Chain Reaction performed with methylation-sensitive random primers (MSAP-PCR). This technique allows differentiation between methylation patterns present in healthy controls and patients with allergic rhinitis through a comprehensive analysis of the genome. Previously in our group Epigenetics Laboratory UFPR identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL13-IL4 locus and continuing the case-control study in allergic rhinitis was used technique MSAP-PCR. For standardization, were initially used DNA samples obtained from 20 ml of peripheral blood from eight individuals, four considered as defining controls and four cases (rhinitis). After obtaining the DNA by the technique of phenol / chloroform was used 0.8 mg of DNA for restriction enzyme with each enzyme: MspI and HpaII (isoesquizômero of MspI, sensitive to methylation). Then PCR was performed for amplification of MLH1 and P53 to verify the effectiveness and completeness of digestion of the digested DNA, respectively. After this step, we proceeded to apply the technique of MSAP-PCR using the pair of primers and primer MGF0/MGF2 MLG2 simple. For visualization of the electrophoretic runs amplifications were performed at 200V on 8% polyacrylamide gels for 4 hours at 4 ° C. After standardization of the quantities of restriction enzymes, annealing times and temperatures in PCRs concentration of polyacrylamide and the gel running times, we observed the presence of a DNA band of approximately 350pb, obtained by PCR with the primer pair MGF0 / MGF2, methylated in two samples of DNA controls (50%) and absent in 100% of the samples of the DNAs of patients. The DNA fragment was found in the control sample purified from agarose gel and cloned in vector pGEMTeasy. Recombinant clones were collected and the fragment was sequenced and identified as protein PDZ and LIM domain protein 1. This protein shows characteristics intracellular signaling, which could influence the preferential formation of Th2 lymphocytes, promotes inflammatory reactions exacerbated in patients with allergic rhinitis analyzed, which is enabled by the absence of methylation of gene PDZ / LIM.

Keywords: Allergic rhinitis, DNA methylation, MSAP-PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	INSERÇÃO DO GRUPAMENTO METIL NO DINUCLEOTÍDEO CG	13
FIGURA 2-	PERFIL ILUSTRATIVO GERADO APÓS A DIGESTÃO DE UM DNA GENÔMICO COM AS ENZIMAS <i>HPA</i> II E <i>MSP</i> I	15
FIGURA 3-	GEL DA REAÇÃO DE PCR DO GENE <i>TP53</i> E DO GENE <i>MLH1</i>	22
FIGURA 4-	GEL DA REAÇÃO DE PCR DOS INICIADORES MGF0/MGF2	25
FIGURA 5-	GEL DE AGAROSE ANTES E DEPOIS DA PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO	26
FIGURA 6-	GEL DE PCR DE COLÔNIA EMPREGANDO-SE OS PRIMERS MGF0/MGF2	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	REAGENTES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES DE PCR PARA CONFIRMAÇÃO DE DIGESTÃO E DE AMPLIFICAÇÃO	21
TABELA 2-	REAGENTES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE MSAP-PCR	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 OBJETIVOS.....	8
1.1.1 Objetivo geral.....	8
1.1.2 Objetivo específico.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 A RINITE ALÉRGICA.....	9
2.2 A RINITE ALÉRGICA E A HIPÓTESE DA HIGIENIZAÇÃO.....	10
2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	11
2.4 EPIGENÉTICA E SUA RELAÇÃO COM RINITE ALÉRGICA.....	12
2.5 METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 COLETA E OBTENÇÃO DO DNA.....	16
3.2 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE DNA COM AS ENZIMAS <i>HpaII</i> e <i>MspI</i>	16
3.3 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO E DIGESTÃO TOTAL DO DNA.....	17
3.4 AP-PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO (MSAP-PCR).....	17
3.5 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE DNA DIFERENCIAMENTE METILADO.....	18
3.6 SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FRAGMENTO CLONADO.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
4.1 PADRONIZAÇÃO DO CONTROLE DE DIGESTÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	20
4.2 PADRONIZAÇÃO DA MSAP-PCR.....	22
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	24
4.4 PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO IDENTIFICADO.....	25
4.5 IDENTIFICAÇÃO DO FRAGMENTO SEQUENCIADO.....	27
5 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O termo alergia pode ser usado como uma referência a uma resposta imunológica adaptativa anormal direcionada contra substâncias ambientais não infecciosas (alérgenos) ou contra certos componentes não-infecciosos de organismos infecciosos (GALLI *et al.*, 2008).

O índice de doenças alérgicas na população mundial vem aumentando significativamente nas últimas décadas, em especial o da rinite alérgica, podendo, inclusive, ser considerada a doença com maior prevalência entre as doenças respiratórias crônicas (IBIAPINA *et al.*, 2008). O Brasil encontra-se entre os países do mundo com os maiores índices de incidência de rinite alérgica (ASHER *et al.*, 2007).

Na rinite alérgica, a resposta imunológica de um organismo é caracterizada pelo envolvimento de linfócitos T e B e pela alta produtividade de anticorpos IgE antígeno-específicos e populações de células Th2, levando ao desenvolvimento da sintomatologia característica dos processos alérgicos: coriza, lacrimejamento e coceira (GALLI *et al.*, 2008). Entretanto, as doenças alérgicas são heterogêneas considerando o perfil dos sintomas e sua severidade. Há evidências de que ocorra uma comunicação entre fatores ambientais e genéticos. A descrição da base genética envolvida nessa patologia permitirá estabelecer conexões entre os vários tipos e subtipos de alergias facilitando o diagnóstico e o tratamento das mesmas (ROWE, 2011).

A expressão ou silenciamento de genes pode estar intimamente ligada ao desenvolvimento e ao agravamento de patologias, como as doenças alérgicas. Estudos recentes têm demonstrado que a metilação do DNA está normalmente vinculada a mecanismos de silenciamento gênico, afetando a expressão de genes por impedir a ligação de fatores de transcrição em regiões reguladoras, podendo contribuir, por exemplo, para o aparecimento de doenças autoimunes (HEWAGAMA, 2009).

O desencadeamento de uma rinite alérgica está estritamente relacionado com uma pré-disposição genética e a sensibilização do indivíduo por fatores ambientais, tornando-a uma doença multifatorial e, conseqüentemente, bastante complexa (McLEAN, 2010). Para tanto, ainda não há um completo entendimento

sobre seu funcionamento (patológico e molecular) e nem formas eficazes de minimizar os efeitos colaterais de seus tratamentos.

Nesse âmbito, métodos de análises globais do genoma, como a técnica MSAP-PCR (do inglês *Methylation Sensitive Arbitrarily Primed-PCR*), que permite a caracterização do perfil de metilação de amostras de DNA, são de grande relevância para estudos epigenéticos em diferentes patologias. Desta maneira, pretendeu-se detectar novas seqüências de DNA no genoma de controles e pacientes com rinite alérgica, diferencialmente metiladas, através da técnica MSAP-PCR. Os resultados encontrados podem contribuir para uma melhor compreensão dos processos e genes envolvidos nas reações alérgicas, bem como permitir o desenvolvimento de procedimentos que reflitam na qualidade de vida dos portadores de rinite alérgica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Detectar possíveis diferenças nos perfis de metilação do DNA de indivíduos controles (sadios) e em pacientes com rinite alérgica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Adaptar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase realizada com Iniciadores Aleatórios Sensíveis à Metilação (MSAP-PCR) em controles sadios e em pacientes com rinite alérgica.
- Caracterizar através da técnica MSAP-PCR os padrões de metilação do DNA presentes em controles sadios e em pacientes com rinite alérgica.
- Verificar diferenças entre os padrões de metilação obtidos pela técnica de MSAP-PCR nos pacientes com rinite alérgica e em controles através das técnicas de clonagem e sequenciamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A RINITE ALÉRGICA

A rinite alérgica pode ser considerada a doença com maior incidência entre as doenças crônicas respiratórias. Mesmo não sendo entendida como uma doença de grande gravidade é um problema global de saúde (IBIAPINA *et al*, 2008), encontrando-se entre as principais razões pela busca do atendimento primário a saúde (ICRDMR, 1994) e chegando a acometer cerca de 10% a 25% da população mundial (TEIXEIRA, 2009). O Brasil apresenta um dos maiores índices de prevalência de asma e de rinite alérgica do mundo (ASHER *et al*, 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde de 2010, a rinite alérgica atinge 25,7% das crianças de seis a sete anos de idade e 29,6% dos adolescentes de 13 a 14 anos.

As alergias são desencadeadas por antígenos ambientais, levando o organismo a gerar uma resposta alérgica de inflamação tecidual contra um componente não infeccioso (GALLI *et al.*, 2008). Estes antígenos ambientais incluem diversas substâncias, como a poeira doméstica, pólen, pêlo de animais, escamas, penas, alimentos, anti-soros, hormônios animais, venenos de insetos, drogas e produtos químicos (HYDE, 2002).

Durante a estimulação pelo alérgeno ocorre uma ativação dos linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), que secretam interleucinas, como IL-4, IL-5, IL-13. Estas, promovem a troca de isotipos de anticorpos nos linfócitos B, levando a uma grande produção de IgE. Ao ser liberada, a IgE liga-se aos mastócitos, sensibilizando-os. Após um segundo contato com o mesmo alérgeno, o anticorpo IgE preso a mastócitos e basófilos reconhece o alérgeno e promove um influxo de íons cálcio, fazendo com que diversos mediadores pré-formados e recém-sintetizados sejam liberados (GALLI *et al.*, 2008). Estes eventos causam vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com edema e promovem mudanças funcionais nos órgãos afetados, como bronco-constricção, secreção de muco nas vias aéreas, urticária, vômito e diarreia.

A ocorrência da doença alérgica é dependente de um contato prévio do indivíduo com o alérgeno e, após este, um novo contato o tornará sintomático

(TEIXEIRA, 2009). Porém, esse processo de sensibilização e desencadeamento de uma alergia é dependente não apenas de uma exposição a agentes alérgenos, mas também de uma íntima relação entre esta exposição e a susceptibilidade genética de cada indivíduo, sendo considerada, portanto, como uma doença multifatorial (FONSECA, 2007).

A rinite alérgica é uma doença que afeta pessoas em períodos produtivos de suas vidas e tem como consequência um desconforto significativo no paciente, além de ser a causa de absenteísmo no trabalho e na escola, requerendo intervenção ativa (HYDE, 2002).

2.2 A RINITE ALÉRGICA E A HIPÓTESE DE HIGIENIZAÇÃO

Reações alérgicas estão basicamente associadas com a alta produtividade de anticorpos IgE específicos e também com a expansão de populações de células T específicas a certos alérgenos. Variações anormais na produção e recrutamento destas células estão relacionadas a alterações genéticas e a fatores ambientais. Estas desordens no sistema imunológico, incluindo a rinite alérgica, algumas alergias a alimento, asma e dermatites, estão cada vez mais prevalentes ao longo do mundo (McLEAN, 2010).

A incidência de doenças alérgicas no mundo é predominante em países mais desenvolvidos e com melhores condições de vida. Diante deste fato, pesquisas levaram ao desenvolvimento da Hipótese de Higienização. Esta hipótese fundamenta-se nas evidências de que, nos países mais desenvolvidos há maior índice de doenças alérgicas proporcional a uma menor taxa de exposição a infecções por parasitas. Por outro lado, nos países em que ocorre maior índice de infecções parasitárias há proporcionalmente um decréscimo nas manifestações alérgicas (ROWE, 2011).

Muitas características das inflamações alérgicas são semelhantes àquelas que ocorrem contra os parasitas, pois envolvem Th2 e produção de IgE específico. Devido a essa similaridade de resposta imunológica tem-se considerado a ideia de que infecções por parasitas suprimem reações a outros tipos de alérgenos,

justificando a maior incidência de alergias em países menos expostos a infecções parasitárias, como nos países mais desenvolvidos (GALLI *et al.*, 2008).

Em casos de infecções por parasitas, o sistema de defesa de cada indivíduo cria uma série de mecanismos imunológicos, que além de levarem a eliminação do parasita permitem uma diminuição do dano tissular e da inflamação, que é característica de um processo alérgico. Na hipótese da higienização as infecções parasitárias promovem um desenvolvimento normal de resposta imune e, conseqüentemente, desenvolvem um controle apropriado da produção de populações de células T. Entretanto, com a exposição reduzida a estes agentes infecciosos, o que ocorre em países desenvolvidos e com alta taxa de higienização, é um aumento da exposição a outros alérgenos ambientais. Conseqüentemente, os índices de inflamações e doenças alérgicas como a rinite também se elevam. Estas informações suportam a hipótese da higienização, que continua sendo estudada diante de seus diversos aspectos moleculares (GALLI *et al.*, 2008).

2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico e o tratamento de doenças que envolvem o trato respiratório, como a rinite alérgica, devem ser realizados o mais precocemente possível, por uma equipe multidisciplinar, para diminuir de maneira significativa as conseqüências patológicas da doença. Desta forma, um paciente com rinite alérgica deve ser, sempre que possível acompanhado conjuntamente pelo alergologista, otorrinolaringologista e fonoaudiólogo (JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

A iniciativa ARIA (sigla em inglês para “*rinite alérgica e seu impacto na asma*”) é um grupo mundial responsável por estudos relacionados à rinite alérgica. A iniciativa ARIA classifica a rinite alérgica em diferentes categorias, tendo por base a frequência e intensidade de sintomas, bem como seu impacto sobre a vida do paciente. A utilização de escores clínicos, juntamente com um adequado exame clínico, facilita o reconhecimento dos sinais da presença da rinite alérgica e conseqüente diagnóstico e acompanhamento dos pacientes (IBIAPINA *et al.*, 2008).

A partir do diagnóstico da doença, parte-se para o tratamento convencional, que se limita a três tipos de conduta: evitar o contato com os

alérgenos (higiene ambiental), hipossensibilização (imunoterapia) e terapia medicamentosa (anti-histamínicos e corticosteroides nasais, etc.). Em vista da dificuldade da higienização ambiental, dos eventos adversos e da baixa persistência dos efeitos benéficos após a suspensão da terapia medicamentosa clássica, a imunoterapia vem assumindo magnitude no tratamento da rinite alérgica, proporcionando, em longo prazo, uma mudança no curso natural da doença (TEIXEIRA, 2009).

2.4 EPIGENÉTICA E SUA RELAÇÃO COM RINITE ALÉRGICA

O termo Epigenética pode ser empregado para descrever todas as mudanças reversíveis (FEINBERG *et al.*, 2004) e herdáveis no genoma que não alteram a sequência nucleotídica do DNA (MOMPARLER *et al.*, 2003; NOWSHEEN *et al.*, 2012). As três principais alterações epigenéticas conhecidas são: RNAs não codificadores (ncRNAs), as modificações pós-traducionais das histonas e a metilação do DNA. Todos atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica (NOWSHEEN *et al.*, 2012).

A metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais bem conhecidas entre as citadas, ocorrendo quando um grupo metil é adicionado à posição 5' do anel pirimídico da citosina, processo realizado por enzimas denominadas DNA metiltransferase ou DNMTs (NAKAO, 2001). Pode, também, ser molecularmente descrita como a metilação do carbono 5' de citosinas adjacentes a guaninas, os chamados dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002) (FIGURA 1).



FIGURA 1 - **INSERÇÃO DO GRUPAMENTO METIL NO DINUCLEOTIDEO CG - ⁵meC**. A s-adenosilmetionina doa grupamentos metil à enzima DNMT que insere este grupamento no carbono 5 de citosinas adjacentes às guaninas.
Fonte: Adaptado de Springers, 2011.

Esta alteração epigenética é uma característica de genomas eucarióticos, distribuindo-se pelo genoma dos vertebrados de forma não aleatória. Localizam-se, em sua maior parte, em regiões com grande concentração de dinucleotídeos CpG, denominadas ilhas CpG. Sabe-se que estas ilhas CpG metiladas estão localizadas nas regiões promotoras e nos primeiros exons de aproximadamente 60% dos genes. De um modo geral, a presença de metilação em sequências promotoras ou regulatórias está correlacionada com a inativação ou com o silenciamento gênico (NAKAO, 2001).

A metilação do DNA é, entre o maquinário epigenético, uma importante forma de regular a expressão dos genes relacionados com a polarização dos linfócitos T virgens para Th2, como os genes das citocinas IL-4 e IL-13. Quando ocorre a hipometilação destes genes há ativação de linfócitos B para secretarem IgE, presente nos processos alérgicos (WILSON, 2005).

Recentes evidências indicam que mudanças epigenéticas induzidas pelo ambiente podem alterar um padrão epigenético de metilação do DNA e contribuir para o aparecimento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, diabetes tipo I, esclerose múltipla (STRICKLAND *et al.*, 2008). Falhas na manutenção da homeostasia epigenética, devido a fatores ambientais ou genéticos, podem levar a expressão anormal de genes em células específicas, promovendo a perda da tolerância e as células modificadas podem contribuir para o desenvolvimento da autoimunidade em indivíduos geneticamente predispostos (HEWAGAMA & RICHARDSON, 2009).

2.5 METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA

A diferenciação das células T auxiliaadoras em Th1/Th2 é um exemplo de regulação na diferenciação celular que emprega modificações epigenéticas. Essas alterações, principalmente através da metilação do DNA, podem estabilizar o estado ativo ou silenciado do locus *IL4* nas células T auxiliaadoras diferenciadas.

Algumas técnicas têm sido utilizadas na avaliação de metilação diferencial entre tipos celulares normais e tumorais. Apesar das diferentes abordagens metodológicas que permitem a análise de metilação global do genoma e a identificação de novas sequências de DNA diferencialmente metiladas terem sido descritas originalmente em amostras de tumor e amostras de tecido sadio ao longo do genoma (GONZALGO *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 1997), o princípio das técnicas permite sua ampla utilização na comparação de amostras sadias e com doenças (como rinite alérgica).

A técnica que utiliza iniciadores arbitrários, AP-PCR, foi modificada por Gonzalgo e colaboradores (1997) que incluiu o termo sensível a metilação (MSAP-PCR – do inglês *Methylation Sensitive Arbitrarily Primed - PCR*) foi utilizada inicialmente no isolamento de seqüências diferencialmente metiladas em tumores, apresentando-se eficiente no reconhecimento de diferentes perfis de metilação do DNA.

A técnica MSAP-PCR fundamenta-se em uma restrição sensível à metilação. Primeiramente o material genético é digerido completamente com enzimas de restrição *Msp* I e *Hpa* II (isoesquizomero de *Msp* I sensível a metilação), que cortam as fitas de DNA e expõem seqüências nucleotídicas determinadas. O DNA digerido é então utilizado como molde em reações de PCR, que permitem a identificação ao acaso, porém específica de diferentes e múltiplas regiões metiladas do DNA de uma maneira eficiente e rápida (COSTA, 2004). Segundo Gonzalgo e cols (1997), estas enzimas de restrição são utilizadas para redução do número de fragmentos de PCR bem como a redução de possíveis artefatos amplificáveis na AP-PCR.

Apesar desta técnica ter sido usada por Gonzalgo e cols. (1997) na determinação de um padrão de metilação em amostras de linhagens tumorais, sua utilização pode ser feita para diferenciação de metilação em várias patologias, entre elas a rinite, uma vez que ambas as enzimas possuem o sítio de restrição

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E OBTENÇÃO DO DNA

Os pacientes com rinite alérgica e os controles sadios utilizados para a padronização da técnica desenvolvida foram selecionados no Laboratório de Epigenética da Universidade Federal do Paraná. Foram escolhidos quatro indivíduos com rinite alérgica e quatro indivíduos sadios como controles. Coletou-se 20 ml de sangue periférico de cada indivíduo, obtidos com o uso de tubos Vacutainer contendo anticoagulante EDTA (todos os indivíduos incluídos nesse estudo assinaram o termo de consentimento após terem obtido explicações sobre a pesquisa, aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa sob o registro 0141.0.094.000-07 e CONEP 14658).

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada através do método convencional de fenol/clorofórmio (SAMBROOCK *et al.*, 1989). As amostras de sangue foram digeridas durante toda noite em tampão TES (Tris 10mM, EDTA 50mM, 0,5% SDS) contendo 100ug/ml de Proteinase K e extraídas com o mesmo volume de fenol/clorofórmio até a obtenção de uma fase aquosa. Com a recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de Acetato de sódio 3M pH6 e 2 volumes de etanol absoluto. Após a centrifugação, o DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 500µl de TE (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C.

3.2 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE DNA COM AS ENZIMAS *HpaII* E *MspI*

Após a extração dos DNAs pela técnica de fenol-clorofórmio e a quantificação dos mesmos, a partir de comparações com marcadores de tamanho em gel de agarose corado com brometo de etídeo, 0,8µg de DNA foram utilizados nas digestões com 50U das enzimas *HpaII* e *MspI* (New England Biolabs) em volume final de 20µl a 37°C por 16h. As enzimas empregadas na restrição foram

inativadas com incubação das amostras a 65°C, em banho seco, por 20 minutos. Após este período as amostras digeridas foram armazenadas a 4°C.

3.3 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO E DE DIGESTÃO TOTAL DO DNA

Foram realizados testes de amplificação e de digestão do DNA em reações separadas de PCR. O teste de digestão foi realizado a partir da amplificação de uma região do gene *HMLH1*, que possui sítios iguais aos das enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. Caso o DNA tenha sido digerido com sucesso, os primers utilizados não encontrarão uma região para anelamento e, conseqüentemente, não ocorrerá amplificação de bandas. Os primers utilizados nesta reação foram o *phMLH1F*: 5'-CGC TCG TAG TAT TCG TGC- 3' e o *phMLH1R*: 5'-TCA GTC CCT CGT GCT CAC- 3' (BEVILACQUA *et al.*, 2000).

O teste de amplificação foi realizado a partir da amplificação do exon 6 do gene *TP53*, que não possui nenhum sítio para as enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. Como a região de anelamento dos primers continuará intacta após a digestão pelas enzimas, a amplificação de bandas de fragmentos deste gene garante um DNA funcional. Os primers utilizados nesta reação foram o *e6 p53F*: 5'-CAG GGC TGG TTG CCC AGG GTC CCC A- 3' e o *e6 p53R*: 5'-ACT GAC AAC CAC CCT TAA CCC CTC C- 3' (COSTA, 2004).

A metodologia utilizada para a amplificação do DNA nas reações de PCR foi padronizada ao longo do desenvolvimento do projeto, a partir da realização de gradientes de temperatura.

3.4 AP-PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO (MSAP-PCR)

Após os testes de digestão e amplificação, o DNA digerido foi utilizado como molde em reações de baixa estrigência. Foram realizadas duas reações de PCR, sendo uma delas com o único iniciador MLG2 (5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCC GG-3'), e a outra realizada com o par de iniciadores MGF-0 (5'-AAC CCT CAC CCT

AAC CGC GC-3') e MGF-2 (5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCG CG-3'), preconizados por Gonzalgo e cols (1997) por possuírem um alto conteúdo de G+C.

Estas reações de baixa estringência de PCR foram padronizadas ao longo do desenvolvimento do projeto, com aplicações de diferentes concentrações de DNA e iniciadores. A composição dos géis de poliacrilamida, nos quais as amostras foram aplicadas e analisadas, foi padronizada.

Comparando-se o perfil obtido entre as enzimas *Msp* I e *Hpa* II, foram analisadas e identificadas bandas que correspondem a fragmentos de DNA metilados.

3.5 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE DNA DIFERENCIALMENTE METILADO

O fragmento, de um indivíduo, identificado como diferencialmente metilado em pacientes e controles foi purificado a partir de um gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo, baseado no protocolo QIAGEN Quick Gel Extration Kit Protocols. O produto purificado foi então ligado no vetor pGEMTeasy (Promega) seguindo-se as especificações do fornecedor, e eletroporados em bactérias *E. coli* estirpe DH10B eletrocompetentes. As bactérias, com o fragmento trabalhado, foram selecionadas a partir de α -complementação, de maneira que as colônias brancas apresentavam o inserto, já as colônias azuis não. Foram selecionados 10 clones que tiveram a presença do plasmídeo com o inserto estudado (oriundos de 10 colônias brancas) e submetidos a uma reação de PCR empregando-se os iniciadores MGF0/ MGF2 para confirmação da presença do fragmento trabalhado, evitando os possíveis falsos positivos oriundos da α -complementação.

3.6 SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FRAGMENTO CLONADO

Com o resultado da PCR de colônia, foram escolhidos dois clones, dos 10 selecionados inicialmente, que confirmaram a presença do fragmento inserido. Os clones selecionados foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o *kit*

QiaPrep spin miniprep (Qiagen). Cerca de 200 ng, quantificados por comparação com marcadores de tamanho em gel de agarose corado com brometo de etídeo, de cada preparação foram sequenciados utilizando o *kit BigDye terminator*, segundo protocolo recomendado pelo fabricante, e sequenciador ABI3110 do departamento de Bioquímica.

A partir do resultado obtido, as sequências de nucleotídeos, dos dois clones sequenciados, foram comparadas para verificação da semelhança entre ambas. As sequências foram também submetidas ao BLAST (sigla em inglês que significa: *Basic Local Alignment Search Tool*), um algoritmo utilizado para comparar informações de sequências biológicas primárias, tais como a sequência de nucleotídeos de DNA (< <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>). A partir da pesquisa realizada neste algoritmo, foram fornecidas diferentes sequências do genoma humano que apresentaram um grau de semelhança a sequência consultada, que por sua vez, permitiram a identificação do possível gene sequenciado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PADRONIZAÇÃO DO CONTROLE DE DIGESTÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A metodologia utilizada para os testes de digestão e de amplificação foi embasada na técnica proposta por Gonzalzo e cols (1997). De acordo com essa metodologia é necessário à utilização de controles que indiquem que o DNA foi digerido completamente e que o mesmo encontra-se íntegro. Para tanto foram empregados iniciadores que amplificaram o gene *MLH1* e *P53*, respectivamente.

Inicialmente foi tentada uma padronização dos testes de digestão e amplificação em uma única reação de PCR, utilizando as mesmas concentrações de reagentes sugeridas por Gozalzo e colaboradores (1997) e temperaturas e quantidades de ciclos variados. Entretanto, não foi possível encontrar uma temperatura de anelamento de iniciadores compatível para ambos os genes. Seguiu-se então, com reações de PCR separadas, próprias para cada objetivo.

A digestão do DNA foi confirmada através da realização de uma PCR com iniciadores que amplificam o promotor do gene *MLH1*, que possui sequência de nucleotídeos reconhecida pelas enzimas *Hpa* II e *Msp* I. O não aparecimento da banda referente ao gene *MLH1* (606 pb) indica o sucesso na reação de digestão do DNA, tendo em vista que as enzimas utilizadas reconhecem o seu sítio de restrição e levam a não amplificação da sequência correspondente na PCR.

A padronização da amplificação do gene *MLH1* foi determinada a partir de uma única tentativa (Tabela 1).

O teste de amplificação das amostras de DNA digeridas foi realizado seguindo o protocolo indicado por Gonzalzo e cols (1997) com algumas modificações. Seguiu-se a amplificação do gene *TP53*, que não possui nenhum sítio para as enzimas de restrição *Hpa* II e *Msp* I. O aparecimento de uma banda referente a este gene (184 pb) confere a capacidade de amplificação do DNA digerido, indicando a sua integridade.

A padronização da reação de amplificação do gene *TP53* foi realizada a partir da determinação da melhor temperatura de anelamento dos iniciadores, através do uso de gradiente de temperatura. As temperaturas 54°C, 55,6°C, 56,4°C,

57,4°C e 58,3°C foram aquelas que apresentaram amplificação do fragmento desejado e a temperatura de 56,4°C foi a que apresentou uma amplificação mais eficiente. A partir da identificação da temperatura de anelamento ideal da reação de PCR, foi possível concluir a padronização da metodologia utilizada para este gene (Quadro 1).

Reagentes	Gene <i>MLH1</i>	Gene <i>P53</i>
Água mili-Q	-	-
Tampão cloreto	1X	1X
MgCl ₂	1,5Mm	2,5Mm
dNTP	0,2mM	0,2mM
Primer 5'	4pmol/µl	5pmol/µl
Primer 3'	4pmol/µl	5pmol/µl
Tag. Polimerase	1U	1U
DNA digerido	0,04µg	0,04µg
Volume final	20µl	20µl
Ciclos	95°C - 30seg 56°C - 30seg 72°C - 1min } 35X	95°C - 30seg 56,4°C - 30seg 72°C - 30seg } 35X

QUADRO 1- Reagentes e condições utilizadas nos testes de PCR para confirmação de digestão e de amplificação. Concentrações indicativas para uma única amostra de 20 µl.

Para todos os indivíduos analisados houve amplificação do gene *P53* e ausência da banda referente ao gene *MLH1*, evidenciada através de uma corrida eletroforética a 100 V por 1h em gel de poliácridamida à 8% (FIGURA 3 – A e B).

A presença de bandas de 184bp indicava que o gene *P53* foi amplificado servindo de controle de integridade da amostra após a restrição enzimática. Já a ausência de um fragmento de 606bp indicava que o gene *MLH1* não foi amplificado, pois a digestão com as enzimas de restrição *Hpa* II / *Msp* I foi realizada com êxito, uma vez que o anelamento dos iniciadores se fazia no sítio de restrição das enzimas usadas.

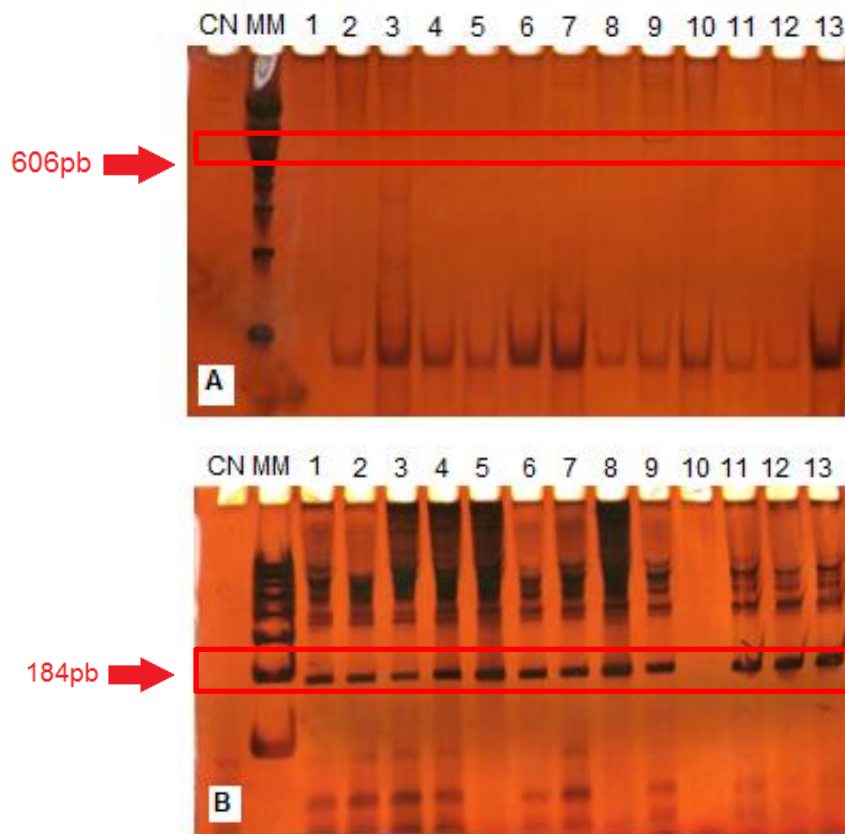


FIGURA 3 – GEL DA REAÇÃO DE PCR DO GENE *TP53* E DO GENE *MLH1*. A) Gel da reação de PCR do gene *TP53*. CN: controle negativo, MM: marcador de massa 100 pb, 1-13: amostras de DNA. B) Gel da reação de PCR do gene *MLH1*. CN: controle negativo, MM: marcador de massa 100 pb, 1-13: amostras de DNA.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA MSAP-PCR

A partir dos resultados satisfatórios nas reações de PCR para averiguação do controle de digestão e de amplificação, foi realizada a técnica de MSAP-PCR, buscado caracterizar o perfil de metilação de controles e pacientes com rinite alérgica. A partir dos DNAs digeridos desenvolveu-se uma nova PCR de baixa estringência, com o único iniciador MLG2 e outra PCR com o par de iniciadores MGF0 e MGF2. Para ambas as reações de PCR as condições de amplificação foram as mesmas (Quadro 2).

Reagentes	MGF0/MGF2	MLG2
Água mili-Q	-	-
Tampão cloreto	1X	1X
MgCl ₂	1,5mM	1,5mM
dNTP	0,2mM	0,2mM
Primer 5'	20pmol/μl	20pmol/μl
Primer 3'	20pmol/μl	Ausente
Taq. Polimerase	1U	1U
DNA digerido	0,2μg	0,2μg
Volume final	20μl	20μl
Ciclos	94°C - 45seg 40°C - 1min 72°C - 1min } 35X	94°C - 45seg 40°C - 1min 72°C - 1min } 35X

QUADRO 2- Reagentes e condições utilizadas na técnica de MSAP-PCR.

Após as reações de PCR, os fragmentos gerados foram analisados a partir de uma eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Como a técnica MSAP-PCR trata-se de uma análise global do genoma, a padronização da corrida eletroforética e da concentração do gel e do seu respectivo tamanho precisava considerar um amplo espectro possível de bandas. Para tanto foi utilizado um gel de poliacrilamida 8% com as seguintes dimensões 20 cm x 16 cm e uma corrida eletroforética em temperatura de 4°C a 200 V, por aproximadamente 4 horas e corado com nitrato de prata. Este padrão de corrida e a quantidade de poliacrilamida foram determinados como os mais adequados para uma melhor caracterização de um perfil de metilação de diferentes amostras, bem como para uma análise mais detalhada das mesmas.

Foram testadas três diferentes concentrações de DNA nas reações de MSAP-PCR: 0,02 μg, 0,04 μg e 0,2 μg de DNA por amostra de reação de PCR. A maior concentração de DNA mostrou um resultado com maior quantidade de bandas e mais evidentes no gel de poliacrilamida, possivelmente por possuir uma maior quantidade de produto de DNA disponível para o anelamento dos iniciadores trabalhados. A concentração de DNA padronizada para cada amostra de PCR foi de 0,2 μg.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DAS AMOSTRAS

A partir da padronização da técnica MSAP-PCR foi possível iniciar a caracterização do perfil de metilação das amostras utilizadas. As análises do gel referente às amostras de PCR do único iniciador MLG2 mostraram uma grande quantidade de bandas e de difícil distinção entre elas, diferentemente do observado por COSTA e colaboradores (2006) que conseguiram isolar uma banda hipometilada em uma amostra de linhagem tumoral de mama.

Ao ser realizada a reação de PCR empregando-se o par de iniciadores MGF0\MGF2 observou-se um perfil de bandas mais limpo e claro do que o apresentado pelo único iniciador, o que facilitou a análise e a comparação entre amostras dos pacientes com rinite alérgica e controles sadios. Foi possível detectar a presença de uma banda de aproximadamente 350pb, nas amostras cortadas com a enzima *Hpa* II presente em 50% dos controles (2\4) e ausente em 100% dos pacientes com rinite alérgica (4\4) (Figura 4).

O fragmento de DNA indicado na figura 4 está ausente na digestão com *Msp* I nas amostras de controles e nas amostras de rinite e presente na digestão com *Hpa* II em apenas duas amostras dos controles sadios e ausente em todos os pacientes com rinite. Esses achados indicam que este fragmento está metilado em metade dos controles sadios, em que apareceu a banda obtida pela digestão com *Hpa* II, e ausente em todos os pacientes como rinite alérgica.

O fato de metade dos controles analisados apresentarem uma banda específica, ausente em todos os pacientes, indica um possível fragmento metilado apenas em indivíduos sadios, indicando que poderá haver uma região no genoma não metilada nos pacientes com rinite alérgica, como a região do locus *IL4-IL13*, que uma vez desmetilada estaria favorecendo a diferenciação para o perfil de linfócitos tipo Th2, comuns na rinite alérgica (ANSEL *et al.*, 2006)

Com a intenção de melhorar o processo de identificação dessa região, a banda de DNA identificada no gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, foi purificada a partir de um gel de agarose. Para tanto foi realizada uma nova reação de PCR empregando-se o produto da primeira reação de PCR. Esta nova reação permitiu uma maior concentração do fragmento de DNA estudado e

consequentemente uma banda mais evidente no gel de poliacrilamida e também no gel de agarose.

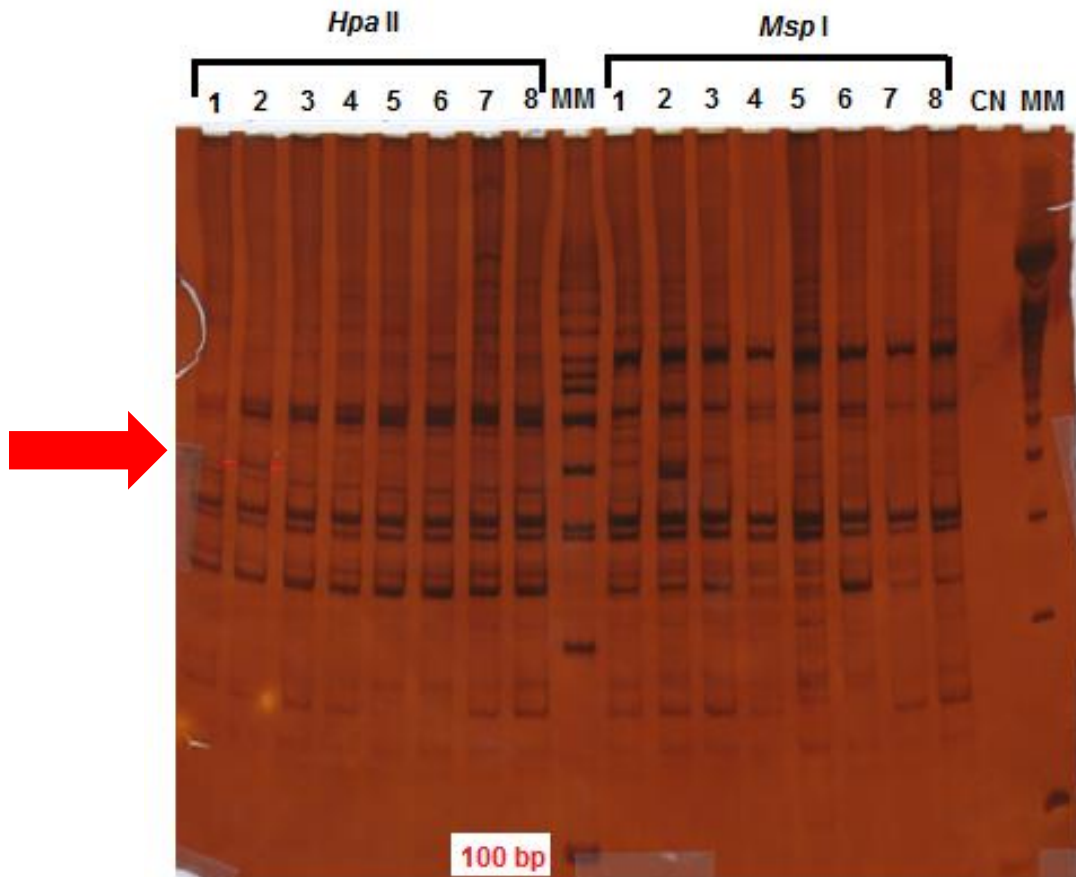


FIGURA 4 - GEL DA REAÇÃO DE PCR DOS INICIADORES MGF0/MGF2.
 CN: controle negativo, MM: marcador de massa 100 pb, 1 - 4: amostras de DNA de indivíduos controles, 5 - 8: amostras de DNA de pacientes com rinite alérgica, flechas vermelhas: indicam o fragmento de aproximadamente 350pb identificado como diferencialmente metilado.

4.4 PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO IDENTIFICADO

As amostras de DNA que continham o fragmento diferencialmente metilado (amostras 1 e 2, cortadas com a enzima *Hpa* II, da figura 4) foram aplicadas em um gel de agarose a 1% e submetidas a corrida eletroforética a 30V por 3,5 horas e coradas com brometo de etídeo. O fragmento isolado eletroforéticamente de um

indivíduo (do indivíduo tratado como “amostra 1”, na figura 4) foi recortado do gel de agarose e submetido a purificação realizada com o kit de extração *Kit QUIAEXII GEL EXTRACTION* da *Qiagen*, seguindo o protocolo do fabricante.

Após a purificação, o fragmento de DNA foi reamplificado em um gel de agarose e corado com brometo de etídeo, para a confirmação de sua pureza (Figura 5 - A e B).

O fragmento purificado foi ligado ao vetor e eletroporado em bactérias *E. coli*. A partir das 35 colônias que apresentaram a presença do fragmento, mostrando-se na forma de colônias brancas (α -complementação), 10 foram selecionadas com o provável inserto. Foram então submetidas a uma reação de PCR empregando-se os iniciadores MGF0/ MGF2 para confirmação da presença do fragmento trabalhado, evitando os possíveis falsos positivos oriundos da α -complementação. Todas as colônias analisadas confirmaram a presença do fragmento de aproximadamente 350pb em seu genoma, viabilizando seu uso para a continuidade do trabalho (Figura 6).

Seguiu-se com o sequenciamento do fragmento clonado para caracterização do possível região genômica relacionada com a rinite alérgica.

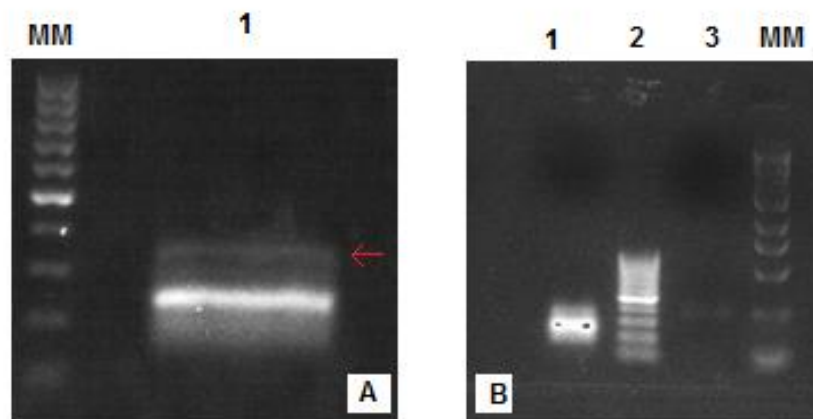


FIGURA 5 - GEL DE AGAROSE ANTES E DEPOIS DA PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO. A) Gel de agarose antes da purificação do fragmento. MM: marcador de massa 100 pb, 1: amostra de DNA de um indivíduo controle que havia amplificado o fragmento de DNA de aproximadamente 350pb, flecha vermelha: indica o fragmento de aproximadamente 350pb identificado como diferencialmente metilado. B) Gel de agarose após a purificação do fragmento. MM: marcador de massa 1 kb, 1: amostra de DNA de um indivíduo controle que havia amplificado o fragmento de DNA de aproximadamente 350pb, 2: Marcador molecular 100pb, 3: Fragmento purificado.



FIGURA 6 - GEL DE PCR DE COLÔNIA EMPREGANDO-SE OS INICIADORES MGF0/MGF2. MM: marcador de massa 100 pb, 1: fragmento de DNA de aproximadamente 350 bp purificado, 2 – 11: colônias de bactérias *E. coli* que continham o inserto eletroporado.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DO FRAGMENTO SEQUENCIADO

A partir dos resultados obtidos pela PCR de colônia, dois clones que demonstraram resultado positivo para presença do fragmento estudado foram selecionados. Estes foram submetidos a uma extração de DNA plasmidial e em seguida sequenciados.

O resultado do sequenciamento dos dois clones indicou identidade entre as sequências nucleotídicas, permitindo a determinação da sequência do fragmento estudado.

A sequência nucleotídica do fragmento de aproximadamente 350 pb foi confrontado com o genoma humano no algoritmo BLAST, disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Neste programa disponível online, são apresentadas as sequências que mais se assemelham com a sequência consultada, assim como é possível identificar a proteína a que se refere. Para tanto, a sequência de nucleotídeos estudada apresentou-se 99% igual a uma parte correspondente à 70% de uma proteína com o domínio 1 do PDZ/LIM encontrada no cromossomo 10 do genoma humano.

Os genes PDZ/LIM codificam um grupo de proteínas relacionadas em vários processos celulares como organização do citoesqueleto, sinalização neural, especialização de linhagens celulares, desenvolvimento de órgãos e na oncogênese. Funcionalmente todas as proteínas com domínio PDZ/LIM compartilham a característica de influenciar na actina do citoesqueleto (VELTHUIS *et al.*, 2007). Uma proteína com ampla ação metabólica na célula poderia interferir na sinalização dos linfócitos T como observado por TANAKA e cols. (2011). Esses pesquisadores verificaram que a proteína que apresenta o domínio PDZ/LIM conhecida como PLIM 2 promove a ubiquitinação e a degradação do fator de transcrição STAT3, importante na diferenciação de linfócitos T “naive” em Th17. Com a inativação de STAT3 não ocorre a reação inflamatória exacerbada observada nos granulomas (TANAKA *et al.*, 2011).

A presença de uma proteína com características de sinalização intracelular poderia ativar fatores transcricionais que promoveriam a formação preferencial de Th2. Entretanto a inativação de PDZ/LIM poderia induzir um desequilíbrio na resposta imune, intensificando as ações de Th2.

A inativação do gene através de metilação do DNA levaria a uma resposta imunológica equilibrada, o que pode justificar a sua ausência nos controles analisados nesse estudo. Por outro lado, a presença dessa proteína nos indivíduos com rinite, poderia indicar sua ação na sinalização exacerbada de Th2.

5 CONCLUSÕES

A técnica de MSAP-PCR é uma importante ferramenta que permite identificar com sucesso sequências de DNA diferencialmente metiladas em tumores. Nesse trabalho, esta metodologia foi empregada pela primeira vez para diferenciar o padrão de metilação do DNA entre pacientes com rinite e controles saudáveis. Com o padrão enzimático obtido pode-se concluir que existe uma região metilada em metade das amostras estudadas dos controles. Os experimentos de sequenciamento e a posterior análise manual da sequência, permitiu a identificação do fragmento estudado. Estes dados foram confrontados com o genoma humano a partir do programa BLAST, e esta região parece referir-se ao gene PDZ/LIM. Este gene codifica proteínas com amplas ações metabólicas e com características de sinalização intracelular. Esta característica poderia estar relacionada com uma forte sinalização e ativação de fatores transcricionais específicos de Th2. Um desenvolvimento acentuado de linfócitos Th2, decorrente da hipometilação do gene PDZ/LIM, poderia levar a rinite alérgica observada nos pacientes analisados neste estudo, mostrando a possível relação do gene identificado com a manifestação alérgica.

Entretanto tornam-se ainda necessários experimentos adicionais de sequenciamento de mais amostras para poder corroborar os dados preliminares obtidos. Esta técnica ainda encontra-se em processo de padronização e implementação, logo novas amostras serão testadas para verificação de sua eficácia na distinção entre amostras de indivíduos saudáveis e de controles, o que poderá ajudar em uma maior compreensão do desencadeamento e do desenvolvimento da rinite alérgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, K. M.; DJURETIC, I.; TANASA, B.; RAO, A. Regulation of Th2 Differentiation and IL4 Locus Accessibility. **Annu. Rev. Immunol**, vol. 24, 607-656, 2006.

ASHER, M. I.; BJORKSTÉN, B.; LAI, C.K.; STRACHAN, D.P.; WEILANS, S.K.; *et al.* Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, 2007.

BEVILACQUA, R. A.; SIMPSON, A. J. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutation in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. **Int. J. Cancer**, v. 87, p. 200-203. 2000.

BIRD, A.; *et al.* DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v.16, n.1, Jan 1, p.6-21. 2002.

COSTA, F.F. *Identificação de regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama através da técnica AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR)*. 111 f. Tese (Doutorado em Oncologia) – Fundação Antônio Prudente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COSTA, F.F.; PAIXÃO, V. A.; CAVALHER, F.P.; *et al.* SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer genetics and Cytogenetics**, vol. 165, 135-143, 2006.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.2, Feb, p.143-53. 2004.

FONSECA, A.S.; ANDRADE, N.A.; BRITTO, C. Características Clínicas dos Pacientes Alérgicos que vivem em cidade de clima tropical. **Arquivos internacionais de otorrinolaringologia**, 2007.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, vol. 452, 445-454, July, 2008.

GONZALGO, M. L.; LIANG, G.; SPRUCK, C.H.; ZINGG, J.M.; RIDEOUT, W.M.; JONES, P.A. Identification and Characterization of Differentially Methylated Regions

of Genomic DNA by Methylation-sensitive Arbitrarily Primed PCR. **Cancer Research**, 57: 594-599, 1997.

HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, 3-11, 2009.

HUANG, T. H.; LAUX, D. E.; HAMLIN, B. C.; *et al.* Identification of DNA Methylation for Human Breast Carcinomas Using the Methylation-sensitive Restriction Fingerprinting Technique. **Advances in Brief**, vol.57, 1030-1034, 1997.

HYDE, R.M. : National Medical Series para estudo independente. 4nd Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002

IBIAPINA, C.C.; SARINHO, E. S.C.; CAMARGOS, P.A.M.; ANDREDE, C. R.; SOUZA, A.A. Rinite alérgica: aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos. **Jornal Brasileiro de Epidemiologia**, v. 34, 2008.

International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis (ICRDMR). International Rhinitis Management Working Group. **Allergy**. 49: 1-34, 1994

JUNQUEIRA, P.; *et al.* Conduta fonoaudiológica para pacientes com diagnóstico de rinite alérgica: relato de caso. **CEFAC**, vol. 7, 336-339, São Paulo, 2005.

McLEAN, W. H. I. The allergy gene – How a mutation in a skin protein revealed a link between eczema and asthma. **The Scientist**, vol. 24, 35-39, December, 2010.

MOMPARLER, R. L.; *et al.* Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, Sep 29, p.6479-83. 2003.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, 278:25-31, 2001.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; TRAN, P. T. *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer letters**, p. 1-10., 2012.

ROWE, D. G. Modern living seems somehow to make our immune systems overly sensitive. Is cleanliness at fault – or something else?. **Nature**, vol. 479, 2 – 4, November, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. Ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, Plainview, 1989.

STRICKLAND, FM, RICHARDSON, BC., Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity- DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. **Autoimmunity**, 278-86p, 2008.

TANAKA, T.; *et al.* PDLIM2 inhibits T helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3. **Sci Signal**. 202, dec., 2011.

TEIXEIRA, M. Z. *Ensaio clínico quali-quantitativo para avaliar a eficácia e a efetividade do tratamento homeopático individualizado na rinite alérgica perene*. 2009. 315 f. Tese (Doutorado em Clínica médica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VELTHUIS, A. J. W.; BAGOWSKI, C. PDZ and LIM Domain-Encoding Genes: Molecular Interactions and their Role in Development. **The Scientific World Journal**. vol. 7, 1470-1492, 2007.

WILSON, C.B.; MAKAR, K.W.; SHNYREVA, M., FITZPATRICK, D.R. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. **Seminars in Immunology**, 17: 105-119, 2005.