



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

HALINE BARROSO

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DE DNA NOS GENES DA
CITOQUERATINA 14 (*KRT14*) E 19 (*KRT19*) EM
AMOSTRAS DE PELE EXPOSTA E NÃO EXPOSTA
AO SOL**

João Pessoa - PB

2015

HALINE BARROSO

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DE DNA NOS GENES DA
CITOQUERATINA 14 (*KRT14*) E 19 (*KRT19*) EM AMOSTRAS DE
PELE EXPOSTA E NÃO EXPOSTA AO SOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

João Pessoa - PB

2015

B277a Barroso, Haline.

Análise de metilação de DNA nos genes da citoqueratina 14 (*KRT14*) e 19 (*KRT19*) em amostras de pele exposta e não exposta ao sol / Haline Barroso.- João Pessoa, 2015.

43f. : il.

Orientadora: Naila Francis Paulo de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. Citoqueratina.
3. Epigenética. 4. Metilação de DNA. 5. Radiação UV - pele.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

HALINE BARROSO

Dissertação de Mestrado avaliada em 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Orientadora – UFPB

Profa. Dra. Tatjana Keesen De Souza Lima
Centro de Biotecnologia (CBiotec) – Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Externa

Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira
Departamento de Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn
Departamento de Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Suplente Interno

Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Departamento de Biologia - Universidade Estadual da Paraíba
Examinador Suplente Externo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**, por ter me dado forças para prosseguir, por abrir as portas nas dificuldades e me mostrar o caminho correto por onde devo andar.

A minha querida e amada avó **Amenaide** que sempre me incentivou a estudar e a seguir em frente.

A minha mãe **Ilvaita**, ao meu esposo **André** e aos meus filhos **Caio** e **Eduardo** que sempre me apoiaram, me incentivaram e compreenderam os momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu ter saúde e perseverança para a realização desse trabalho.

A Prof. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira, pelo apoio constante, incentivo, paciência e colaboração em todas as etapas desse trabalho.

A Dra. Krystyna Gorlach Lira, pela gentileza de ser a revisora deste trabalho e participar da Banca Examinadora.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A minha fiel amiga de todas as horas Alanne Rayssa pelo companheirismo, paciência e pelos grandes momentos de aprendizado e alegrias que passamos juntas.

A todos os amigos e companheiros do laboratório Isabelle Borba, Ludimila Araújo, Daniel Uchôa, Bruno Mariz, Mikaelly Batista, Laura Souto, Dasaiev Dutra, Sabrina Rocha.

A minha amiga Ana Anízia que sempre esteve pronta a me ajudar e a me fazer sorrir mesmo nos momentos mais tensos da vida.

A todos os colegas da turma do mestrado pelo acolhimento, simpatia e apoio.

RESUMO

Pesquisas tem mostrado que a radiação UV do sol pode causar mutações no DNA e aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pele. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a capacidade da radiação UV em causar alterações epigenéticas na pele. A metilação do DNA é caracterizada pela adição do grupo metil em uma citosina precedida por uma guanina (dinucleotídeo CpG), o que pode alterar a transcrição gênica, diminuindo a expressão ou silenciando um gene. Alterações epigenéticas podem representar um importante caminho de como os fatores ambientais influenciam no envelhecimento e no desenvolvimento de certas doenças de maneira tecido específica. Queratinas epiteliais são chamadas de citoqueratinas, e sua principal função é manter a integridade e estabilidade mecânica do tecido epitelial. Neste trabalho investigamos se há influência da exposição solar sobre o perfil de metilação de DNA nos genes das citoqueratinas 14 (*KRT14*) e (*KRT19*), em células da pele de indivíduos sem histórico de doenças de pele. Biopsias de pele foram obtidas através de um Punch circular da de área exposta e não exposta ao sol de 30 cadáveres do Serviço de Verificação de Óbito. A análise de metilação do gene *KRT14* foi realizada pelo método de PCR Específica para Metilação (MSP), e para o gene *KRT19* foi realizado o método de Restrição Enzimática Sensível à Metilação (MSRE) das áreas expostas e protegidas do sol. A análise estatística mostrou que não há diferenças significativas entre as regiões exposta e não exposta ao sol, sendo a condição metilada a mais frequente tanto para o gene *KRT14* quanto para o gene *KRT19* ($p>0,05$; McNemar). Assim, concluímos que não há influência da exposição solar no perfil de metilação de DNA nos genes *KRT14* e *KRT19*.

Palavras Chave: citoqueratina, epigenética, metilação de DNA, radiação UV, pele

ABSTRACT

It is well established that solar UV radiation can cause mutations in DNA and increase the risk of developing skin cancer. However, little is known about the ability of UV radiation to cause epigenetic changes in the skin. DNA methylation, characterised by the addition of a methyl group in cytosines within CpG dinucleotides, can modify gene transcription, leading to decreased expression or even silencing of a gene. Epigenetic changes could represent an important pathway by which environmental factors influence aging and disease risks, with a tissue-specific manner. Epithelial keratins are called cytokeratins, the main function of cytokeratins is to maintain the integrity and mechanical stability through cell-cell contacts with epithelial tissue. The aim of this study was to investigate the sun exposure influence on DNA methylation status in the cytokeratin 14 (*KRT14*) and 19 (*KRT19*) genes of skin cells of subjects without history of skin disease. Skin biopsies were obtained by punch of sun-exposed (outer forearm) and sun-protected areas (inner arm) from 30 corpses of the Brazilian Services of Death Investigation. The *KRT14* gene DNA methylation analysis was performed using Methylation-Specific PCR (MSP), and the *KRT19* gene DNA methylation analysis was performed using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes (MSRE) of sun-exposed and sun-protected skin areas. Statistical analysis showed no significant differences between sun-protected and sun-exposed areas and the most frequently methylated condition for CpG studied for *KRT14* and *KRT19* genes ($p > 0.05$; McNemar). We conclude that sun exposure does not induce changes in DNA methylation status in the *KRT14* and *KRT19* genes.

Keywords: cytokeratin, DNA methylation, epigenetic, UV radiation, skin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH₃ – Grupamento metil

CpG – Citosina/ligação fosfodiester/guanina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

K – Citoqueratina

KDa – Kilo dalton

KRT – Gene da citoqueratina

MBPs - Methyl Binding Proteins

MMPs – Metaloproteases de matriz

MSP – PCR específica para metilação

MSRE- Restrição Enzimática Sensível à Metilação

PCR – Reação em cadeia da polimerase

nm – Nanômetro

pb – Pares de base

SE – Sun-exposed

SEC31L2 – SEC 3 homólogo a B

SP – Sun-protected

SVO – Serviço de verificação de óbitos

TET2 – Tet methylcytosine dioxygenase 2

UVA- Ultra Violeta A

UVB – Ultra Violeta B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epigenética	1
1.2. Radiação Solar	3
1.3. Pele	4
1.4. Queratinas	5
1.5. Justificativa	7
2. OBJETIVOS	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Apresentação	9
3.2 Manuscrito: DNA methylation analysis of cytokeratin 14 (<i>KRT14</i>) and 19 (<i>KRT19</i>) genes of sun- exposed and sun-protected skin areas	10
- Abstract	11
- Introduction	12
- Materials and Methods	14
- Results and Discussion	16
- Table 1	21
- Figure 1	22
- Figure 2	23
- References	24
4. CONCLUSÃO	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
Anexo I	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 - EPIGENETICA

Epigenética é definida como o estudo das modificações do DNA e das histonas que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA. Dentre as modificações que as histonas podem sofrer, estão: metilação, fosforilação e acetilação. Entretanto, na molécula de DNA ocorre apenas a metilação (BERGER et al., 2009). A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da 5-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA-metiltransferase (DNMT).

As DNAs metiltransferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA, conhecidas como metilases de manutenção, como a DNMT1, e outro grupo responsável pela maioria dos processos de metilação de novo, que ocorrem em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2 e DNMT3A e DNMT3B (BESTOR, 2000). A ação destas enzimas requer um substrato que atue como doador de radical metil e estes são obtidos da dieta, como o folato, a metionina, a colina e a vitamina B12 (WATERLAND; JIRTLE, 2003; WATERLAND, 2006).

Estudos revelam que o padrão epigenético é influenciado pelo meio ambiente, e alterações epigenéticas são mais freqüentes que mutações (USHIJIMA; ASADA, 2010)

Os mecanismos epigenéticos são balanceados para garantir que ocorra o desenvolvimento normal das células, garantindo que haja a correta expressão dos genes. Estes mecanismos são altamente regulados por um grande número de proteínas que estabelecem, leem e apagam as marcações epigenéticas específicas, definindo onde e quando a maquinaria de transcrição pode acessar a sequência de DNA (DE BRITO; PACHECO, 2013).

Durante o desenvolvimento e a diferenciação celular, as marcas epigenéticas sofrem mudanças dinâmicas que contribuem para a produção e manutenção de diferentes tipos celulares. A análise de como essas marcas epigenéticas participam da regulação gênica é crucial para o melhor entendimento do desenvolvimento embrionário e a etiologia de muitas doenças (AUCLAIR ; WEBER, 2012).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células

diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, sendo ela randômica ou sítio específica (FEINBERG; TYCKO, 2004). Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genoma dos eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. Estas ilhas são freqüentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes de manutenção que são genes constitutivos, necessários para a manutenção da função celular de base e são expressos em todas as células do organismo sob condições normais e fisiopatológicas. Ilhas CpG são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases citosina e guanina, é comum a presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (LI; DAHIYA, 2002).

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões. A não ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos pode resultar na ausência ou diminuição da transcrição gênica (figura 1). Proteínas chamadas MBPs (Methyl Binding Proteins), com afinidade pelo grupo metil, ligam-se às regiões CpGs localizadas nos promotores e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (ATTWOOD et al. 2002).

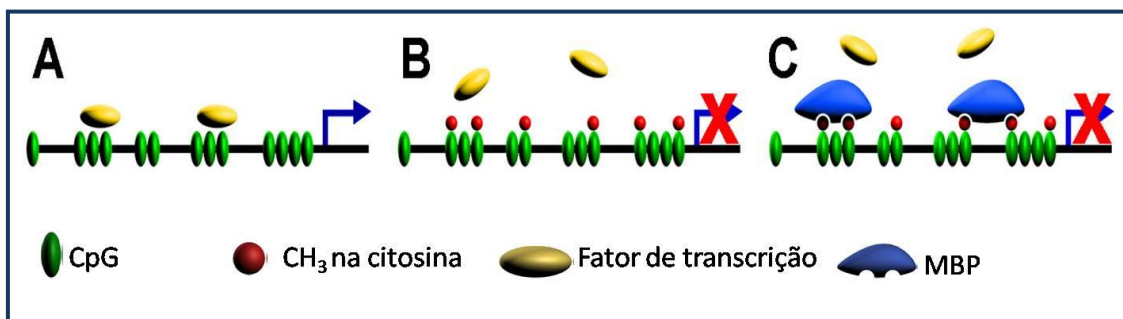


Figura 1. Mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica. **A.** Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **B.** Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **C.** Proteínas que se ligam a metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição. Fonte: Attwood et al. 2002.

O perfil de metilação de DNA pode ser passado por várias gerações e está sempre sendo influenciado por fatores presentes no meio ambiente, como álcool, fumo, medicamentos, radiação solar entre outros agentes químicos e físicos que interferem na regulação e expressão gênica.

1.2 - RADIAÇÃO SOLAR

A maior parte da energia irradiada pelo sol está na região do espectro Ultravioleta (comprimento de 100-400nm) em comparação ao espectro da luz visível (comprimento de 400-700nm). A radiação UV pode ser subdividida em UVA, UVB e UVC. As frações que atingem a Terra são a UVA e UVB. A atmosfera terrestre bloqueia a passagem da radiação UVC, impedindo que ela chegue à superfície do planeta. Os raios ultravioleta B (UVB) (comprimento de 280-320nm) são absorvidos eficientemente, embora incompletamente pela camada de ozônio, enquanto que os raios ultravioleta A (UVA) (comprimento de 320-400nm) são absorvidos menos eficientemente e assim pode ser mais facilmente transmitido para a atmosfera terrestre (CRUTZEN, 1992). Durante muitos anos a diminuição da camada de ozônio tem sido observada como um resultante da atividade humana, principalmente devido à emissão de compostos contendo halogênio resultando em um aumento da dose de UVB sobre a Terra e consequentemente na pele (CRUTZEN, 1992; DE FABO, 2000).

O efeito da radiação solar tem sido uma das maiores preocupações humanas, pois a exposição aguda da pele à radiação UV causa queimaduras, alteração da pigmentação, inflamação, imunossupressão e danos no tecido conjuntivo da derme (DAMIAN et al., 2011). A exposição crônica por muitos anos altera a arquitetura normal da pele causando o envelhecimento prematuro (foto envelhecimento) (FISHER et al., 2002) e câncer de pele (PFEIFER; BESARATINIA, 2012).

O radiação UVB possui efeitos benéficos a saúde do ser humano, como estimulante para a produção de vitamina D, porém exposição aguda aos raios UVB podem causar efeitos deletérios na pele como eritema e fotodermatoses e nos olhos podem ocorrer queratites e conjutivites. (AMBACH; BLUMTHALER, 1993). Os raios UVB penetram na epiderme e causam as queimaduras solares, e é o principal responsável pelas alterações celulares que predispõem ao câncer da pele. Os raios UVA penetram mais profundamente na pele atingindo a derme, com importante participação nas fotoalergias e também predispõe a pele ao surgimento do câncer (ICHIHASHI, M. et al., 2003).

1.3 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano sendo responsável pela termorregulação, pela defesa, pela percepção e pela proteção. Este órgão se apresenta em duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e a derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme, sendo constituído por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina (BAUMANN, 2007)

A pele humana representa um órgão com muitas vantagens para o estudo de alterações induzidas pelo envelhecimento e pelos fatores ambientais, pois é o órgão mais exposto (BAUMANN, 2007; GILHAR et al., 2004).

Absorção da radiação solar UV pelas células da pele altera a estrutura química do DNA e causa estresse oxidativo (BIESALSKI et al., 2003; ICHIHASHI et al., 2003; YAAR; GILCHREST, 2007). Essas alterações ativam vias de sinalização celular que regulam múltiplas funções celulares na pele (FISHER et al., 2002; QUAN et al., 2005; RITTIÉ; FISHER, 2002). Células de mamíferos respondem à radiação UV com várias alterações bioquímicas incluindo a expressão de genes distintos chamados de genes de resposta UV, e já foi mostrado que esses genes estão relacionados à transdução de sinal, defesa antioxidante e controle do ciclo celular (SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 2000; SHAULIAN et al., 2000). Ainda, genes que respondem à radiação UVB compreendem muitas proteases, dentre elas as metaloproteases de matriz (MMPs) (QUAN et al., 2009), as quais degradam os componentes da matriz extracelular (HO et al., 2005), bem como reduzem a produção de pro colágeno tipo I (FISHER et al., 2002).

Alterações na epiderme também são resultados da exposição solar, e estas incluem perda da adesão entre as células, aumento da pigmentação e proliferação celular (POLEFKA et al., 2012), e estas alterações podem acarretar em mudanças no perfil de metilação de certos genes.

1.4 - QUERATINAS

Queratinas são proteínas pertencentes à família de filamentos intermediários, as quais são predominantemente expressas em células epiteliais. As queratinas representam em torno de trinta proteínas, diferindo pelo peso molecular; sendo o mais baixo (40 KDa), as queratinas 8 e 18, as quais são encontradas no epitélio simples e glandular; queratinas de peso molecular intermediário, encontradas no epitélio estratificado; e as mais pesadas queratinas (aproximadamente 67 KDa) são encontradas no epitélio estratificado queratinizado (MOLL et al., 2008).

A família gênica das queratinas consiste no maior número de membros em humanos com 54 genes funcionais distintos: 31 queratinas epiteliais (citoqueratinas), 15 queratinas específicas do cabelo e 8 queratinas da bainha radicular interna (HESSE et al., 2004). De acordo com a proposta do Comitê de Nomenclatura de Queratina (SCHWEIZER et al., 2006), as queratinas estão divididas em dois grupos: tipo I (K9–K10, K12–K28, e K31–K40 incluindo K33a e K33b) as quais são ácidas e codificadas pelo cromossomo 17, enquanto as do tipo II (K1–K8 (incluindo K6a, K6b e K6c, K71–K86) são básicas e codificadas pelo cromossomo 12 (ROMANO V. et al., 1988). Uma propriedade única das queratinas é que em contraste com outras proteínas dos filamentos intermediários, somente conseguem constituir seus filamentos pela formação de heteropolímeros, formando pares de moléculas do tipo I e do tipo II (1:1) (MOLL et al., 1983).

A principal função das queratinas é manter a integridade e estabilidade mecânicas, através de contatos célula-célula do tecido epitelial. Consequentemente, elas são parte inerente da estabilidade contínua de cada célula na formação do tecido. Como os filamentos de queratina são estabilizadores estruturais das células epiteliais, o interesse por essas moléculas abrange o contexto biológico, embriológico, patológico e dermatológico. Tipicamente, os filamentos de queratinas ficam inseridos aos desmossomos e hemidesmossomos. Dessa forma, contribuem não somente com a estabilidade entre as células epiteliais, mas também com a conexão à membrana basal na ligação entre o epitélio e o tecido conjuntivo (MOLL et al., 2008).

As queratinas também são importantes para a polaridade da membrana das células epiteliais (ORIOLO et al., 2007). Dessa forma, as queratinas apresentam além da sua função mecânica, mas também na sinalização celular.

O padrão de expressão das queratinas não só caracterizam as células como epiteliais, mas também as caracterizam como distintas, incluindo o estágio terminal durante a diferenciação epitelial do embrião ao adulto ou o programa interno de

maturação durante o desenvolvimento. As citoqueratinas apresentam distribuição específica para cada subtipo de epitélio, permitindo que sejam utilizadas como importantes marcadores de sua diferenciação. Todos os epitélios estratificados possuem K5 e K14 nas células basais indiferenciadas, mas diferenças emergem na camada suprabasal com a diferenciação (COULOMBE; LEE, 2012)

Enquanto a troca entre proliferação e diferenciação é normalmente controlada e compartimentalizada dentro da camada basal e suprabasal respectivamente, as células mitóticas podem ocorrer nas camadas diferenciadas durante o processo de reparo e em doenças como o câncer (SINGER; CLARK, 1999). Tumores epiteliais, incluindo metástases, em sua maioria retêm o padrão normal de queratinas de seu epitélio de origem (MOLL et al., 1983). De fato, as queratinas são um dos mais potentes marcadores de diferenciação epitelial e marcador tumoral. Técnicas de imunohistoquímica, as quais utilizam anticorpos específicos contra queratinas são usados de forma rotineira em laboratórios para diagnósticos de tumores (BARAK et al., 2004).

A citoqueratina 14 (K14) tipo I e a citoqueratina 5 (K5) tipo II formam o par primário de queratinas do epitélio estratificado escamoso, incluindo a epiderme como também o epitélio estratificado não queratinizado das mucosas (MOLL et al., 1983). Elas são fortemente expressas nas células indiferenciadas da camada basal contendo células-tronco e são menos expressas na camada suprabasal diferenciada (FUCHS; GREEN, 1980). O par K5/K14 são empacotados como tonofilamentos e se ligam aos desmossomos e hemidesmossomos. Mutações nos genes da K14 e K5 têm sido associadas à Epidermólise Bolhosa Simples, doença de pele caracterizada pela fragilidade da epiderme, mesmo em traumas leves como fricção (ISHIDA-YAMAMOTO; AKEMI ET AL., 1991).

A citoqueratina 19 (K19) tipo I é a menor e diferente das outras queratinas, uma vez que não apresenta cauda alfa-helicoidal (BADER et al., 1986) é expressa em epitélio simples, além de epitélio pseudoestratificado como também na camada basal de células do epitélio estratificado não queratinizado. Já foi observado na mucosa oral que a expressão de K19 pode ser induzida por displasia (LINDBERG; RHEINWALD, 1989) e inflamação (MOLL et al., 1983). Recentemente, aumento da expressão da K19 foi observado em câncer de tireoide e de fígado (SETHI et al., 2011). Alguns estudos mostram que a K19 é regulada epigeneticamente (PAIVA et al., 2011; PLACHOT; LELIÈVRE, 2004).

Os genes da queratina 14 (*KRT14*) e 19 (*KRT19*) estão localizados no cromossomo 17 e não possuem ilhas CpG em suas regiões promotora, porém na região proximal do éxon1 da *KRT14* há diversos dinucleotídeos CG espalhados, e na região proximal do gene da *KRT19* há uma ilha CpG com 606 pb, como verificado pelo Programa MethPrimer.

1.5 - JUSTIFICATIVA

Estudos de metilação de DNA têm emergido como um importante campo de pesquisa e revelam como o meio ambiente pode afetar nossos genes e alterar drasticamente a expressão gênica, resultando em doenças inflamatórias e tumorais, ou mesmo no envelhecimento.

Já está bem estabelecido como a radiação UV do sol pode causar mutações no DNA e aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pele (PFEIFER; BESARATINIA, 2009). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a capacidade da radiação UV em causar alterações epigenéticas na pele, e esse pode ser outro mecanismo pelo qual a exposição crônica ao sol leva a tumorigênese.

A maioria das evidências em amostras não tumorais de que a radiação ultravioleta pode causar alterações epigenéticas no DNA são oriundas de trabalhos experimentais com ratos, linhagem celulares ou pele reconstruídas *in vitro* (BERNERD, 2001; MITTAL et al., 2003; NANDAKUMAR et al., 2011; CHEN et al., 2012). Raros são os estudos utilizando amostras de pele obtidas de humanos. Um desses estudos mostrou hipermetilação no gene *CDH1* (*cadherin1*) em regiões expostas ao sol (SATHYANARAYANA et al., 2007). Outro estudo revelou tendência à hipometilação no promotor dos genes *KRT75* (*queratina 75*), *SEC31L2* (*SEC31 homolog a B (S. cerevisiae)*), *DDAH2* (*dimethyl arginine dimethyl aminohydrolase 2*) e *TET2* (*tetramethyl cytosine dioxygenase 2*) em amostras de pele expostas ao sol e em adição, mostrou ainda que, essas alterações eram mais acentuadas em indivíduos mais velhos (GRÖNNIGER et al., 2010).

Proteínas do citoesqueleto, como as citoqueratinas presentes no tecido epitelial já foram descritas estarem desreguladas em amostras não tumorais de peles expostas a radiação solar (BERNERD, 2001) e em amostras tumorais (HADLER-OLSEN et al., 2011). Contudo, nada se sabe sobre o mecanismo molecular pelo qual a expressão dessas proteínas em peles expostas a radiação solar sofreram desregulação.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da exposição solar sobre o estado de metilação do DNA no promotor dos genes *KRT14* e *KRT19* em amostras de células da pele de indivíduos sem histórico de doenças de pele.

3. RESULTADOS

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “*Biologicals*” e encontra-se em análise.

3.1 - DNA methylation analysis of cytokeratin 14 (*KRT14*) and 19 (*KRT19*) genes of sun-exposed and sun-protected skin areas

HALINE BARROSO¹, ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO¹, DANIEL UCHÔA DE ARAÚJO², FRANCISCO RUIDOMAR PEREIRA³, NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA^{1,2}

A manuscript number has been assigned: BIOLS...

Biologicals

Hoje em 7:51 AM

Para eu

Biologicals

Ref: BIOLS-D-15-00016

Title: DNA methylation analysis of cytokeratin 14 (KRT14) and 19 (KRT19) genes of sun-exposed and sun-protected skin areas

Authors: Haline Barroso, Ms; Naila FP Oliveira, Ph.D; Alanne R Melo, Ms; Daniel U Araújo, Graduate; Francisco R Pereira, Graduate

Article Type: Research Paper

Dear Naila Francis,

Your submission entitled "DNA methylation analysis of cytokeratin 14 (KRT14) and 19 (KRT19) genes of sun-exposed and sun-protected skin areas" has been assigned the following manuscript number: BIOLS-D-15-00016.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/biols/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Biologicals

3.2 – Manuscrito

DNA methylation analysis of cytokeratin 14 (*KRT14*) and 19 (*KRT19*) genes of sun-exposed and sun-protected skin areas

HALINE BARROSO¹, ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO¹, DANIEL UCHÔA DE ARAÚJO², FRANCISCO RUIDOMAR PEREIRA³, NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA^{1,2}

¹ Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

² Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

³ Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

Corresponding Author:

Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Biologia Molecular

Cidade Universitária – Campus I

João Pessoa-PB

Brazil

CEP 58051-900

Phone: +55 83 3216-7643

naila_francis@yahoo.com.br

ABSTRACT

The ability of environmental factors to induce epigenetic changes has been investigated and many studies have shown a relationship between them. The aim of this study was to investigate the sun exposure influence on DNA methylation status in the cytokeratin 14 (*KRT14*) and cytokeratin 19 (*KRT19*) genes of skin cells of subjects without history of skin disease. Skin biopsies were obtained by punch of sun-exposed (outer forearm) and sun-protected areas (inner arm) from 30 corpses of the Brazilian Service of Death Investigation and genomic DNA was extracted. *KRT14* DNA methylation analysis was performed using Methylation-Specific PCR (MSP) and *KRT19* DNA methylation analysis was performed using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes (MSRE) of sun-exposed and sun-protected skin areas. The methylated condition was found to be a common event in skin cells for both *KRT14* and *KRT19* genes and no differences were found among areas ($p>0.05$; McNemar). We conclude that sun exposure does not induce changes in DNA methylation status in the *KRT14* and *KRT19* genes.

Key words: epigenetic, DNA methylation, UV radiation, cytokeratin, skin, sun

1. Introduction

The effect of solar radiation is one of the greatest human concerns. Acute exposure of the skin to UV radiation causes burns, abnormal pigmentation, inflammation, immunosuppression and damage to the connective tissue of the dermis [1,2,3]. Chronic exposure over many years could change the normal architecture of the dermis and epidermis causing premature aging (photoaging) [4] and skin cancer [5]. Data from the National Cancer Institute (INCA-Ministry of Health-Brazil) have shown that skin cancer is what most affects Brazilians, especially in the Northeast, where UV levels are high for most of the year [6].

Absorption of UV radiation by skin cells alters the chemical structure of DNA and causes oxidative stress [7,8]. These changes activate signalling pathways that regulate many cellular functions of the skin [4,9,10]. Mammalian cells respond to UV radiation with various biochemical alterations, including the expression of different genes called UV response genes, and it has been shown that these genes are related to signal transduction, antioxidant defence and cell cycle control [11,12]. It is well established that solar UV radiation can cause mutations in DNA and increase the risk of developing skin cancer [13]. However, little is known about the ability of UV radiation to cause epigenetic changes in the skin, and this may be another mechanism by which chronic exposure to the sun leads to tumorigenesis.

Epigenetic information is defined as information other than the DNA sequence that is faithfully replicated upon somatic cell replication. It is carried by DNA methylation, post-translational histone modifications, and non-coding RNAs, all of which are related to gene expression and chromatin structure. In particular, DNA methylation, characterised by the addition of a methyl group in cytosines within CpG dinucleotides, can modify gene transcription, leading to decreased expression or even silencing of a gene [14]. The ability of environmental factors to induce epigenetic changes has been investigated and many studies have shown a relationship between them. Studies have shown that fungicides [15], metal

ions [16,17], drugs [18], diet [19], alcohol dependence [20] and smoking [21] are all associated with epigenetic changes.

Surprisingly, the number of studies examining the effects of sun exposure on DNA methylation is limited. Most evidence in non-tumour samples that ultraviolet radiation can cause epigenetic changes is derived from experimental studies with mice or cell culture [22,23,24]. Studies using skin samples obtained from humans suffering from sun exposure are scarce [25,26].

Epidermal architecture is maintained by a family of proteins that compose intermediate filaments of the cytoskeleton, such as keratins. Epithelial keratins are called cytokeratins, which Moll et al. [27] classified into 20 subtypes according to their molecular weight and isoelectric pH in an attempt to clarify the diversity and expression patterns of keratins among epithelial tissue types. The main function of cytokeratins is to maintain the integrity and mechanical stability through cell-cell contacts with epithelial tissue. It has been shown that these proteins are dysregulated in non-tumour samples of skin cells exposed to UV radiation, especially cytokeratins 14 and 19 [28], and also in tumour samples [29].

Based on these facts and in order to contribute more data on the ability of sun exposure causes epigenetic changes, we hypothesised that sun radiation could alter the DNA methylation profile on the cytokeratin 14 (*KRT14*) and cytokeratin 19 (*KRT19*) genes of skin cells of subjects with no history of skin disease.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement and Subject Population

Prior to commencement, the study design was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Paraiba (protocol number 430/2011). The sample covered male and female corpses of the Brazilian Service of Death Investigation aged over 30 years. The family of each individual was prompted to sign the consent and agree to participate in the study. The demographic data and general health were obtained via record and individuals with a medical history of skin diseases were not included. Skin samples were collected and ranked according to the criteria of Fitzpatrick [30]. A sample of 30 unrelated subjects was included, and samples were divided into two conditions according to sun exposure: sun-exposed areas (SE) and sun-protected areas (SP).

2.2. Sample Collection and DNA Extraction

Biopsies were collected by punch (5mm diameter) from the outer forearm (sun-exposed area) and inner arm (sun-protected area) up to 10 hours after death. Immediately after removal, biopsies (epidermis and dermis) were stored in a tube containing 800 µL of RNAholder (Bioagency, São Paulo, SP, Brazil) and frozen at -20°C until analyses were performed. After, genomic DNA of skin biopsies was purified using the TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. DNA quantification was performed by NanoDrop spectrophotometer. Samples were then frozen at -20°C until DNA methylation analysis.

2.3. DNA Methylation Analysis

KRT14 - DNA Methylation analysis was performed using Methylation-Specific PCR (MSP) [31]. Bisulphite modification of genomic DNA (800 ng) was performed with the EZ

DNA Methylation-Gold kit, according to the manufacturer's instructions. Two fragments were amplified with specific primers for either methylated or unmethylated targets. Each MSP reaction incorporated 100ng of bisulphite modified DNA, 1 μ L (10 μ M) of each primer and 1x Go Taq Hot Start Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, USA) in a final reaction of 20 μ L. Methylated and unmethylated cycling conditions were as follows: 95°C x 5 minutes; 40 cycles x (95°C x 1 min, specific for fragment A and B) x 1 min, 72°C x 1 min); and 72°C x 5 min (Table 01). Methylated (Methylated CpG Jurkat Genomic DNA, New England Biolabs) and unmethylated (5-Aza-dc Treated Jurkat Genomic DNA, New England Biolabs) DNA was modified as previously quoted and amplified by PCR as control reactions with primers for the methylated and unmethylated condition, respectively. Amplified PCR samples (6 μ l) were loaded in 6% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after silver staining.

KRT19 – Optimal primers for methylation analysis by MSP for the region of interest of this gene were not found. Therefore, DNA Methylation analysis of *KRT19* was performed using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes (MSRE) [32]. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed, which relied on the inability of restriction enzymes to digest methylated sequences. The examined sites were recognised by one of the following restriction enzymes, whose activity was always blocked by CpG methylation: *HhaI* and *HpaII*. Genomic DNA (100ng) was completely digested with the restriction enzymes in a total volume of 20 μ L, as recommended by the manufacturer (New England Biolabs, Beverly, MA). The reaction with each restriction enzyme was conducted in an individual manner. The concentrations of the restriction enzymes, as well as the amount of DNA to be digested, have been previously described and calculated [32]. After digestion, 2.7 μ L (20ng) of each solution was pipetted into a 15 μ l PCR mixture containing 7.5 μ l Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, USA), and 1 μ l (10pmol) of each primer, sense and antisense. A specific number of cycles of the PCR reaction was defined at the exponential phase of amplification. The PCR was performed under the following conditions: 94°C x 5 minutes; 35

cycles x (95°C for 1min., 58°C for 1 min. and 72°C for 1 min) and 72°C for 1 min. (Table 1). The non-enzyme-treated control DNA sample was always amplified with primers, in parallel with the enzyme-treated samples, and both were subjected to electrophoresis in adjacent lanes. This provided a positive control for the PCR reaction and for DNA loading. Amplified PCR samples (6µl) were loaded in 6% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after silver staining.

2.4. Statistical Analysis

DNA methylation status among the two conditions was compared by paired non-parametric McNemar Test at a level of 5% using the BIOESTAT 5.0 software (Instituto Mamiraua, Brazil) [33].

3. Results and Discussion

There are many evidences that epigenetic changes are an important mechanism for aging and disease development. Both intrinsic and environmental factors, or a combination of both, may trigger these changes and lead to aging and disease. The most studied environmental factor is cigarette smoke. Little is known about whether sun exposure causes epigenetic changes. It is known that UV radiation is strongly associated with the development of skin cancer and this ability is directly linked to causative mutations; however, the association between UV radiation and epimutations is still limited. In addition, in Brazil, the UV levels are high throughout much of the year, and especially in the Northeast, where the skin cancer rates are also high. Therefore, we were curious to study the effect of solar radiation on the most exposed organ.

This study analysed the influence of sun exposure on the DNA methylation profile in genes of the cytokeratin family related to tumorigenesis [29], epidermolysis bullosa [34],

aging [35] and photoaging [36]. In particular, *KRT14* and *KRT19* are located on chromosome 17, and the protein products have a MW of 50 and 40 kDa, respectively [37].

KRT14 - Twenty-eight subjects aged 30-89 years old (60.7 ± 17.6 ; mean $\pm$ SD) were enrolled in the study. Of these, 15 were women and 13 were men. According to skin type, 9 were classified as type III (light brown), 12 as type IV (moderate brown) and 7 as type V (dark brown).

MethPrimer software was used to search CpG islands and sparse CG dinucleotides for *KRT14* analysis and we observed that there is no CpG island in the promoter; however, in the proximal exon 1 there are several CpG sites. The optimal primers were selected for three CpG sites located at position +116, +226 and +272. We observed that most individuals had skin cells in both sun-exposed and sun-protected areas that were positive to the methylated condition ($p > 0.05$) (Figure 1). To date, there have been no studies on the DNA methylation profile in the human *KRT14* gene in any context.

KRT19 - Thirty subjects aged 30-89 years old (61.8 ± 18.0 ; mean $\pm$ SD) were enrolled in the study. Of these, 16 were women and 14 were men. According to skin type, 10 were classified as type III (light brown), 13 as type IV (moderate brown) and 7 as type V (dark brown).

Also, in the *KRT19* gene promoter, there is no CpG island, as verified by MethPrimer Software; however, in the proximal exon 1, there is one CpG island with 606 bp and we selected two CpG sites located at position +44, which was recognised by *HpaII*, and +81, recognised by *HhaI*. Our data show that the predominant condition was methylated in both sun-exposed and sun-protected areas ($p > 0.05$) (Figure 2). *KRT19* hypermethylation of tumour cell lines was shown in renal cancer, but has not been confirmed in samples from patients with renal cancer [38]. However, in the same study, it was observed that *KRT19* expression is epigenetically regulated.

The data obtained from skin obtained from humans are limited, but it seems that methylation in sun-exposed areas occurs in a specific way. *CDH1* methylation was highly significantly related to sun exposure, and sun-protected specimens had little or no methylation [25]. Another study revealed a tendency to hypomethylation in the promoter of *KRT75* (keratin 75) in skin samples exposed to sunlight. The same study in the promoters genes *SEC31L2* (SEC31 homolog a B (*S. cerevisiae*), *DDAH2* (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2) and *TET2* genes (tet methylcytosine dioxygenase 2) were found hypermethylated and these changes were more pronounced in older individuals [26]. However, the same study showed no differences between the sun-protected and sun-exposed areas in other CpG sites studied.

Regarding the analysis of gene expression obtained from the skin of sun-exposed and sun-protected areas, the decreased expression of several genes expressed in both the dermis and the epidermis, including cytokeratin family genes, collagen, claudin, aquaporin, and elastin, among others, has been shown [39], along with increased levels of the stratifin protein, which is expressed ubiquitously [40].

Intrinsic factors such as age and gender are also associated with different DNA methylation between individuals [41,42,43]. Although our demographic data show variations in age and gender among individuals, in addition to skin type, we observed that the most commonly found DNA methylation status (methylated condition) reached high frequencies, showing that age, gender and skin type do not influence the methylation profile of the genes studied (Figures 1B, D and 2B, C).

Most of the evidence in non-tumour samples that ultraviolet radiation can cause epigenetic changes in DNA are from experimental studies with rodents or cell lineage [22,23,24]. However, other studies have revealed that UVB irradiation of keratinocytes has no recognisable global effect on DNA methylation patterns [44]. Some authors suggest that changes in DNA methylation, as observed in skin cancers [45], are not immediate consequences of human exposure to UVB irradiation [44]. These studies are important

because they can demonstrate how UVA and UVB radiation, which seem to cause different effects [28], can affect the epigenetic profile of the cells. However, the controlled environment of the cell cultures and rodents studies rule out other environmental factors and intrinsic factors of the individuals, which can be protectors or promoters of epigenetic changes.

Epigenetic changes could represent an important pathway by which environmental factors influence aging and disease risks, with a tissue-specific manner. Such comparative analyses could lead to an improved biological understanding of skin aging and photoaging, as well as key biomarkers and new targets for therapeutic intervention of skin diseases.

Our data show that the methylated condition for CpG studied sites for *KRT14* and *KRT19* genes is a common feature of skin cells. Therefore, we conclude that sun exposure does not induce changes in DNA methylation status in *KRT14* and *KRT19* genes.

Funding

This study was supported by the Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do CCEN da Universidade Federal da Paraíba and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. Haline Barroso and Alanne R S Melo were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. Daniel U Araújo was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq), Brazil.

Acknowledgements

We thank the Brazilian Service of Death Investigation (João Pessoa/PB) and all of the families of the study population for allowing the collection of skin samples.

Conflict of interest. None.

Table 1. Primers sequences for *KRT14* (GenBank accession number NG_008624.1) and *KTR19* genes (GenBank accession number AF202321.1), and DNA methylation analysis conditions.

Gene	Primer (3'-5') F/R	Fragment Size (bp)	Anneling Temperature (°C)	Cycles
<i>KRT14 A</i> (MSP)	tttagttttatgaagggttttgc (M) gaaaaaataaaacaaacaaaccg (M)	137	47	40
	ttagttttatgaagggttttgc (U) aaaaaaataaaacaaacaaaccacc (U)	135	48	40
<i>KRT14 B</i> (MSP)	tttagttttatgaagggttttgc (M) tactactactactaaaaccaccgcc (M)	202	49	40
	ttagttttatgaagggttttgc (U) tactactactactaaaaccaccacc (U)	202	50	40
<i>KRT19</i> (MSRE)	tgaagagtgggaggagatgg ggtggaccagatcaccaaag (<i>HhaI</i> and <i>HpaII</i> CpG site)	110	58	35

* F-Forward, R-Reverse, M-methylated, U-methylated, MSP- Methylation Specific PCR, MSRE- Methylation Sensitive Restriction Enzymes

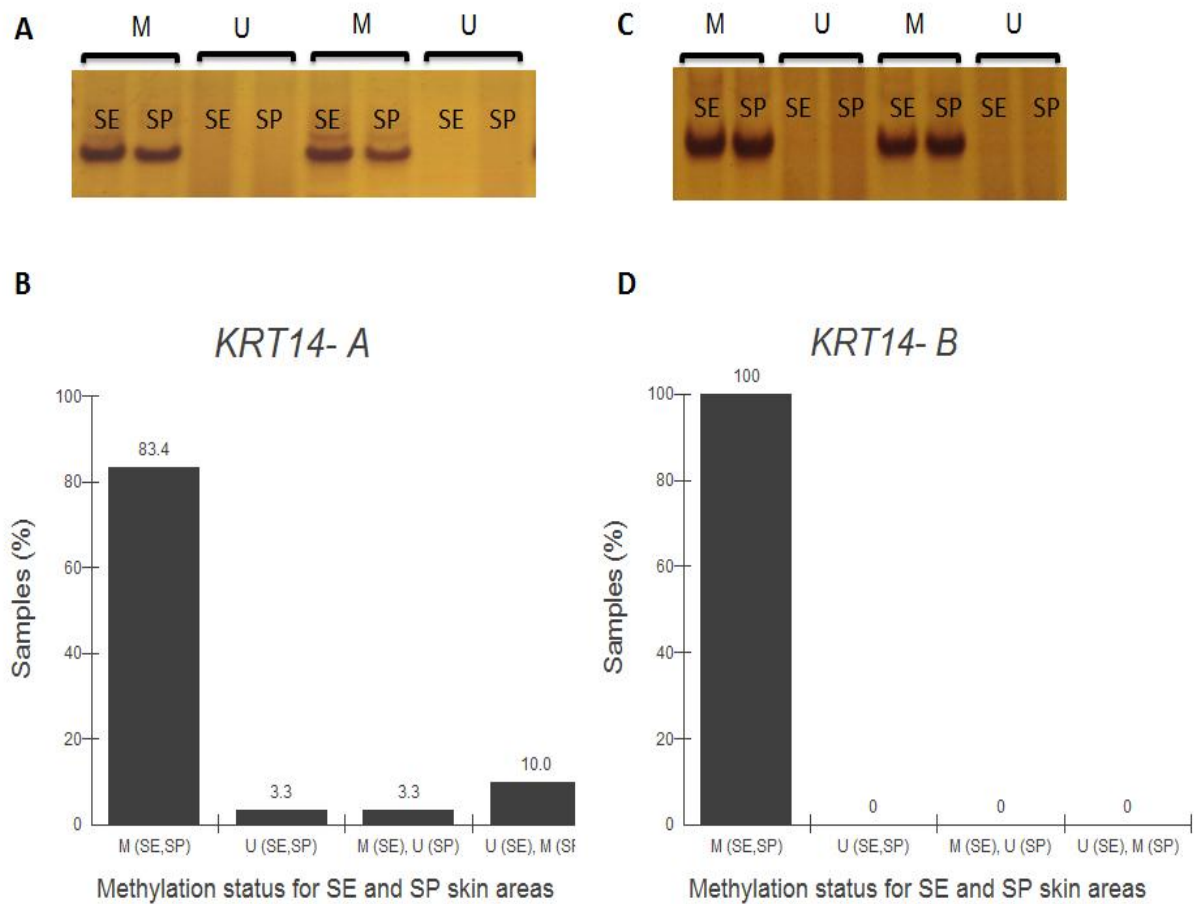


Figure 1 - DNA methylation analysis of *KRT14* proximal exon 1 of skin cells. **(A)** Bands of two representative samples obtained after polymerase chain reaction of *KRT14* fragment A (135 (M) and 137 (U) bp). **(B)** Methylation status of the *KRT14* gene ($p > 0.05$; McNemar; $n = 28$). **(C)** Bands of two representative samples obtained after polymerase chain reaction of *KRT14* fragment B (202 bp). **(D)** Methylation status of the *KRT14* gene ($p > 0.05$; McNemar; $n = 28$). M - methylated, U – unmethylated, SE - sun-exposed, SP - sun-protected.

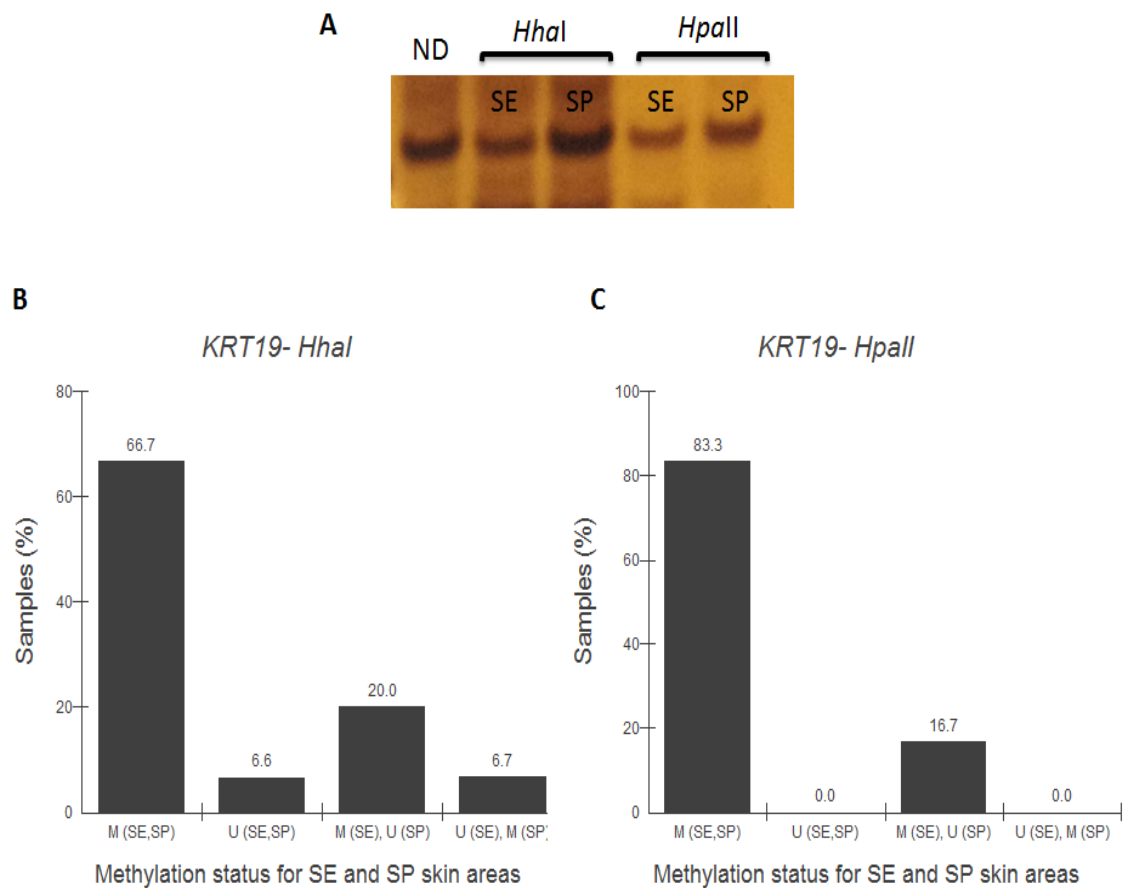


Figure 2 - DNA methylation analysis of *KRT19* proximal exon 1 of skin cells. **(A)** Bands of representative sample obtained after polymerase chain reaction of *KRT19* (110 bp). **(B)** Methylation status of the *KRT19* gene ($p > 0.05$; McNemar; $n=30$). ND - non-digested sample, SE - sun-exposed, SP - sun-protected. *HhaI* – GCGC site, *HpaII* - CCGG site.

REFERENCES

- [1] Ambach W, Blumthaler M. Biological effectiveness of solar UV radiation in humans. *Experientia* 1993;49:747–53.
- [2] Coelho SG, Choi W, Brenner M, Miyamura Y, Yamaguchi Y, Wolber R, et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2009;14:32–5.
- [3] Damian DL, Matthews YJ, Phan TA, Halliday GM. An action spectrum for ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *Br J Dermatol* 2011;164:657–9.
- [4] Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002;138:1462–70.
- [5] Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11:90–7.
- [6] Inca. Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014.
- [7] Biesalski HK, Berneburg M, Grune T, Kerscher M, Krutmann J, Raab W, et al. Oxidative and premature skin ageing. *Exp Dermatol* 2003;12:3–15.
- [8] Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 2007;157:874–87.
- [9] Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2005;280:8079–85.
- [10] Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002;1:705–20.
- [11] Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 2000;35:307–16.
- [12] Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 2000;103:897–907.
- [13] Pfeifer G, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet* 2009;125:493–506.
- [14] Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:192–206.
- [15] Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 2006;147:5515–23.
- [16] Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 2003;286:355–65.

- [17] Shiao Y-H, Crawford EB, Anderson LM, Patel P, Ko K. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;205:290–6.
- [18] Novikova SI, He F, Bai J, Cutrufello NJ, Lidow MS, Undieh AS. Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS One* 2008;3:e1919.
- [19] Sable P, Randhir K, Kale A, Chavan-Gautam P, Joshi S. Maternal micronutrients and brain global methylation patterns in the offspring. *Nutr Neurosci* 2013;18.
- [20] Zhang R, Miao Q, Wang C, Zhao R, Li W, Haile CN, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol* 2013;18:392–403.
- [21] Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Bacherman H, Rennard SI, et al. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hum Mol Genet* 2012;21:3073–82.
- [22] Mittal A, Piyathilake C, Hara Y, Katiyar SK. Exceptionally High Protection of Photocarcinogenesis by Topical Application of (-)-Epi gal locotechnin-3-Gal late in Hydrophilic Cream in SKH-1 Hairless Mouse Model: Relationship to Inhibition of UVB-Induced Global DNA Hypomethylation. *Neoplasia* 2003;5:555–65.
- [23] Nandakumar V, Vaid M, Tollefsbol TO, Katiyar SK. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis* 2011;32:597–604.
- [24] Chen I-P, Henning S, Faust A, Boukamp P, Volkmer B, Greinert R. UVA-induced epigenetic regulation of P16(INK4a) in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11:180–90.
- [25] Sathyanarayana UG, Moore AY, Li L, Padar A, Majmudar K, Stastny V, et al. Sun exposure related methylation in malignant and non-malignant skin lesions. *Cancer Lett* 2007;245:112–20.
- [26] Grönniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stäb F, Wenck H, et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 2010;6:e1000971.
- [27] Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129:705–33.
- [28] Bernerd F, Del Bino S, Asselineau D. Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet a exposure. *J Invest Dermatol* 2001;117:1421–9.
- [29] Kurokawa I, Takahashi K, Moll I, Moll R. Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders - distribution and clinical significance. *Exp Dermatol* 2011;20:217–28.
- [30] Fitzpatrick TB. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI 1988:2–4. *Arch Dermatol* 124(6):869–71.

- [31] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821–6.
- [32] Hashimoto K, Kokubun S, Itoi E, Roach HI. Improved quantification of DNA methylation using methylation-sensitive restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics* 2007;2:86–91.
- [33] Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos ADAS. BioEstat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Soc Civ Mamirauá/Imprensa Do Estado Do Pará 2007.
- [34] Coulombe P a, Lee C-H. Defining Keratin Protein Function in Skin Epithelia: Epidermolysis Bullosa Simplex and Its Aftermath. *J Invest Dermatol* 2012;132:763–75.
- [35] Oender K, Trost A, Lanschuetzer C, Laimer M, Emberger M, Breitenbach M, et al. Cytokeratin-related loss of cellular integrity is not a major driving force of human intrinsic skin aging. *Mech Ageing Dev* 2008;129:563–71.
- [36] Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, et al. Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *Am J Pathol* 2009;174:401–13.
- [37] Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 2009;214:516–59.
- [38] Paiva F, Duarte-Pereira S, Costa VL, Ramalho-Carvalho J, Patrício P, Ribeiro FR, et al. Functional and epigenetic characterization of the *KRT19* gene in renal cell neoplasms. *DNA Cell Biol* 2011;30:85–90.
- [39] McGrath J a., Robinson MK, Binder RL. Skin differences based on age and chronicity of ultraviolet exposure: Results from a gene expression profiling study. *Br J Dermatol* 2012;166:9–15.
- [40] Adachi H, Murakami Y, Tanaka H, Nakata S. Increase of stratifin triggered by ultraviolet irradiation is possibly related to premature aging of human skin *Exp Dermatol* 2014 Suppl 1:32-6.
- [41] El-Maarri O, Becker T, Junen J, Manzoor SS, Diaz-Lacava A, Schwaab R, et al. Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: A tendency toward higher methylation levels in males. *Hum Genet* 2007;122:505–14.
- [42] Thompson RF, Atzmon G, Gheorghe C, Liang HQ, Lowes C, Greally JM, et al. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 2010;9:506–18.
- [43] Bezerra, SFO, Costa LA, Freitas PAN, de Oliveira NFP. Age-related Changes in DNA Methylation Status of *hTERT* Gene Promoter of Oral Epithelial Cells. *Brazilian Arch Biol Technol* 2015;58:82-89.
- [44] Lahtz C, Kim S-I, Bates SE, Li AX, Wu X, Pfeifer GP. UVB irradiation does not directly induce detectable changes of DNA methylation in human keratinocytes. *F1000Research* 2013;2:45.

- [45] Wu J, Zhang J, Qin J. Clinical significance of methylation of E-cadherin and p14ARF gene promoters in skin squamous cell carcinoma tissues. Clin Exp Med 2014;7:1808–12.

4. CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que a condição metilada é um aspecto comum dos genes *KRT14* e *KRT19* em células da pele. Assim, concluímos que a exposição solar não influencia o perfil de metilação desses genes.

REFERÊNCIAS*

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. Cellular and Molecular Life Sciences. **Cell Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 241– 257, 2002.

AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2202–11, 2012.

BADER, B. L. et al. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. **The EMBO journal**, v. 5, n. 8, p. 1865–1875, 1986.

BARAK, V. et al. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 529-40, 2004

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of pathology**, v. 211, n. 2, p. 241–51, 2007.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 781–3, 2009.

BERNERD, F. ET AL. Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet a exposure. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1421–9, 2001.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 16, p. 2395–2402, 2000.

BIESALSKI, H. K. et al. Oxidative and premature skin ageing. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 3–15, 2003.

CHEN, I. P. et al. UVA-induced epigenetic regulation of P16(INK4a) in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 11, n. 1, p. 180–90, 2012.

COULOMBE, P. A. ; LEE, C. Defining keratin protein function in skin ephitelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath. **Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 3, p. 763-75, 2012.

CRUTZEN, P. J. Ultraviolet on the increase. **Nature**, v. 356, n. 6365, p. 104–105, 1992.

DAMIAN, D. L. et al. An action spectrum for ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. **The British journal of dermatology**, v. 164, n. 3, p. 657–9, 2011.

DE BRITO O. C. E.; PACHECO C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125, 24, 2013.

DE FABO, E. YR. Arctic stratospheric ozone depletion and increased UVB radiation: potential impacts to human health. **International journal of circumpolar health**, v. 64, n. 5, p. 509–22, 2000.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature reviews Cancer**, v. 4, n. February, p. 143–153, 2004.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of dermatology**, v. 138, p. 1462–1470, 2002.

FUCHS, E.; GREEN, H. Changes in Keratin Gene Expression Differentiation of the Keratinocyte during Terminal. **Cell**, v. 19, n. April, p. 1033–1042, 1980.

GILHAR, A. et al. Aging of human epidermis: reversal of aging changes correlates with reversal of keratinocyte fas expression and apoptosis. **The journals of gerontology**, v. 59, n. 5, p. 411–415, 2004.

GRÖNNIGER, E. et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS genetics**, v. 6, n. 5, p. e1000971, 2010.

HADLER-OLSEN, E. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **The FEBS journal**, v. 278, n. 1, p. 28–45, 2011.

HESSE, M. et al. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. **European journal of cell biology**, v. 83, p. 19–26, 2004.

HO, J. N. et al. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1244–1248, 2005.

ICHIHASHI, M. et al. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 21–39, 2003.

ISHIDA-YAMAMOTO, Akemi et al. Epidermolysis bullosa simplex (Dowling-Meara type) is a genetic disease characterized by an abnormal keratin-filament network involving keratins K5 and K14. **Journal of investigative dermatology**, v. 97, n. 6, p. 959-968, 1991.

LI, L.-C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427–31, 2002.

LINDBERG, K.; RHEINWALD, J. G. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. **The American journal of pathology**, v. 134, n. 1, p. 89–98, 1989.

MITTAL, A. et al. Exceptionally High Protection of Photocarcinogenesis by Topical Application of (-)-Epi galocatechin-3-Gal late in Hydrophilic Cream in SKH-1 Hairless Mouse Model: Relationship to Inhibition of UVB-Induced Global DNA Hypomethylation. **Neoplasia**, v. 5, n. 6, p. 555–565, 2003.

MOLL, R. et al. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and cell biology**, v. 129, n. 6, p. 705–33, 2008.

MOLL, R. et al. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 23, n. 3, p. 256–69, 1983.

NANDAKUMAR, V. et al. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 4, p. 597–604, 2011.

ORIOLO, A. S. et al. GCP6 Binds to Intermediate Filaments : A Novel Function of Keratins in the Organization of Microtubules in Epithelial Cells. **Molecular Biology of the cell**, v. 18, n. March, p. 781–794, 2007.

PAIVA, F. et al. Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms. **DNA and cell biology**, v. 30, n. 2, p. 85–90, 2011.

PFEIFER, G.; BESARATINIA, A. Mutational spectra of human cancer. **Human genetics**, v. 125, n. 5-6, p. 493–506, 2009.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 11, n. 1, p. 90–7, 2012.

PLACHOT, C.; LELIÈVRE, S. A. DNA methylation control of tissue polarity and cellular differentiation in the mammary epithelium. **Experimental Cell Research**, v. 298, p. 122–132, 2004.

POLEFKA, T. G. et al. Effects of solar radiation on the skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 11, n. 2, p. 134–43, 2012.

QUAN, T. et al. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8079–85, 2005.

QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. In. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**.p. 20-24, 2009.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 1, n. 4, p. 705-720, 2002.

ROMANO V. ET. AL. Chromosomal assignments of human type I and type II cytokeratin genes to different chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 48, p. 148–151, 1988.

SATHYANARAYANA, U. G. et al. Sun exposure related methylation in malignant and non-malignant skin lesions. **Cancer letters**, v. 245, n. 1-2, p. 112–20, 2007.

SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 3, p. 307–316, 2000.

SCHWEIZER, J. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 2, p. 169–174, 2006.

SETHI, K. et al. Expressions of CK-19, NF-kappaB, E-cadherin, beta-catenin and EGFR as diagnostic and prognostic markers by immunohistochemical analysis in thyroid carcinoma. **Journal of experimental therapeutics & oncology**, v. 9, p. 187–99, 2011.

SHAULIAN, E. et al. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. **Cell**, v. 245, n. 1-2, p. 112–20, 8 jan. 2000.

SINGER AJ; CLARK RA. inter- leukin-1, transforming growth factor. **The New England Journal of Medicina**, p. 738–746, 1999.

USHIJIMA, T.; ASADA, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer science**, v. 101, n. 2, p. 300–5, 2010.

WATERLAND, R. A. Assessing the Effects of High Methionine Intake on DNA Methylation. **J. Nutr.**, v. 136, n. 6, p. 1706S–1710, 2006.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable Elements : Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 15, p. 5293–5300, 2003.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **The British journal of dermatology**, v. 157, n. 5, p. 874–87, 2007.

* De acordo com as normas do PPGBCM/UFPB, baseadas nas normas da ABNT.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES
HUMANOS - CEP**

CERTIDÃO

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário Lauro Wanderley
Universidade Federal da Paraíba

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 27/09/2011, após análise do parecer do relator, resolveu considerar **APROVADO** o projeto de pesquisa intitulado **INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SOLAR NO PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DA PELE: ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO PROTEICA**. Protocolo CEP/HULW nº. 430/11, Folha de Rosto nº 457823, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE Nº 0082.0.462.126-11, da pesquisadora **NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA**.

Informamos que qualquer alteração no Projeto e dificuldades no curso da pesquisa, assim como os eventos adversos deverão ser comunicadas a este Comitê de Ética em Pesquisa através dos pesquisadores.

Ao final da pesquisa, solicitamos enviar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

João Pessoa, 04 de outubro de 2011.

Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa

Profª Drª Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 4º andar. Campus I – Cidade Universitária.
Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58051-900 CNPJ: 24098477/007-05
Fone: (83) 32167964 — Fone/fax: (083)32167522 E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br