



**BAG**  
Journal of  
Basic & Applied Genetics

---

## COMUNICACIONES LIBRES

---



EPG

# EPIGENÉTICA

## EPG 1

### VARIACIÓN SOMACLONAL Y CAMBIOS EN LA METILACIÓN DE ADN EN PLANTAS DE AJO CULTIVADAS *IN VITRO*

Gimenez MD<sup>1</sup>, S García Lampasona<sup>1</sup>, VC Conci<sup>2</sup>, JL Burba<sup>3</sup>.  
<sup>1</sup>Laboratorio de Biología y Genética Molecular Vegetal, INTA-IBAM (CONICET, UNCuyo), <sup>2</sup>Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) CIAP-INTA, <sup>3</sup>EEA La Consulta INTA.  
 e-mail: mdgimenez@fca.uncu.edu.ar

El ajo común (*Allium sativum* L) es sometido a cultivo *in vitro* para obtener bulbos libres de virus y mejorar la producción. Sin embargo, antecedentes en diversas especies indican que el cultivo *in vitro* produce cambios somaclonales, citogenéticos y epigenéticos. Para determinar los cambios morfológicos, epigenéticos y de nivel de ploidía producidos en *A. sativum* cv Sureño INTA luego del cultivo *in vitro*, bulbos saneados de virus mediante termoterapia y cultivo *in vitro*, se cultivaron a campo durante 3 temporadas (tratamientos **I**, **II** y **III**). En 45 plantas de cada tratamiento se evaluaron características morfológicas y nivel de ploidía. Los cambios epigenéticos se evaluaron mediante MSAP utilizando material vegetal de plantas provenientes de campo (**I**, **II** y **III**) y de cultivo *in vitro* (extraído a los 8, 13 y 25 meses). En cuanto a los cambios morfológicos evaluados, el número de hojas verdes presentó diferencias significativas entre los tratamientos **I**, **II** y **III**, con 6,17, 6,89 y 7,57 hojas respectivamente, evidenciando una reversión progresiva del fenotipo durante los sucesivos cultivos a campo con respecto al fenotipo control (bulbos que no fueron sometidos a cultivo *in vitro*). Se determinó que la colección de plantas era diploide a excepción de 5 ejemplares del tratamiento **I** que presentaron células diploides y tetraploides. La variabilidad epigenética calculada mediante AMOVA entre cultivo *in vitro* y a campo resultó de 95,34%. Estos resultados respaldan la hipótesis de que los cambios fenotípicos reversibles encontrados se correlacionan con cambios en la metilación del ADN.

## EPG 2

### ALTERAÇÕES (EPI)GENÉTICAS NAS SÍNDROMES DE BECKWITH-WIEDEMANN E SILVER-RUSSELL, E NA HEMIHIPERPLASIA ISOLADA

Machado FB<sup>1</sup>, FB Coeli-Lacchini<sup>2</sup>, HR Magalhães<sup>1</sup>, SBP Leite<sup>1</sup>, E Medina-Acosta<sup>3</sup>, ES Ramos<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, <sup>3</sup>Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil.  
 e-mail: filipebma@yahoo.com.br

O *imprinting* genômico é um processo regulado epigeneticamente que faz com que os alelos sejam expressos de acordo com a sua origem parental. As síndromes de Silver-Russell (SSR) e Beckwith-Wiedemann (SBW) são doenças de alterações do *imprinting* genômico, envolvendo principalmente o cromossomo 11. A Hemihiperplasia Isolada (HHI) corresponderia a uma forma mais leve da SBW. Em 11p15.5, estão localizadas duas regiões controladoras de *imprinting* (ICR1 e ICR2), que controlam a expressão de genes *imprinted* (marcados), envolvidos com essas doenças. Neste estudo foram pesquisadas alterações (epi)genéticas em amostras de 32 pacientes com SBW, 16 HHI, 20 SSR e seus pais, quando disponíveis. O perfil de metilação nas ICRs 1 e 2 foi verificado por MS-MLPA e DESM-RT. As alterações estruturais do cromossomo 11 foram avaliadas por MLPA e por marcadores microssatélites. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 11 foi responsável por 13% dos casos de HHI e 19% de SBW. Um paciente apresentou duplicação paterna de ambas as ICRs. Uma deleção não descrita anteriormente no gene *CDKN1C* foi observada em uma paciente com SBW e sua mãe. Para a SBW, foi observada hipermetilação na ICR1 e hipometilação na ICR2 em 6% e 42% dos casos, respectivamente. Nos pacientes com SSR, foi observada hipometilação na ICR1 em 25% dos casos. As frequências de alterações encontradas foram semelhantes às descritas na literatura. Os achados mostram a complexidade da etiologia das doenças estudadas e os dados moleculares são imprescindíveis para o adequado aconselhamento genético. Financiamento: FAPESP, FAEP, CNPq.

## EPG 3

### INFLUENCIA DE LA ANCESTRÍA GENÉTICA EN LA METILACIÓN GLOBAL DEL ADN EN PACIENTES CON CÁNCER

Cappetta M<sup>1</sup>, M Berdasco<sup>2</sup>, J Hochmann<sup>1</sup>, C Bonilla<sup>3</sup>, M Sans<sup>4</sup>, PC Hidalgo<sup>4</sup>, N Artigaveytia<sup>5</sup>, M Esteller<sup>2</sup>, B Bertoni<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup>Programa de Epigenética y Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, España, <sup>3</sup>Department of Social Medicine, University of Bristol,

England, <sup>4</sup>Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>5</sup>Departamento Básico de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.  
e-mail: monicac@fmed.edu.uy

El estudio solo de variantes genéticas no es suficiente para explicar una enfermedad compleja como el cáncer. Alteraciones en los patrones de metilación del ADN han sido asociadas a diferentes tipos de cáncer. Con el objetivo de detectar marcadores de susceptibilidad al desarrollo de melanoma y cáncer de mama en nuestra población, integramos la información genética y epigenética de los individuos. Determinamos el nivel de metilación genómica global en leucocitos de pacientes con cáncer mediante la cuantificación relativa de 5mC. Detectamos una hipometilación global del ADN en pacientes con melanoma y con cáncer de mama en comparación con sus grupos controles sanos ( $p < 0,001$ ). Estos resultados sugieren un potencial uso como marcadores riesgo. Dado que la población uruguaya es mestizada con alto componente europeo, y aporte africano y amerindio, y tanto melanoma como cáncer de mama tienen incidencias muy altas con respecto a las otras poblaciones, se estudió la correlación entre la metilación global del ADN y el componente ancestral. La ancestría genética individual se determinó mediante el análisis de marcadores informativos de ancestralidad. Detectamos una correlación negativa entre el componente africano y los niveles de metilación genómica global en pacientes con cáncer ( $p < 0,005$ ), traduciendo en un menor nivel de metilación cuanto mayor es el componente africano. Esto sugiere la importancia de considerar la ancestría como variable modificadora en los estudios epigenéticos de asociación en poblaciones mestizadas como Latinoamérica.

#### EPG 4

### DO HEALTHY RELATIVES OF ASTHMATICS HAVE LESS RESPIRATORY FUNCTION THAN HEALTHY RELATIVES OF NON-ASTHMATICS?

Pereira C<sup>1</sup>, N Veiga<sup>1</sup>, C Almeida<sup>1</sup>, A Lobo<sup>2</sup>, H Barros<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup>CI&DETS. Polytechnic Institute of Viseu, <sup>2</sup>Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.  
e-mail: carpereira@portugalmail.pt

Introduction: The objective of this study was to compare the respiratory function in healthy relatives

of asthmatic and non-asthmatic adolescents. Methods: In a cross-sectional approach we assessed 101 family-case (one or more asthmatic adolescents) and 275 family-control (non-asthmatic adolescents). In each family we evaluated mother, father and siblings more than 11 years old, without asthma (total sample of 821 relatives). Evaluation of the respiratory function was assessed by the forced expiratory volume in 1 second (%FEV1) and the forced vital capacity (FVC). Results: Fathers of adolescents with asthma had significantly lower values of lung function (84.6 vs. 97.6,  $p < 0.01$  for FEV and 84.3 vs. 97.9,  $p < 0.01$  for FVC), and mothers (97.3 vs. 109.7,  $p < 0.01$ , for FEV and 89.5 vs. 105.5,  $p < 0.01$  for FVC). Siblings of adolescents with asthma have lower FEV (98.6 vs. 109.4,  $p < 0.01$ ) and FVC (85.9 vs. 102.7,  $p < 0.01$ ). In family-cases FVC had a significant correlation with the values of siblings ( $r = 0.3$ ), and mothers ( $r = 0.4$ ), and FEV had a significant correlation with the siblings ( $r = 0.3$ ), and mothers ( $r = 0.3$ ). In family-controls FVC and FEV had correlation with brothers, mothers and fathers. Conclusion: The healthy relatives of asthmatic adolescents have decreasing respiratory function than healthy relatives of non-asthmatics.

#### EPG 5

### NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DURANTE A INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acca sellowiana* POR HPLC

Vieira LN<sup>1</sup>, HPF Fraga<sup>1</sup>, CA Caprestano<sup>1</sup>, DA Steinmacher<sup>3</sup>, GA Micke<sup>2</sup>, R Pescador<sup>1</sup>, MP Guerra<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina (SC), Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Química, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, <sup>3</sup>Instituto Biosomática, Holambra, São Paulo, Brasil.  
e-mail: leilanieira@gmail.com

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético regulatório da expressão gênica, que pode ser associado com as fases de desenvolvimento e a competência morfogenética *in vitro* em plantas. No presente estudo foram analisados os níveis de metilação do DNA global durante a indução da embriogênese somática em *A. sellowiana* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Embriões zigóticos dos acessos 101X458 e 85 foram submetidos a três diferentes tratamentos: Pulso 200  $\mu\text{M}$  ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)/0  $\mu\text{M}$  5-Azacitidina (AzaC) (Controle); Pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC; Pulso 100  $\mu\text{M}$  AzaC/50

$\mu\text{M}$  AzaC. As amostras foram coletadas após 10, 20 e 30 dias de cultivo e submetidas à extração de DNA e digestão de ácidos nucleicos. Para o acesso 101X458 a análise por HPLC indicou níveis de metilação de 31.4%, 40.1% e 31.7% nas culturas do tratamento controle, 30%, 26.7% e 27.9% para o tratamento com pulso 100  $\mu\text{M}$  AzaC/50  $\mu\text{M}$  AzaC, e 29.4%, 32.5% e 40.2% para o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC, aos 10, 20 e 30 dias de cultivo, respectivamente. Para o acesso 85 os níveis encontrados foram de 24.9%, 24% e 26.1% para o controle, 23.1%, 29% e 23.6% para o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC, e 29.1%, 26.8% e 21.4% para o tratamento apenas com AzaC. Os resultados indicam que os níveis de metilação são afetados pela presença do 2,4-D, AzaC e também pelo tempo de cultivo. Além disso, tratamentos que indicaram formação de embriões somáticos apresentaram padrões semelhantes nos níveis de metilação, indicando uma associação entre a metilação e a resposta embriogenética.

#### EPG 6

### PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM RESPOSTA À CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes*)

Fraga HPF<sup>1</sup>, AS Heringer<sup>1</sup>, DA Steinmacher<sup>2</sup>, MP Guerra<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, <sup>2</sup>Instituto Biosomática, Holambra, São Paulo, Brasil.  
 e-mail: hugopff@gmail.com

A pupunha (*Bactris Gasipaes* Kunth, Arecacea) é uma palmeira nativa da Amazônia cultivada para produção de frutos e palmito. A criopreservação de embriões somáticos pode ser empregada para a conservação de germoplasma desta espécie, contudo há evidências de que esta técnica pode resultar em alterações epigenéticas associadas à metilação do DNA. O presente estudo visou analisar os níveis de metilação do DNA global por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de aglomerados de embriões somáticos (AES) de pupunha submetidos à criopreservação. Estes AES foram submetidos a diferentes tempos de incubação (0, 60, 120, 180 e 240 min) em solução de vitrificação PVS3 (50% sacarose e 50% glicerol) e posteriormente imersos em nitrogênio líquido (NL) por 24h e recuperados em meio de cultura de multiplicação MS após 12 semanas. Amostras de cada tratamento

foram submetidas à extração de DNA e posterior digestão de ácidos nucleicos. Culturas incubadas em PVS3 indicaram aumento no nível de metilação quando comparadas ao tratamento controle, sendo observados valores de 24,5% de metilação no tratamento controle e 29,6% para os AES incubados por 120 min em PVS3. AES incubados em PVS3 e submetidos ao NL apresentaram média de metilação global de 28,5%, sendo o maior nível observado no tratamento com 180 min de incubação em PVS3 (29,6%). Assim, tanto o tratamento com PVS3 quanto a imersão dos AES em NL causa um aumento médio de 15% nos níveis de metilação do DNA global, podendo este fato estar relacionado com a proteção destas células ao PVS3 e a temperaturas ultra-baixas.

#### EPG 7

### EFECTOS DE SEÑALES EPIGENÉTICAS EN CÉLULAS MADRE DE LA RETINA EN BIOENSAYOS TRADICIONALES Y 3D

Bareiro NM, AM Cruz Gaitán, GE Miranda, NG Carri. Dto. de Biología del Desarrollo, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular-IMBICE, La Plata, Buenos Aires, Argentina.  
 e-mail: maia\_bareiro@hotmail.com

Existen Células Madre (CM) en zonas específicas de la retina como la Zona Marginal Ciliar (ZMC), de las cuales poco se conoce acerca de su proliferación y diferenciación, lo cual es indispensable en la investigación de la regeneración neural. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de Factores Tróficos (FT) sobre dicha capacidad mediante bioensayos *in vitro*. Para ello se utilizaron CM provenientes de ratones postnatales de día 0-1 cultivadas en medio para CM (Neurobasal+F12+B27+bFGF+EGF, 37 °C, humedad 100% y CO<sub>2</sub> 5%) induciendo la formación de Neuroesferas (NS), característica principal de CM Neurales (CMN) y a su vez estimuladas con FT (NTN o NT3) o sin estimulación (control) sobre bioensayo con colágeno (3D) analizando procesos de diferenciación y neuritogénesis a las 24 y 48 hs de cultivo; al igual que bioensayos sin colágeno con el agregado de BrdU durante 24 hs para determinar proliferación celular. Mediante inmunocitoquímica se analizó la expresión de marcadores específicos de Células Progenitoras, Gliales y Neuronales (GFAP, Pax6, A2B5, FORSE1, etc). Obteniéndose positividad para diferentes tipos de células neurales, al igual que para células proliferantes, observando diferencias entre NS estimuladas y el control. En



el proceso neuritogénico de las NS analizadas en bioensayos 3D se obtuvo variación en cuanto al número y longitud de neuritas. Este estudio evidencia la activación o inhibición del tándem génico de CMN de la ZMC en diferentes condiciones de cultivos donde ensayos 3D favorecen el óptimo crecimiento de neuritas.

---

#### EPG 8

### **FAMILIAR AGGREGATION OF INSOMNIA IN A SAMPLE OF PORTUGUESE TEACHERS**

Almeida C, C Pereira, N Veiga, O Amaral, J Pereira. CI&DETS.  
Polytechnic Institute of Viseu, Portugal.  
e-mail: nelioveiga@gmail.com

**Introduction:** The aim of this study was to analyze the association between family history and the presence of insomnia in a sample of teachers. **Methods:** In a cross-sectional study we assessed teachers of sixteen public schools of Viseu, Portugal. Data was collected using a self-administered questionnaire. We obtained a final sample of 864 teachers. Insomnia was defined as the presence of one or more of the following symptoms: i) difficulty initiating sleep, ii) difficulty maintaining sleep, iii) early morning awakening and difficulty getting back to sleep, iv) non-restorative sleep, that lasts for a period of 1 month. Prevalence was expressed in proportions and compared by the chi-square test. **Results:** The prevalence of insomnia was 42.0% (95%CI=38.6-45.4). The prevalence of difficulty initiating sleep, difficulty maintaining sleep, early morning awakening with difficulty getting back to sleep, non-restorative sleep was 14.6% (95%CI=11.7-16.4), 29.4% (95%CI=26.5-32.7), 20.2% (95%CI=17.5-22.9) and 21.1% (95%CI=18.6-24.2), respectively. Insomnia was associated with gender (female, OR=1.3, 95%CI=1.0-1.8); family history of insomnia (OR=2.8, 95%CI=1.4-5.8); use of medication (OR=2.3, 95%CI=1.7-3.2); depressive symptoms (OR=2.8, 95%CI=1.8-4.3); sports practice (OR=0.8, 95%CI=0.7-1.0). After adjustment by non-conditional logistic regression for gender, use of medication, depressive symptoms and sports practice, the family history was associated with insomnia (OR=5.7, 95%CI=1.3-25.1). **Conclusion:** Adults with insomnia have six times more risk of having their father, mother or brothers with insomnia.