

## Apresentação

O conceito de epigenética ainda é recente e seus efeitos sobre o desenvolvimento vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos, principalmente na área da saúde humana. Assim, por sua forte atuação voltada à pesquisa agropecuária, a Embrapa vislumbrou a oportunidade de conduzir estudos em epigenética referentes à produção, à reprodução e à sanidade animal e vegetal, para aumentar a quantidade e a qualidade dos produtos e alimentos gerados, além de melhorar a eficiência de produção.

Por sua característica de sofrer modificação causada pelo ambiente, o estudo da epigenética permite aumentar a compreensão da interação entre o genótipo e o ambiente, e seus efeitos sobre o fenótipo dos indivíduos. Conseqüentemente, a avaliação epigenética de genes relacionados a características quantitativas – que sofrem bastante influência do ambiente e que apresentam grande interesse comercial – visa ao complemento dos estudos tradicionalmente desenvolvidos em genética quantitativa e molecular.

Os autores desta obra são jovens cientistas de diferentes instituições de ensino e pesquisa – Embrapa, Universidade de São Paulo (USP), Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), e Universidade Federal de São Carlos (UFScar) – que desejam compartilhar os conhecimentos adquiridos em seus estudos na área de epigenética. Este livro tem como público-alvo não só estudantes, pesquisadores e professores das áreas de ciências biológicas, agrárias e afins, mas também interessados no assunto que queiram obter informações técnico-científicas sobre um tema que, com certa frequência, é veiculado na mídia impressa e eletrônica.

*Rui Machado*

Chefe-Geral da Embrapa Pecuária Sudeste

## Prefácio

Atualmente, a epigenética constitui um dos temas de maior interesse no estudo de processos biológicos em humanos, em animais e em plantas, pois fornece o elo entre o genótipo e o meio ambiente, tornando evidente que a manifestação do fenótipo nos indivíduos depende da interação entre esses três fatores. Assim, a epigenética permite elucidar eventos anteriormente atribuídos ao acaso ou que não podiam ser explicados apenas pela genética, além de reacender o debate sobre as teorias evolutivas e as ideias de Lamarck, uma vez que demonstra que caracteres adquiridos pelos pais podem ser transmitidos a seus descendentes.

Apesar de não ser um conceito novo, a epigenética só passou a ser sistematicamente estudada nas últimas 2 décadas. No início, pesquisas feitas, principalmente com seres humanos e com camundongos foram restritas a genes *imprinted* e a genes candidatos específicos e posteriormente aos RNAs não codificadores. Só nos últimos anos – com o advento das tecnologias de biologia molecular em larga escala – é que houve expansão das pesquisas nesse novo campo da genética para outras espécies animais e vegetais, bem como em escala genômica.

Grande parte dos estudos nesse tema ainda se encontra relacionada a seu papel na etiologia de doenças, principalmente de câncer em humanos e, apesar de sua evidente importância, ações isoladas têm sido promovidas em animais ou em plantas destinadas à produção. Entretanto, poucas das informações obtidas têm sido incorporadas aos modelos aplicados no melhoramento genético.

Por sua importância e pela escassez de literatura em língua portuguesa, este livro é de suma importância para quem deseja se inteirar do tema em questão. Numa linguagem conceitual, clara e concisa, ele aborda conceitos adquiridos e gerados em estudos sobre epigenética, desenvolvidos por pesquisadores da Embrapa em parceria com outros pesquisadores e professores de diversas instituições de ensino e pesquisa, sem omitir nenhum detalhe relacionado a esse novo segmento da genética.

Os primeiros capítulos, além de breve histórico, abordam a importância e os conceitos relacionados ao tema. Além disso, descrevem os

tipos de modificações epigenéticas existentes no genoma, bem como as ferramentas de biologia molecular que podem ser usadas para detectar sua variação. Também versam sobre o papel da epigenética durante o desenvolvimento normal e patológico de mamíferos e plantas. Os últimos capítulos tratam das implicações da epigenética para a biotecnologia e para a produção animal e vegetal.

Os autores entendem que, de forma alguma, o conteúdo desta obra encerra por completo a abrangência deste tema e estão ávidos por receberem contribuições para revisões e complementações futuras do texto ora apresentado.

*As editoras*

Capítulo 1

# **Epigenética**

## Histórico e conceitos

*Simone Cristina Méo Niciura*  
*Vanessa Candiotti Buzatto*

## Introdução

Na última década, grande quantidade de notícias e publicações técnico-científicas tem sido veiculada pela imprensa sobre o tema epigenética. No Brasil, nos últimos anos, destaca-se a proibição da fabricação de mamadeiras de plástico policarbonato, em decorrência do aumento de riscos de puberdade precoce, câncer, alterações no sistema reprodutivo, infertilidade, aborto e obesidade associados à ingestão de bisfenol-A (BPA), presente no policarbonato e no revestimento interno de latas de bebidas e de alimentos (FOLHA DE SÃO PAULO, 2011; JORNAL NACIONAL, 2011).

Outras notícias destacaram os efeitos controversos da escassez de alimentos, como o ocorrido na Suécia, no século 19, o “inverno, da fome” na Holanda, no período 1944–1945, e a falta de alimentos na China, no final da década de 1950, sobre a longevidade, o peso na idade adulta, o aparecimento de patologias e o desenvolvimento de esquizofrenia nas gerações futuras (GNT.DOC, 2010; SUPERINTERESSANTE, 2011; UOL, 2011). Algumas reportagens também evidenciaram os efeitos do Atentado de 11 de Setembro de 2001, nos Estados Unidos, sobre o desenvolvimento de estresse (níveis de cortisol) nos descendentes; e os efeitos da nutrição e do estilo de vida, incluindo o tabagismo e a ingestão de álcool, sobre a saúde, a obesidade, o risco de desenvolvimento de câncer e a longevidade das pessoas e de seus descendentes (CIÊNCIA DIÁRIA, 2010; GALILEU, 2009; GNT.DOC, 2010). Por causa da epigenética, hoje em dia pode-se dizer que somos não só o que comemos (HUNTER, 2008), mas também o que nossos pais (BAKER IDI HEART AND DIABETES INSTITUTE, 2009) e até o que nossos avós comeram (RESEARCH PRESS, 2012).

## Definição e história da epigenética

O termo epigenética, que literalmente significa “genética acima”, foi usado pela primeira vez por Conrad Waddington, na década de 1940, para descrever as interações de genes com o meio ambiente e os possíveis caminhos que cada célula pode tomar durante o desenvolvimento (TOST, 2008). Atualmente, a epigenética é definida como o estudo de processos que produzem um fenótipo herdável, mas que não dependem estritamente da sequência de DNA (LIEB et al., 2006), ou seja, eventos epigenéticos são aqueles que alteram o fenótipo sem

modificar o genótipo (KENDREW, 1994) e que são herdáveis. Como se vê, não é só a sequência de DNA que determina o fenótipo, mas também as variações epigenéticas, e ambas as modificações, genéticas e epigenéticas, atuam em sinergia para a manifestação do fenótipo (MURRELL et al., 2005).

A genética tradicional baseia-se no pareamento de bases adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) na dupla-hélice do DNA e nas variações em sua sequência. Exemplos de modificações genéticas que levam a alterações fenotípicas incluem os polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs), as variações no número de cópias (*copy number variation* ou CNVs), os sítios de ligação de fatores de transcrição, os promotores alternativos e o *splicing* alternativo. Por sua vez, a epigenética refere-se às modificações reversíveis dos nucleotídeos por diferentes formas químicas, sem alteração de sua sequência. Tais modificações são chamadas de epigenéticas, pois *epi* significa “fora de” ou “acima de, além de” (CALLADINE et al., 2004). Assim, a epigenética estuda as camadas adicionais de informação no topo da sequência genômica, o que estende de forma dramática o potencial de informação do código genético (TOST, 2008).

Enquanto o genoma é estável (só alterado por mutagênese ou por erros na replicação), herdável e único a cada indivíduo, apesar de também ser estável e herdável, a epigenética é modificável de maneira reversível e única a cada tipo celular (OHGANE et al., 2008). Por isso, as diferenças nos padrões de expressão gênica que resultam no desenvolvimento de órgãos e tecidos geralmente ocorrem pelo estabelecimento de marcas epigenéticas (REIK, 2007). Assim, como cada célula de um mesmo organismo contém a mesma informação genética em seu DNA, é a regulação diferencial dos genes, por meio da epigenética, no tempo (durante o desenvolvimento) e no espaço (tecido) que determina o destino celular (morfologia e função) e o fenótipo do indivíduo (BLOMEN; BOONSTRA, 2011).

As marcas epigenéticas são introduzidas nos cromossomos de maneira reversível e replicadas, estavelmente, durante as divisões celulares (KENDREW, 1994). A regulação gênica epigenética consiste na propagação estável do estado de atividade gênica durante as divisões celulares de mitose (herança epigenética entre células) e, algumas vezes, de meiose (herança epigenética entre gerações ou transgeracional) (BIRD, 2007; STAM, 2009). As modificações epigenéticas

ocorrem, naturalmente, nos organismos e participam de vários processos fisiológicos, como (YOUNG; FAIRBURN, 2000):

- Expressão de genes específicos de tecidos.
- Inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas (compensação de dosagem).
- Inativação do centrômero.
- Regulação do *imprinting* genômico.

Entretanto, modificações nos padrões epigenéticos normais podem levar ao aparecimento de patologias. Assim, a epigenética está envolvida tanto em processos fisiológicos, como o desenvolvimento, o crescimento e o envelhecimento, como em patológicos, na etiologia de algumas doenças em humanos e em animais (BONETTA, 2008).

Como exemplo de regulação epigenética, observa-se que todas as fêmeas de abelha desenvolvem-se a partir de larvas geneticamente idênticas, mas a dieta com geleia real transforma uma abelha operária numa rainha fértil (YOUNG, 2008). As diferenças fenotípicas entre gêmeos idênticos também podem ser atribuídas aos efeitos epigenéticos (KAMINSKY et al., 2009). Assim, os estudos de comparação das variações fenotípicas existentes entre gêmeos idênticos (monozigóticos) e entre gêmeos fraternos (dizigóticos) foram os pioneiros para determinar a influência ambiental e genética, respectivamente, na etiologia de algumas doenças em humanos (BOUCHARD; MCGUE, 2003; GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER, 2012; WONG et al., 2005).

O mais intrigante é que as modificações epigenéticas podem ser influenciadas por fatores ambientais, principalmente por dieta, comportamento, estresse e toxinas, e por fatores estocásticos (FAULK; DOLINOY, 2011). Em camundongos, já foi demonstrado que o consumo de alimentos ricos em ginesteína e em ácido fólico, durante a gestação, afetam as marcas epigenéticas e o desenvolvimento até a fase adulta dos descendentes (YOUNG, 2008). Em humanos, a ocorrência de diabetes mellitus do tipo 2 e a quantidade de massa gorda corporal de um indivíduo adulto podem ser influenciadas pelas condições nutricionais durante a vida intrauterina (TREMBLAY; HAMET, 2008). Assim, surge uma oportunidade para se desenvolver novos medicamentos ou orientações nutricionais que possam modificar as marcas epigenéticas de maneira favorável (YOUNG, 2008).

Além disso, a complexidade da herança epigenética, principalmente a transgeracional, colocou em destaque a teoria evolutiva, antes desacreditada, de Lamarck, de que as influências ambientais podem ser transmitidas dos pais para os descendentes (HANDEL; RAMAGOPALAN, 2010). A epigenética também já foi relacionada:

- Ao comportamento (WEAVER et al., 2004).
- Ao cuidado materno (CHAMPAGNE et al., 2006).
- A modificações em cérebro de pessoas suicidas (POULTER et al., 2008).
- Ao efeito de glicocorticoides (WEAVER, 2009).
- A doenças periodontais (GOMEZ et al., 2009).
- À hibernação em mamíferos (MORIN; STOREY, 2009).
- À obesidade (CAMPIÓN et al., 2009).
- À homossexualidade (RICE et al., 2012; VEJA, 2012), entre outros.

E mais, doenças familiares sem causas genéticas definidas – esquizofrenia, desordem bipolar, diabetes e câncer – têm sido estudadas e melhor compreendidas sob a ótica da epigenética (BELL; SPECTOR, 2012).

Neste livro, os tipos de modificações epigenéticas são abordados nos Capítulos 2, 3 e 4; já o Capítulo 5 discorre sobre as técnicas moleculares aplicadas em sua avaliação; o Capítulo 6 trata do envolvimento da epigenética nos aspectos fisiológicos relacionados ao *genomic imprinting*; o Capítulo 7 discorre sobre a influência da epigenética no desenvolvimento e no envelhecimento; o Capítulo 8 trata dos eventos patológicos em mamíferos; o Capítulo 9 relata as implicações da epigenética na biotecnologia e na produção animal; e o Capítulo 10 aborda as especificidades da epigenética em plantas.

## Considerações finais

Além do código genético, fatores epigenéticos interferem na expressão gênica e no fenótipo dos indivíduos. Assim, a epigenética associada à genética tem aumentado a compreensão de muitos processos fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos.



## Referências

- BAKER IDI HEART AND DIABETES INSTITUTE. **We are what our parents ate, new research shows**. 2009. Disponível em: <<http://admin.bakeridi.roadhouse.com.au/Assets/Files/media%20release-metabolic%20memory.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2013.
- BELL, J. T.; SPECTOR, T. D. DNA methylation studies using twins: what are they telling us? **Genome Biology**, London, v. 13, p. 172, 2012.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, London, v. 447, p. 396-398, 2007.
- BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, p. 27-44, 2011.
- BONETTA, L. Epigenomics: detailed analysis. **Nature**, London, v. 454, p. 795-798, 2008.
- BOUCHARD JÚNIOR, T. J.; MCGUE, M. Genetic and environmental influences on human psychological differences. **Journal of Neurobiology**, New York, v. 54, p. 4-45, 2003.
- CALLADINE, C.; DREW, H.; LUISI, B.; TRAVERS, A. **Understanding DNA**. San Diego: Academic Press, 2004. 352 p.
- CAMPIÓN, J.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, J. A. Individuality and epigenetics in obesity. **Obesity Reviews**, Oxford, v. 10, p. 383-392, 2009.
- CHAMPAGNE, F. A.; WEAVER, I. C. G.; DIORIO, J.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- $\alpha$ 1b promoter and estrogen receptor- $\alpha$  expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, Baltimore, v. 147, p. 2909-2915, 2006.
- CIÊNCIA DIÁRIA. **Álcool e dieta têm relação com perfis epigenéticos e tamanho do tumor**. 2010 Disponível em: <<http://cienciadiaria.com.br/2010/07/30/consumo-de-alcool-dieta-e-tamanho-do-tumor-estao-associados-com-perfis-epigeneticos-no-cancer-de-mama/>>. Acesso em: 10 abr. 2013.
- FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, Austin, v. 6, p. 791-797, 2011.
- FOLHA DE SÃO PAULO. **Anvisa proíbe mamadeiras com bisfenol A no Brasil**, 2011. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/975840-anvisa-proibe-mamadeiras-com-bisfenol-a-no-brasil.shtml>>. Acesso em: 8 abr. 2013.

GALILEU. **Epigenética:** a culpa é dos seus pais. 2009. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Revista/Galileu/0,,EDG87034-7943-217,00-EPIGENETICA+A+CULPA+E+DOS+SEUS+PAIS.html>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER. Identical twins: pinpointing environmental impact on the epigenome. **Learn Genetics**, Utah, 2012. Disponível em: <<http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/twins/>>. Acesso em: 3 fev. 2012.

GNT.DOC. **Como a comida afeta nossos genes.** 2010. Disponível em: <<http://globoTV.globo.com/gnt/gntdoc/v/epigenetica-como-a-comida-afeta-nossos-genes/1307485/>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

GOMEZ, R. S.; DUTRA, W. O.; MOREIRA, P. R. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. **Inflammation Research**, Baselo Basel, v. 58, p. 625-629, 2009.

HANDEL, A. E.; RAMAGOPALAN, S. V. Is Lamarckian evolution relevant to medicine? **BMC Medical Genetics**, London, v. 11, p. 73, 2010.

HUNTER, P. We are what we eat. The link between diet, evolution and non-genetic inheritance. **EMBO Reports**, Oxford, v. 9, p. 413-415, 2008.

JORNAL NACIONAL. **Anvisa proíbe venda de mamadeira plástica que contenha BPA**, 2011. Disponível em: <<http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2011/09/anvisa-proibe-venda-de-mamadeira-plastica-que-tenha-bpa.html>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

KAMINSKY, Z. A.; TANG, T.; WANG, S. C.; PTAK, C.; OH, G. H. T.; WONG, A. H. C.; FELDCAMP, L. A.; VIRTANEN, C.; HALFVARSON, J.; TYSK, C.; MCRAE, A. F.; VISSCHER, P. M.; MONTGOMERY, G. W.; GOTTESMAN, I. I.; MARTIN, N. G.; PETRONIS, A. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. **Nature Genetics**, New York, v. 41, p. 240-245, 2009.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology.** Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

LIEB, J. D.; BECK, S.; BULYK, M. L.; FARNHAM, P.; HATTORI, N.; HENIKOFF, S.; LIU, X. S.; OKUMURA, K.; SHIOTA, K.; USHIJIMA, T.; GREALLY, J. M. Applying whole genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 114, p. 1-15, 2006.

MORIN JÚNIOR, P.; STOREY, K. B. Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 53, p. 433-442, 2009.

MURRELL, A.; RAKYAN, V. K.; BECK, S. From genome to epigenome. **Human Molecular Genetics**, New York, v. 14, p. R3-R10, 2005.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, London, v. 29, p. S29-S35, 2008.

POULTER, M. O.; DU, L.; WEAVER, I. C. G.; PALKOVITS, M.; FALUDI, G.; MERALI, Z.; SZYF, M.; ANISMAN, H. GABA<sub>A</sub> receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. **Biological Psychiatry**, Amsterdam, v. 64, p. 645-652, 2008.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, London, v. 447, p. 425-432, 2007.

RESEARCH PRESS. **You are what your grandparents ate**. 2012. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/userimages/ContentEditor/1342009097836/epigenetics%20final.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

RICE, W. R.; FRIGERG, Y; GAVRILETS, S. Homosexuality as a consequence of epigenetically canalizes sexual development. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 87, p. 343-368, 2012.

STAM, M. Paramutation: a heritable change in gene expression by allelic interactions in trans. **Molecular Plant**, Oxford, v. 2, p. 578-588, 2009.

SUPERINTERESSANTE. **Os genes não definem nosso destino**. 2011. Disponível em: <<http://super.abril.com.br/ciencia/genes-nao-definem-nosso-destino-619669.shtml>>. Acesso em: 6 abr. 2013.

TOST, J. **Epigenetics**. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. 404 p.

TREMBLAY, J.; HAMET, P. Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. **Metabolism Clinical and Experimental**, [S.l.], v. 57, p. S27-S31, 2008. Supplement 2.

UOL. **Estudo liga magreza de Audrey Hepburn a alterações genéticas causadas pela guerra**. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/ciencia/ultimas-noticias/redacao/2011/08/31/estudo-liga-magreza-de-audrey-hepburn-a-alteracoes-geneticas-causadas-pela-guerra.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

VEJA. **Homossexualidade pode ser influenciada pela epigenética**. 2012. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/ciencia/homossexualidade-pode-ser-influenciada-pela-epigenetica>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

WEAVER, I. C. G. Epigenetic effects of glucocorticoids. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 14, p. 143-150, 2009.

WEAVER, I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; D'ALESSIO, A. C.; SHARMA, S.; SECKL, J. R.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, New York, v. 7, p. 847-854, 2004.

WONG, A. H. C.; GOTTESMAN, I. I.; PETRONIS, A. Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, p. R11-R18, 2005.

YOUNG, E. Strange inheritance. **NewScientist**, London, v. 199, p. 28-33. 12 jul. 2008.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 627-648, 2000.



## Capítulo 2

# **Modificações epigenéticas I**

Conformação da cromatina  
e modificação do DNA

*Simone Cristina Méo Niciura*

## Introdução

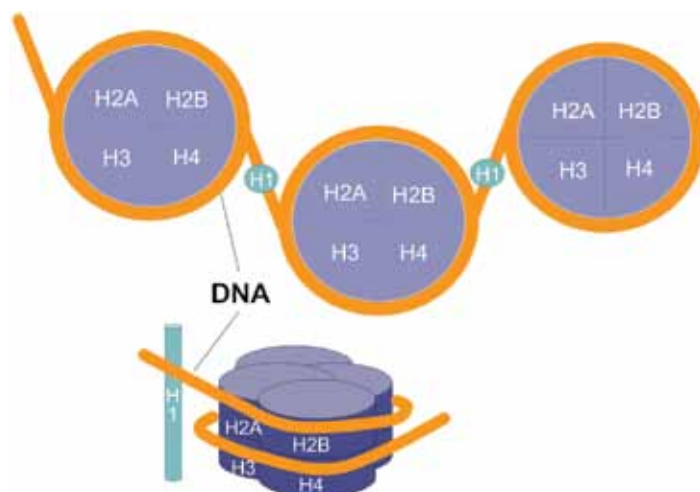
As modificações epigenéticas têm sido classificadas em quatro grandes classes (FINGERMAN et al., 2013):

- Conformação ou acessibilidade da cromatina e posicionamento dos nucleossomos.
- Modificações do DNA (metilação e outras modificações de citosina).
- Modificações pós-traducionais das histonas, apresentadas no Capítulo 3.
- Regulação gênica associada aos RNA não codificadores ncRNAs, apresentada no Capítulo 4.

Os três primeiros tipos de modificações estão associados a alterações na estrutura da cromatina. Assim, para melhor compreensão dessas modificações epigenéticas, vale lembrar que, de acordo com a conformação e a função, a cromatina pode ser denominada de eucromatina ou heterocromatina. A eucromatina – porção do genoma de replicação precoce no ciclo celular – caracteriza-se por estrutura conformacional mais permissiva e é abundante em genes transcritos. A heterocromatina – porção de replicação tardia – é altamente condensada e contém poucos genes expressos. A heterocromatina pode ser facultativa, ou seja, pode sofrer modificação de acordo com o tipo celular e durante o tempo; ou constitutiva, que possui papel estrutural, como para a formação dos centrômeros e dos telômeros.

Outra informação importante é que os cromossomos eucarióticos são empacotados em estruturas condensadas da cromatina, cuja unidade primária, o nucleossomo, é composta de 145 a 147 pares de base de DNA (~147 bp) enovelados num octâmero de histonas (MIELE et al., 2008), contendo duas cópias de cada uma das proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009) (Figura 1). Cada nucleossomo é separado por cerca de 50 bp, que por sua vez são empacotadas pela histona de ligação H1 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009) (Figura 1).

As histonas nucleossomais, canônicas ou centrais (H2A, H2B, H3 e H4), podem ser quimicamente modificadas (ver no Capítulo 3) ou substituídas por variantes de histonas (ERNST et al., 2011; MARTINS



**Figura 1.** Estrutura dos nucleossomos (em roxo) com a fita de DNA (alaranjada) enovelada no octâmero de histonas (duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4); e histona H1 (verde) que se liga à fita de DNA entre dois nucleossomos.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

et al., 2012), codificadas por genes diferentes da contrapartida canônica. As principais variantes de histonas são:

**H2A.X** – Difere da histona H2A na cauda-C, na qual uma serina na posição 139 pode ser fosforilada, transformando-se em  $\gamma$ -H2A.X; variante que se localiza em quebra de dupla fita e marca o DNA para o reparo.

**H2A.Z** – Presente em promotores e em sítios de início de transcrição; associada a regiões livres de nucleossomos.

**MacroH2A** – Presente no cromossomo X, e inativo em mamíferos.

**CEMP-A ou CenH** – Inserida em sequências centroméricas altamente competitivas; componente do cinetócoro.

**CenH3** – Inserida em sequências centroméricas altamente repetitivas; componente do cinetócoro.

**H3.3** – Participação no estabelecimento de heterocromatina em regiões pericentroméricas.

**H3t** – Participação na substituição de histona por protamina na cromatina espermática.



Essas variantes de histonas alteram o empacotamento do DNA e promovem mudança da topologia da fibra de cromatina, estabilizando-a (por exemplo, H3.3) ou tornando-a menos estável (por exemplo, H3t).

## **Conformação ou acessibilidade da cromatina e posicionamento dos nucleossomos**

Tanto a estrutura em alta ordem da cromatina quanto a organização dos nucleossomos influenciam o acesso dos fatores de transcrição às sequências alvo no DNA (BALLARÉ et al., 2013). As modificações de conformação da cromatina restringem, por compactação, ou facilitam, por descompactação ou abertura, o acesso do DNA aos fatores de transcrição e à maquinaria de transcrição. Em consequência disso, silenciam ou ativam a expressão gênica.

Há várias camadas de organização da cromatina no núcleo de uma célula mamífera a partir de sua composição mais básica (a sequência do DNA e o enovelamento nos nucleossomos). A estrutura primária da cromatina consiste (SAJAN; HAWKINS, 2012; ZHOU et al., 2011):

- No estado de metilação do DNA.
- Nas modificações das histonas.
- Na organização de vários nucleossomos em fila, de maneira a formar uma fibra de 11 nm de diâmetro.

Em seguida, a inclusão das histonas H1 leva à formação de uma fibra em zigue-zague mais condensada, com 30 nm de diâmetro (estrutura secundária) (SAJAN; HAWKINS, 2012). A estrutura de alta ordem da cromatina é formada pelas dobras (*loops*) de cromatina mediadas pelas interações de proteínas não histônicas em regiões genômicas distais (estrutura terciária), as quais permitem a aproximação física entre elementos distais e proximais, e pelo posicionamento tridimensional dos domínios de cromatina em relação à lâmina nuclear no interior do núcleo (estrutura quaternária) (SAJAN; HAWKINS, 2012).

As regiões transcricionalmente ativas (eucromatina) localizam-se mais distantes da lâmina nuclear em relação às regiões silenciosas (heterocromatina), e as modificações epigenéticas também impactam na estrutura em alta ordem da cromatina, por alterarem as propriedades químicas das histonas e de certas bases do DNA (SAJAN; HAWKINS, 2012).

A determinação do posicionamento dos nucleossomos depende da combinação entre sequência do DNA, enzimas remodeladoras do nucleossomo dependentes de ATP e fatores de transcrição (maquinaria de RNA polimerase III) (STRUHL; SEGAL, 2013). Algumas sequências do DNA (como AA/TT/AT/GC a intervalos de 10 bp), que são mais “dobráveis”, permitem que a fita adquira a curvatura necessária para acomodar os nucleossomos cuja estabilidade também é aumentada pelo estado de metilação do DNA (SAJAN; HAWKINS, 2012; ZENTER; HENIKOFF, 2013). Além disso, a posição do DNA no nucleossomo afeta a metilação daquele, pois as metiltransferases de DNA (DNMTs) têm preferência pelo DNA ligado ao nucleossomo que, em consequência, é mais metilado que o DNA adjacente.

O posicionamento do nucleossomo pode ocorrer a intervalo perfeito (~147 bp), parcial (preferência por algumas localizações) ou sem padrão (pode ocupar qualquer posição genômica) (STRUHL; SEGAL, 2013). A localização precisa do nucleossomo +1 (primeiro nucleossomo após o sítio de início de transcrição – TSS) é um fator determinante do padrão de posicionamento dos nucleossomos, pois há relação entre o posicionamento do nucleossomo +1, o TSS e o complexo de pré-iniciação da transcrição (STRUHL; SEGAL, 2013).

Dependendo dos níveis de expressão gênica, o posicionamento dos nucleossomos difere (VAVOURI; LEHNER, 2012). Em humanos, somente os promotores amplos – que iniciam a transcrição a partir de uma região maior que 4 bp e são regulados por ilhas CpG – possuem associação significativa com o posicionamento e a modificação dos nucleossomos (NOZAKI et al., 2011; VAVOURI; LEHNER, 2012). Já o alinhamento dos nucleossomos – bem mais ordenado nos promotores amplos – pode ser necessário para criar uma região livre de nucleossomo que antecede ao TSS, de modo a conferir acessibilidade do DNA aos fatores de transcrição (NOZAKI et al., 2011).

As regiões livres de nucleossomos são sensíveis à digestão por *DNaseI* e chamadas de sítios hipersensíveis à *DNaseI* (BALLARÉ et al., 2013). Geralmente, os nucleossomos são enriquecidos nos éxons e preferencialmente localizados nas regiões íntron-éxon ou éxon-íntron (ZHANG et al., 2010) e depletados em muitos *enhancers*, promotores e regiões de terminação da transcrição (STRUHL; SEGAL, 2013).

Além do posicionamento e da ocupação por nucleossomos, a taxa de renovação (*turnover*) de nucleossomos – mais alta em promotores

e mais baixa em corpos gênicos – também participa da regulação da expressão gênica e da delimitação dos estados de cromatina. Cada ciclo de *turnover* de nucleossomos apaga as modificações de histonas de um determinado local e a supressão do *turnover* evita o início espúrio da transcrição em corpos gênicos (ZENTER; HENIKOFF, 2013). A trimetilação da histona H3 no resíduo de lisina 36 (H3K36me3), estabelecida pela metiltransferase SET2, impede o *turnover* de nucleossomos.

## Modificações do DNA

### Metilação do DNA

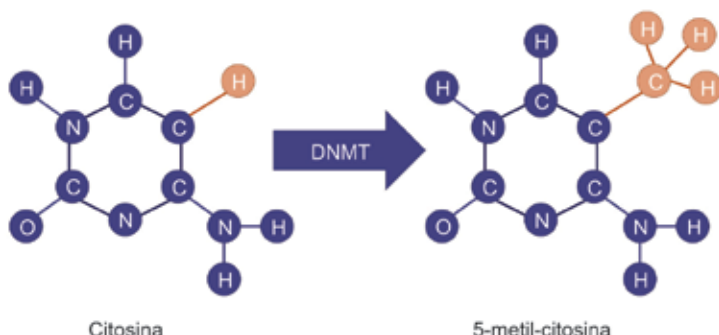
A metilação do DNA é um tipo de modificação química do DNA – que é herdável e pode ser estabelecida e removida sem mudar a sequência original do DNA. Ela participa:

- Na regulação da expressão gênica (ativação e silenciamento).
- Na manutenção da identidade celular (BLOMEN; BOONSTRA, 2011).
- Na regulação da maioria dos genes *imprinted* (FEIL; BERGER, 2007).
- Na inativação de elementos de transposição.
- No silenciamento de elementos repetitivos.
- Na estabilidade cromossômica.
- Como um sinal epigenético de memória, transmitido durante a replicação do DNA (PAULSEN et al., 2008).

A metilação do DNA, ou melhor, a metilação de uma citosina localizada em posição 5' a um resíduo de guanina (dinucleotídeo CpG, ou seja, citosina ligação fosfato guanina) na sequência do DNA, é a principal marca do silenciamento gênico epigenético em mamíferos. O principal mecanismo que guia o estabelecimento do padrão de metilação é um fator em *cis*, ou seja, a própria sequência do DNA (BIRD, 2011).

A metilação ocorre por meio da adição, por ligação covalente, de um grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina, transformando-a em 5-metil-citosina (5mC) (Figura 2). Assim, a metilação é uma modificação pós-sintética, à medida que os nucleotídeos só são modificados após terem sido incorporados ao DNA.

A 5mC é considerada o “quinto nucleotídeo” e constitui cerca de 1% de todas as bases de DNA (TOST, 2010).



**Figura 2.** Metilação do DNA: adição de um grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina, pela enzima metiltransferase de DNA (DNMT), transformando-a em 5-metil-citosina.

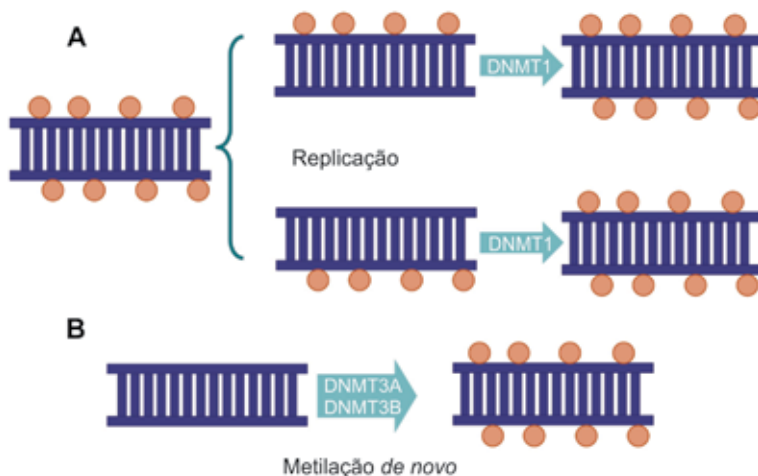
Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

O DNA é metilado (Figura 2) por meio da ação das metiltransferases de DNA (DNMTs). Na metilação, o doador universal do grupamento metil é a S-adenosil-L-metionina (SAM), sintetizada a partir de doadores de metil (metionina e colina) e co-fatores (ácido fólico, vitamina B12 e fosfato de piridoxal) (TOST, 2010). As DNMTs catalisam a transferência de um grupo metil da SAM para a citosina. Em mamíferos, já foram identificadas três famílias de metiltransferases de DNA: a) DNMT1, composta pelas isoformas somáticas DNMT1s (190 kDa) e oocitária DNMT1o (175 kDa); b) DNMT2; c) DNMT3, composta pelas DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L.

A DNMT1 é a enzima envolvida na manutenção dos padrões de metilação a cada replicação do DNA e metila, preferencialmente, o DNA hemimetilado (Figura 3a). A DNMT1o, específica do gameta feminino (oócito), parece ser importante na manutenção do padrão de *imprinting* na segunda onda de desmetilação global do genoma, que ocorre após a fecundação (ver Capítulos 6 e 7) (FAULK; DOLINOY, 2011; RIVERA; ROSS, 2013).

A DNMT2, que parece ter pouca atividade *in vitro* de metilação do DNA, tem função de metiltransferase específica de t-RNA (PAULSEN et al., 2008).

As DNMT1o e DNMT3B têm atividade de metilação *de novo* durante a embriogênese (Figura 3b); a DNMT3A está associada à heterocromatina (BLOMEN; BOONSTRA, 2011); e a DNMT3L está envolvida no desenvolvimento da linhagem germinativa (TOLLEFSBOL, 2004) e aumenta a atividade das DNMT3A e DNMT3B (RIVERA; 2013).



**Figura 3.** Ação das metiltransferases de DNA (DNMTs) na fita de DNA (em roxo) e nas metilações (círculos alaranjados). A) Manutenção de metilação: após a replicação do DNA nas divisões celulares, a DNMT1 promove a metilação da fita de DNA hemimetilada; B) Metilação *de novo*: as DNMT3A e as DNMT3B promovem metilação de uma dupla-fita de DNA não metilada.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

Existe uma DNMT específica do gameta feminino (oócito), a DNMT0, que parece ser importante na manutenção do padrão de *imprinting* na segunda onda de desmetilação global do genoma, o qual ocorre após a fecundação (Capítulos 6 e 7) (FAULK; DOLINOY, 2011; RIVERA; ROSS, 2013). A DNMT2 parece ter pouca atividade *in vitro* de metilação do DNA e tem função de metiltransferase específica de t-RNA (PAULSEN et al., 2008).

As enzimas que promovem a desmetilação do DNA são menos conhecidas. A desmetilação pode ocorrer de maneira passiva, pela replicação do DNA na ausência de DNMT1, ou de maneira ativa,

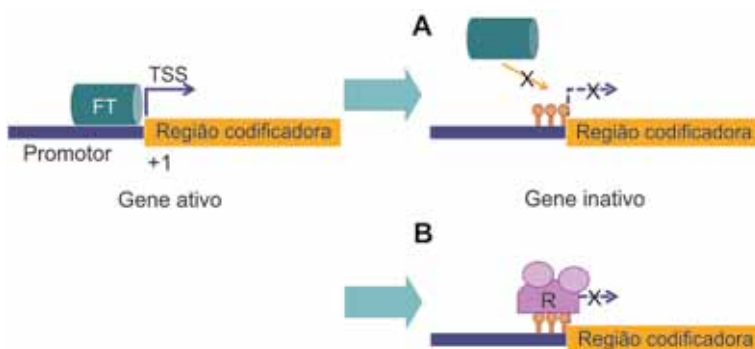
por processos enzimáticos. Na ausência de SAM, a desaminação da citosina metilada em timina induz a um processo de reparo, envolvendo a glicosilase e a AID citidina desaminase, que pode levar à desmetilação. A desmetilação ativa também ocorre por oxidação da 5mC em 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC) pelas dioxigenases da família *ten-eleven translocation* (Tet 1, 2 e 3) (GU et al., 2011).

## Silenciamento gênico

Na região promotora de genes, a metilação do DNA está relacionada ao silenciamento gênico (ENRIGHT et al., 2003), e 88% dos promotores ativos são regulados por metilação (TOST, 2010). O silenciamento gênico, mediado por metilação, pode ocorrer de duas maneiras (MUTHUSAMY et al., 2010), conforme mostra a Figura 4:

**Silenciamento direto** – Quando a própria metilação do DNA impede a ligação de fatores de transcrição ou afeta o estado de condensação e a estrutura da cromatina.

**Silenciamento indireto** – Quando a metilação do DNA promove o recrutamento de proteínas ligadoras de metil (MBP) que formam



**Figura 4.** Silenciamento gênico mediado por metilação do DNA. A) Mecanismo direto: a metilação do DNA (pirulitos alaranjados) impede a ligação de fatores de transcrição (FT) e o acoplamento da maquinaria de transcrição ao promotor, promovendo o silenciamento gênico; B) Mecanismo indireto: a metilação do DNA recruta proteínas ligadoras de metil (em rosa) que formam complexos repressores (R) no promotor, que suprimem a expressão do gene. TSS = sítio de início de transcrição.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

complexos repressores. É o mecanismo mais comumente usado para o silenciamento gênico.

A maioria das citosinas em CpG, principalmente em regiões repetitivas, elementos de transposição e regiões intergênicas é constantemente metilada, e o DNA é mantido em estado de heterocromatina, garantindo a estabilidade genômica e evitando a ocorrência de inserções, translocações e recombinações. Nessas regiões, a citosina metilada sofre altas taxas de mutação, pois ela é convertida em timina por desaminação hidrolítica espontânea (SHEN et al., 1994).

Por sua vez, citosinas não metiladas – que não sofrem altas taxas de mutação espontânea – aparecem em *clusters* CpG localizados em sequências regulatórias de genes. Esses *clusters*, chamados de ilhas CpG, são mantidos livres de metilação, facilitando o estabelecimento de uma estrutura de cromatina aberta e a promoção do início da transcrição. Assim, as ilhas CpG são marcos genômicos que compreendem os promotores da maioria dos genes (ILLINGWORTH et al., 2010). As regiões adjacentes (até 2 kb) às ilhas CpG também são reguladas por metilação do DNA e são chamadas de CpG *shores*. Essas CpG *shores* estão associadas ao controle da expressão gênica específica de tecido que ocorre durante a diferenciação tecidual normal (IRIZARRY et al., 2009).

A primeira caracterização das ilhas CpG foi feita por Gardiner-Garden e Frommer (1987), que descreveram que uma ilha CpG deve conter mais de 50% de conteúdo G+C, razão GC observada/GC esperada maior que 0,6 e tamanho mínimo de 200 bp. Após o sequenciamento do genoma de mamíferos, foi observado que essa definição de ilhas CpG englobava sequências que não são associadas a regiões promotoras, mas a elementos repetitivos. Assim, Takai e Jones (2003) desenvolveram um critério mais rigoroso para detectar ilhas CpG funcionais:

- O conteúdo G+C deve ser superior a 55%.
- A razão GC observada/GC esperada, superior a 0,65.
- O tamanho mínimo de 500 bp.

Essa definição inclui quase todas as ilhas CpG regulatórias e exclui aquelas associadas a elementos repetitivos (PAULSEN et al., 2008). Há também um algoritmo que foi desenvolvido para detectar ilhas CpG, o CpGcluster, o qual se baseia na distribuição da distância

física entre dinucleotídeos CpG vizinhos no cromossomo e não considera o conteúdo G+C, o tamanho e nem a fração CpG para identificar uma ilha CpG (HACKENBERG et al., 2006).

Ferramentas estatísticas disponíveis *on-line*, como o MethPrimer<sup>1</sup> (LI; DAHIYA, 2002) e o Emboss<sup>2</sup>, podem ser usadas para identificar as ilhas CpG em genes de interesse. Diferentemente da metilação das ilhas CpG, em regiões promotoras que levam ao silenciamento gênico, os altos níveis de metilação de DNA no corpo dos genes tendem a estar associados a genes ativamente transcritos (WU et al., 2012).

### **Proteínas ligadoras de metil (MBP)**

Há várias proteínas que interagem com especificidade à 5mC e regulam a expressão gênica de maneira indireta, como as proteínas de domínio de ligação metil-CpG (MBP), que podem ser consideradas como intérpretes do sinal covalente do DNA. Em muitos casos, essas proteínas exercem papel de ponte entre o DNA e as modificações da cromatina, além de servirem como moduladores da transcrição gênica. Em mamíferos, as MBP são divididas em três famílias estruturalmente diferentes (FOURNIER et al., 2012):

a) Família MBD (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4), que se ligam, simetricamente, a dinucleotídeos CpG metilados via domínio MBD:

- A MeCP2 está associada à repressão transcricional, pois recruta enzimas desacetilases de histonas (HDACs) e associa-se à DNMT1, e à regulação da conformação de cromatina de alta ordem.
- A MBD1 mantém a metilação em H3K9 em locos metilados, o que assegura a herança do estado de metilação, e contribui na formação da heterocromatina, ao interagir com a proteína 1 associada à heterocromatina (HP1). A MBD2, assim como a MeCP2, associa-se à DNMT1.
- A MBD2 associa-se à DNMT1.
- A MBD3 possui uma mutação e não interage com 5mC em humanos. E em outras espécies mamíferas interage com

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>>.

<sup>2</sup> Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>>.



remodeladores de cromatina dependentes de ATP e HDACs e participa na manutenção de *imprinting*.

- A MBD4 está envolvida no reparo de DNA e na desmetilação do DNA por glicolisação e excisão de base.

b) Proteínas Kaiso (ou ZBTB33) e semelhantes a Kaiso (ZBTB4; ZBTB38), que se ligam a sequências consenso não metiladas:

- A proteína Kaiso interage com o complexo co-repressor NCoR, cujo recrutamento é necessário na hipoacetilação de histonas e na metilação de H3K9 no promotor de genes alvo.
- A ZBTB38 interage com os co-repressores CtBPS que reprimem a transcrição num processo independente de metilação.

c) Proteínas de domínio SRA, domínio associado a *Set* e *Ring* (UHRF1 e UHRF2), ligam-se à H3K9 trimetilada (H3K9me3) pelo domínio TTD; ao DNA metilado pelo domínio SRA; e possuem atividade de E3 ubiquitina quinase pelo domínio RING:

- A UHRF1 reconhece e liga-se à arginina 2 da histona H3 (H3R2) não modificada, está envolvida na formação da heterocromatina pericentromérica, contribui para a memória epigenética (manutenção do padrão de metilação do DNA da célula-mãe para as células-filhas durante as divisões celulares) pelo recrutamento de DNMT1 e participa na manutenção de marcas de histonas.

Assim, o processo de metilação e de desmetilação do DNA é controlado pela ação de três classes de enzimas e de proteínas:

- As metiltransferases de DNA.
- A maquinaria de desmetilação.
- As proteínas que interagem com 5mC e DNMT.

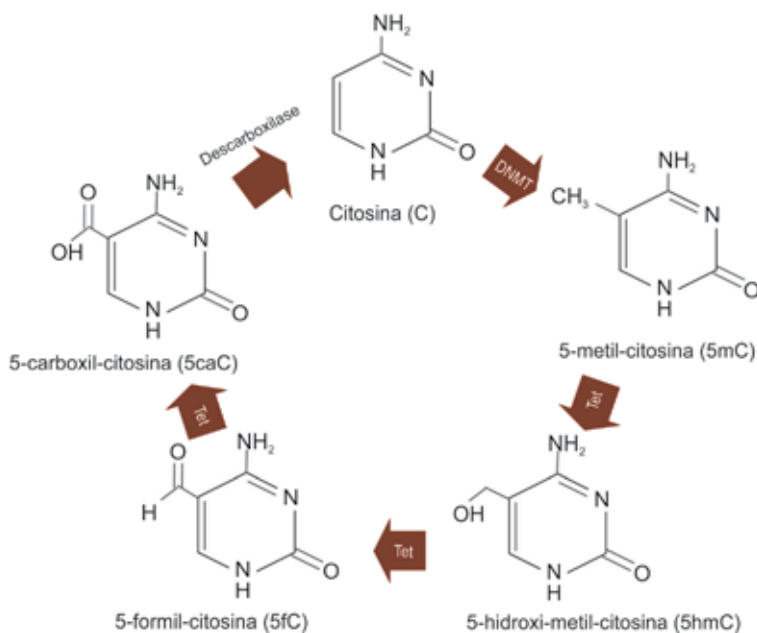
A metilação do DNA está relacionada com as modificações da cromatina, e as enzimas que modificam o DNA interagem com as enzimas que modificam as histonas (PAULSEN et al., 2008).

A metilação do DNA é mecanicamente e funcionalmente ligada a outros mecanismos epigenéticos, principalmente a metilação de lisina nas histonas: a metilação do DNA é correlacionada com a ausência de metilação de H3K4 e, mais fracamente, com a presença de metilação de H3K9. Além disso, a metilação de DNA é antagonista da variante de histona H2A.Z (FOURNIER et al., 2012).

## Outras modificações do DNA

A 5hmC (Figura 5), produto da oxidação da 5mC pelas enzimas da família Tet, é uma intermediária da desmetilação ativa do DNA que se acumula com a idade (SONG et al., 2012) e já foi detectada no cérebro e em células-tronco embrionárias, mas está ausente em linhagens celulares de câncer (LEE et al., 2011).

Além de ser um produto da desmetilação ativa, a 5hmC também promove desmetilação, pois evita a metilação de citosina por DNMT1, levando à desmetilação passiva durante as divisões celulares; ainda em decorrência da sua baixa afinidade por MeCP2, MBD1, MBD2 e MBD4, resulta na ativação da transcrição de genes (DAHL et al., 2011). A 5hmC é mais frequentemente encontrada em sequências ricas em



**Figura 5.** Modificações de citosina no DNA. A citosina (C) é modificada em 5-metil-citosina (5mC) pelas metiltransferases de DNA (DNMTs); a 5mC é modificada em 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC), 5-formil-citosina (5fC) e 5-carboxil-citosina (5caC) pelas dioxigenases da família *ten-eleven translocation* (Tet). A 5caC é removida por cascata de descarboxilação.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

G e em regiões imediatamente adjacentes a sítios de ligação de fatores de transcrição, e 50% das 5hmCs estão localizadas em elementos regulatórios distais, como sítios de ligação de p300, *enhancers*, sítios de ligação de CTCF e sítios de hipersensibilidade à DNaseI (SONG et al., 2012; YU et al., 2012).

Mais recentemente, outras modificações de citosina, intermediárias da desmetilação de 5mC produzidas pela Tet, foram descritas (Figura 5):

- 5-formil-citosina (5fC), dez vezes menos frequente que a 5hmC.
- 5-carboxil-citosina (5caC), dez vezes menos frequente que a 5fC.

Essas modificações diminuem a velocidade de transcrição pela RNA polimerase II, e a presença de 5fC é mais frequente em ilhas CpG de promotores e de éxons (SONG et al., 2012).

## Modificações epigenéticas do RNA

Além das modificações do DNA, já foram descritas mais de 100 tipos de modificações epigenéticas no RNA, a maioria em tRNA e em rRNA. A metil-6-adenosina (m<sup>6</sup>A) é a modificação mais abundante do RNA poliadenilado e a mais frequente em mRNA (SONG et al., 2012). A m<sup>6</sup>A é observada em vários genes, com maior frequência no início da 3'UTR, além de íntrons, 5'UTR, éxons, junções de *splicing*, RNAs não codificadores (ncRNAs) e regiões intergênicas (SALETTORE et al., 2012).

A m<sup>6</sup>A inibe a edição do RNA, pois regula o processamento do RNA em transcrito maduro e, por se apresentar em grande quantidade próxima ao códon de terminação (*stop* códon), pode regular a terminação da tradução (SALETTORE et al., 2012).

## Considerações finais

Entre os tipos de modificações epigenéticas que afetam a conformação da cromatina, destacam-se o posicionamento dos nucleossomos formados por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, o estado de compactação, a estrutura de enovelamento da cromatina, compostos por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, e a metilação do DNA. Enquanto numa determinada

região do DNA a ausência de nucleossomos torna essa sequência mais acessível aos fatores de transcrição e mais transcricionalmente ativa, a metilação do DNA na citosina (5mC) de sítios CpG, promovida pelas metiltransferases de DNA (DNMTs), é a principal marca de silenciamento gênico.

## Referências

- BALLARÉ, C.; CASTELLANO, G.; GAVEGLIA, L.; ALTHAMMER, S.; GONZÁLEZ-VALLINAS, J.; EYRAS, E.; LE DILY, F.; ZAURIN, R.; SORONELLAS, D.; VINCENT, G. P.; BEATO, M. Nucleosome-driven transcription factor binding and gene regulation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 49, p. 67-79, 2013.
- BIRD, A. Putting the DNA back into DNA methylation. **Nature Genetics**, New York, v. 43, p. 1050-1051, 2011.
- BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, p. 27-44, 2011.
- DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 412, p. 831-836, 2011.
- ENRIGHT, B. P.; JEONG, B. S.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, p. 1525-1530, 2003.
- ERNST, J.; KHERADPOUR, P.; MIKKELSEN, T. S.; SHORESH, N.; WARD, L. D.; EPSTEIN, C. B.; ZHANG, X.; WANG, L.; ISSNER, R.; COYNE, M.; KU, M.; DURHAM, T.; KELLIS, M.; BERNSTEIN, B. E. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. **Nature**, London, v. 473, p. 43-49, 2011.
- FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, Georgetown, v. 6, p. 791-797, 2011.
- FEIL, R.; BERGER, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 192-199, 2007.
- FINGERMAN, I. M.; ZHANG, X.; RATZAT, W.; HUSAIN, N.; COHEN, R. F.; SCHULER, G. D. NCBI Epigenomics: what's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, p. D221-D225, 2013.

FOURNIER, A.; SASAI, N.; NAKAO, M.; DEFOSSEZ, P. A. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 2, p. 51-264, 2012.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 196, p. 261-282, 1987.

GU, T. P.; GUO, F.; YANG, H.; WU, H. P.; XU, G. F.; LIU, W.; XIE, Z. G.; SHI, L.; HE, X.; JIN, S. G.; IQBAL, K.; SHI, Y. G.; DENG, Z.; SZABÓ, P. E.; PFEIFER, G. P.; LI, J.; XU, G. L. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, London, v. 477, p. 606-610, 2011.

HACKENBERG, M.; PREVITI, C.; LUQUE-ESCAMILLA, P. L.; CARPENA, P.; MARTÍNEZ-AROZA, J.; OLIVER, J. L. CpGcluster: a distance-based algorithm for CpG-island detection. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, p. 446, 2006.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 4, p. 229-249, 2009.

ILLINGWORTH, R. S.; GRUENEWALD-SCHNEIDER, U.; WEBB, S.; KERR, A. R. W.; JAMES, K. D.; TURNER, D. J.; SMITH, C.; HARRISON, D. J.; ANDREWS, R.; BIRD, A. P. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, 2010.

IRIZARRY, R. A.; LADD-ACOSTA, C.; WEN, B.; WU, Z.; MONTANO, C.; ONYANGO, P.; CUI, H.; GABO, K.; RONGIONE, M.; WEBSTER, M.; JI, H.; POTASH, J. B.; SABUNCIYAN, S.; FEINBERG, A. P. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nature Genetics**, New York, v. 41, p. 178-, 2009.

LEE, D.-H.; TRAN, D. A.; SINGH, P.; OATES, N.; RIVAS, G. E.; LARSON, G. P.; PFEIFER, G. P.; SZABÓ, P. E. MIRA-SNuPE, a quantitative, multiplex method for measuring allele-specific DNA methylation. **Epigenetics**, Georgetown, v. 6, p. 212-223, 2011.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, p0 1427-1431, 2002.

MARTINS, R. P.; FINAN, J. D.; GUILAK, F.; LEE, D. A. Mechanical regulation of nuclear structure and function. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 14, p. 431-455, 2012.

MIELE, V.; VAILLANT, C.; D'AUBENTON-CARAFI, Y.; THERMES, C.; GRANGE T. DNA physical properties determine nucleosome occupancy from yeast to fly. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 3746-3756, 2008.

MUTHUSAMY, V.; BOSENBERG, M.; WAJAPEYEE, N. Redefining regulation of DNA methylation by RNA interference. **Genomics**, San Diego, v. 96, p. 191-198, 2010.

NOZAKI, T.; YACHIE, N.; OGAWA, R.; KRATZ, A.; SAITO, R.; TOMITA, M. Tight associations between transcription promoter type and epigenetic variation in histone positioning and modification. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 416, 2011.

PAULSEN, M.; TIERLING, S.; WALTER, J. DNA methylation and the mammalian genome. In: TOST, J. **Epigenetics**. Georgetown, Norfolk: Caister Academic Press, 2008. p. 1-21.

RIVERA, R. M.; ROSS, J. W. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Oxford, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.02.001>.

SAJAN, S. A.; HAWKINS, R. D. Methods for identifying higher-order chromatin structure. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 13, p. 59-82, 2012.

SALETORE, Y.; MEYER, K.; KORLACH, J.; VILFAN, I. D.; JAFFREY, S.; MASON, C. E. The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. **Genome Biology**, London, v. 13, p. 175, 2012.

SHEN, J. C.; RIDEOUT III, W. M.; JONES, P. A. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 972-976, 1994.

SONG, C. X.; YI, C.; HE, C. Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, p. 1107-1116, 2012.

STRUHL, K.; SEGAL, E. Determinants of nucleosome positioning. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 20, p. 267-273, 2013.

TAKAI, D.; JONES, P. A. The CpG island searcher: a new www resource. In **Silico Biology**, Amsterdam, v. 3, p. 235-240, 2003.

TOLLEFSBOL, T. O. Epigenetics protocols. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 287. Totowa: Humana Press, 2004. 320 p.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 44, p. 71-81, 2010.

VAVOURI, T.; LEHNER, B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. **Genome Biology**, London, v. 13, p. R110, 2012.

WU, H.; TAO, J.; SUN, Y. E. Regulation and function of mammalian DNA methylation patterns: a genomic perspective. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 2, p. 240-250, 2012.

YU, M.; HON, G. C.; SZULWACH, K. E.; SONG, C. X.; ZHANG, L.; KIM, A.; LI, X.; DAI, Q.; SHEN, Y.; PARK, B.; MIN, J. H.; JIN, P.; REN, B.; HE, C. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. **Cell**, Cambridge, v. 149, p. 1368-1380, 2012.

ZENTER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 20, p. 259-266, 2013.

ZHANG, X.; JACOBSEN, S. E.; PELLEGRINI, M. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. **Nature**, London, v. 466, p. 388-392, 2010.

ZHOU, V. W.; GOREN, A.; BERNSTEIN, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 7-18, 2011.

## Capítulo 3

# **Modificações epigenéticas II**

## Modificações pós-traducionais de histonas

*Simone Cristina Méo Niciura*

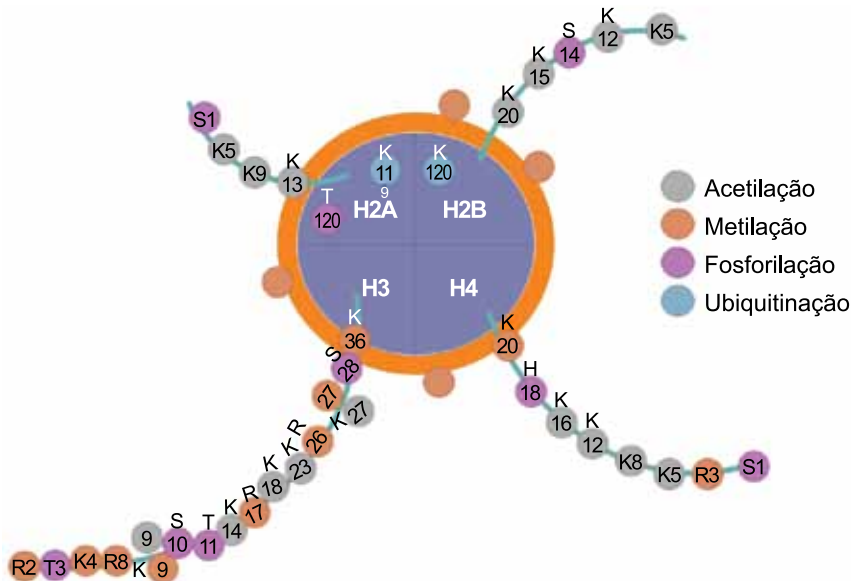


## Introdução

Conforme visto no Capítulo 2, as histonas são constituintes dos nucleossomos que afetam, diretamente, a estrutura da cromatina e apresentam sítios para modificações pós-traducionais e superfície para a interação com outras proteínas. As modificações de histonas estão ligadas, essencialmente, a todos os processos celulares que requerem o acesso ao DNA (ZENTER; HENIKOFF, 2013):

- Condensação.
- Transcrição.
- Replicação.
- Reparo.

Assim, além da metilação do DNA, o estado de condensação da cromatina e a regulação da expressão gênica também são determinados pelas modificações nas histonas (Figura 1).



**Figura 1.** Resíduos de arginina (R), histidina (H), lisina (K), serina (S) e treonina (T) nas histonas (em roxo) H2A, H2B, H3 e H4, modificados por acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Metilação do DNA (em alaranjado) enovelado nas histonas.

Fonte: modificado de Spivakov e Fisher (2007).

Por sua maior acessibilidade ao nucleossomo (cauda-N), a região aminoterminal das histonas é o sítio mais sujeito a modificações pós-traducionais, que podem ser, principalmente, de metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. A maioria das modificações de histonas consiste na adição de pequenos grupamentos químicos, exceto a ubiquitinação, que envolve a adição de um domínio globular de 76 aminoácidos, e a SUMOilação, com adição de um domínio de ~100 aminoácidos (ZENTER; HENIKOFF, 2013). As modificações mais estudadas são a acetilação, de natureza transitória, e a metilação, marca celular de longa duração, de resíduos de lisina na cauda aminoterminal das histonas H3 e H4 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

As modificações de histonas podem ocorrer em vários sítios e já foram descritos mais de 60 resíduos de aminoácidos com modificações, algumas delas mostradas na Tabela 1.

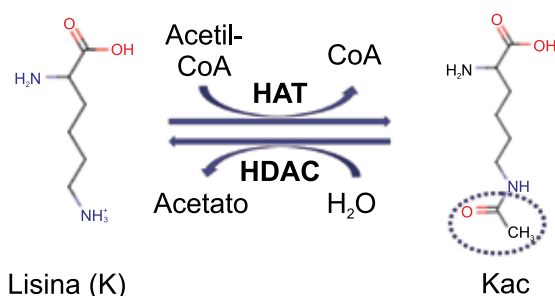
**Tabela 1.** Resíduos de lisina (K), serina (S) e arginina (R) na cauda aminoterminal das histonas H2A, H2B, H3 e H4, modificados por acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação.

Histonas	Acetilação	Metilação	Fosforilação	Ubiquitinação
H2A	K: 5 e 9	-	S: 1	K: 119
H2B	K: 5, 12, 15 e 20	-	-	K: 123
H3	K: 9, 14, 18 e 23	K: 4, 9, 27, 36 e 79 R: 2, 17 e 26	S: 10 e 28	-
H4	K: 5, 8, 12 e 16	K: 20 R: 3	S: 1	-

Fonte: modificado de Whitelaw e Garrick (2005).

## Acetilação e desacetilação de histonas

O aminoácido que sofre monoacetilação (ac) é a lisina (Figura 2) em histona H2A, H2B, H3 e H4 (NIGHTINGALE et al., 2006). A acetilação de histonas neutraliza a carga positiva nos resíduos de lisina, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre as histonas e o esqueleto fosfato do DNA, o que favorece a expressão gênica. Além disso, a acetilação de histonas promove o recrutamento e a ligação de proteínas regulatórias.



**Figura 2.** Acetilação de lisina (Kac) pelas acetiltransferases de histonas (HATs) e desacetilação pelas desacetilases de histonas (HDACs).

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

A acetilação de lisina nas histonas H3 e H4 está correlacionada com a cromatina ativa ou aberta, pois permite que vários fatores de transcrição tenham acesso aos promotores gênicos (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Assim, a acetilação da lisina (K) 5 na histona H4 (H4K5ac) reflete o estado total hiperacetilado da histona H4, e a acetilação de H3K9 e de H3K14 ocorre na região promotora de genes ativos. Além da acetilação de resíduos na cauda-aminoterminal, já foi descrita a acetilação de uma lisina no domínio globular da histona H3: H3K56ac (KOUZARIDES, 2007).

A acetilação das histonas é promovida pelas enzimas acetiltransferases de histonas (HATs), também chamadas de acetiltransferases de lisina (KATs), enquanto a desacetilação é feita pelas desacetilases de histonas (HDACs), conforme mostra a Figura 2 (ALLIS et al., 2007; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Geralmente, as HATs modificam mais do que uma lisina, e várias HATs fazem parte de grandes complexos multiproteicos reguladores da transcrição. A Tabela 2 mostra as principais HATs de humanos, seus substratos de histonas e suas funções.

As HATs são coativadores transcricionais que não se ligam, diretamente, ao DNA, mas a ativadores, como as proteínas de bromodomínios, as quais se ligam a resíduos específicos de lisinas nas histonas (ABCAM, 2011; KOUZARIDES, 2007):

- ATAD2 (H3K14ac).
- BRD2,3,4,7 (H3ac, H4ac).

**Tabela 2.** Modificações de acetilação em resíduos de lisina (K) das histonas H2A, H2B, H3 e H4, substratos para as acetiltransferases de histonas (HATs) em humanos e suas funções.

Substrato	HAT <sup>(1)</sup>	Função
H4K5, H4K12	KAT1 (HAT1)	Deposição de histona, reparo de DNA
H3K9, H3K14, H3K18, H2B	KAT2A (hGCN5)	Ativação da transcrição
H3K9, H3K14, H3K18, H2B	KAT2B (PCAF)	Ativação da transcrição
H2AK5, H2BK12, H2BK15	KAT3A (CBP)	Ativação da transcrição
H2AK5, H2BK12, H2BK15	KAT3B (P300)	Ativação da transcrição
H3 > H4	KAT4 (TAF1)	Ativação da transcrição
H4K5, H4K8, H4K12 e H4K16	KAT5 (TIP60 ou PLIP)	Ativação da transcrição, reparo de DNA
H3K14	KAT6A (MOZ ou MYST3)	Ativação da transcrição
H3K14	KAT6B (MORF ou MYST4)	Ativação da transcrição
H4K5, H4K8, H4K12 > H3	KAT7 (HBO1 ou MYST2)	Transcrição, replicação do DNA
H4K16	KAT8 (HMOF ou MYST1)	Limites de cromatina, compensação de dosagem, reparo de DNA
H3	KAT9 (ELP3)	-
H3K9, H3K14, H3K18	KAT12 (TFIIIC90)	Transcrição por DNA polimerase III
H3, H4	KAT13A (SRC1)	Ativação da transcrição
H3, H4	KAT13B (ACTR)	Ativação da transcrição
H3, H4	KAT13C (P160)	Ativação da transcrição
H3, H4	KAT13D (CLOCK)	Ativação da transcrição

<sup>(1)</sup> Os sinônimos pelos quais as HATs também são conhecidas encontram-se entre parênteses. Fonte: Allis et al. (2007).

- BRDT (H4K5ac, H4K8ac, H3K18ac).
- CBP/p300 (H3ac, H4ac, H3K36ac, H4K20ac).
- GCN5 (H4K16ac).
- hBRG1 (H3K14ac).
- PB-2 (H3K14ac).
- P/CAF (H3ac, H4ac, H4K16ac).
- *Polybromo*/BAF180 (H3ac).
- TAF1 (H3ac, H4ac).
- TRIM24 (H3K23ac).

Há aproximadamente 18 famílias de HDACs (COPELAND et al., 2009), que geralmente parecem não apresentar muita especificidade para um resíduo de lisina acetilada em particular (KOUZARIDES, 2007). Entretanto, há enzimas específicas, como (ABCAM, 2011):

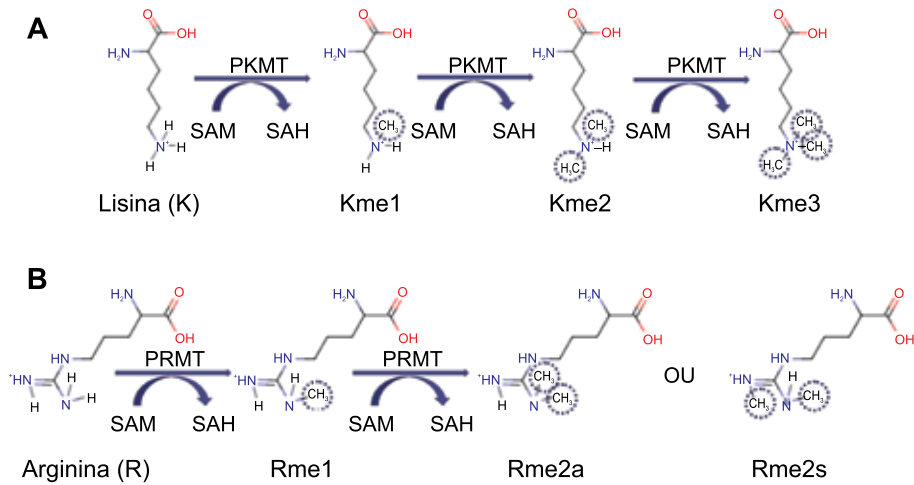
- SIRT4 para H4K16.
- SIRT6 para H3K9.
- HDAC1 e HDAC2 para H3K56.

## Metilação e desmetilação de histonas

Os aminoácidos sujeitos à modificação por mono- (me1), di- (me2) e trimetilação (me3) de histonas são lisina (me1, me2 e me3) e arginina (me1 e me2), conforme é mostrado na Figura 3 (NIGHTINGALE et al., 2006). A metilação não altera a carga do aminoácido, mas promove uma modificação química (grupamento metil) que aumenta a hidrofobicidade e a basicidade, o que leva à maior afinidade por moléculas aniônicas, como o DNA, e ao maior recrutamento e ligação de proteínas regulatórias.

As proteínas ligadoras de metil de histonas (HMBPs), do inglês *histone methyl-binding proteins*, promovem o recrutamento de outras proteínas regulatórias associadas à cromatina, como proteínas PHD, *Polycomb* e proteína 1 associada à heterocromatina (HP1), que mantém a metilação de H3K9. Além disso, as chances de transcrição são aumentadas pela interação das histonas metiladas com as proteínas de cromodomínios (Tabela 3).

Em decorrência de suas características e das variações nas proteínas recrutadas, a metilação de histonas pode promover a repressão



**Figura 3.** Metilação de lisina e arginina pelas metiltransferases de proteínas que transferem um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) do doador universal S-adenosil-L-metionina (SAM), resultando no aminoácido metilado e no produto S-adenosil-L-homocisteína (SAH): A) mono- (Kme1), di- (Kme2) e trimetilação de lisina (Kme3) pelas metiltransferases de lisina (PKMTs); B) mono- (Rme1) e dimetilação assimétrica (Rme2a) ou simétrica de arginina (Rme2s) pelas metiltransferases de arginina (PRMTs).

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

ou a ativação gênica, dependendo de qual resíduo de aminoácido é modificado. Por exemplo, a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79 provoca ativação gênica, enquanto a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 promove silenciamento (SEGA et al., 2007; TALASZ et al., 2005).

A metilação das histonas é promovida pelas metiltransferases de proteínas (PMTs), que provocam a metilação de resíduos de lisina (metiltransferases de lisinas ou PKMTs) ou arginina (metiltransferases de argininas ou PRMTs) pela transferência de metil do doador universal S-adenosil-L-metionina (SAM), resultando no subproduto S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Figura 3); já a desmetilação é promovida pelas desmetilases (COPELAND et al., 2009) (Tabela 3).

Com exceção da DOT1L, todas as PKMTs humanas contêm um domínio catalítico de 130 aminoácidos, chamado de domínio SET. O *enhancer of zeste homologue 2* (EZH2 ou KMT6) é uma proteína de domínio SET que forma a subunidade catalítica do complexo repressivo *Polycomb 2* (PRC2), que metila H3K27 (COPELAND et al., 2009).

**Tabela 3.** Modificações de metilação de resíduos de lisina (K) e arginina (R) nas histonas H1, H2A, H3 e H4, substratos para metiltransferases de proteínas (PMTs), desmetilases e proteínas regulatórias PHD e de cromodomínios (cromo).

Substrato	PMT <sup>(1)</sup>	Desmetilases <sup>(1)</sup>	PHD	Cromo
H1K25	KMT1C (G9a ou EHMT2) KMT1D (EHMT1) KMT6 (EZH2)	KDM4D (JMJD2D)	-	-
H1K186	KMT1C (G9a ou EHMT2) KMT1D (EHMT1)	-	-	-
H2AR3	PRMT6	-	-	-
H2AR11	PRMT1 PRMT6	-	-	-
H2AR29	PRMT1 PRMT6	-	-	-
H3R2	PRMT4 (CARM1) PRMT6	JMJD6	-	-
H3K4	KMT2A (MLL1) KMT2B (MLL2) KMT2C (MLL3) KMT2D (MLL4) KMT2E (MLL5) KMT2F (SETD1A) KMT2G (SETD1B) KMT2H (ASH1) KMT3E (SMYD3) KMT7 (SET7/9) WHSC1L1 (NSD3) PRDM0	KDM1 (LSD1 ou BHC110) KDM2A (JHDM1a ou FBXL11) KDM2B (JHDM1B) KDM5A (JARID1A ou RBP2) KDM5B (JARID1B ou PLU1) KDM5C (JARID1C ou SMCX) KDM5D (JARID1D ou SMCY) PHF8 (JHDM1F) NO66	BPTF/dm-NURF301 ING1,2,3,4,5 KIAA1718 Lid PHF2,8 PHO23 Pygo RAG2 TAF3	CHD1 hMRG15 PHF20L1
H3R8	PRMT5	-	-	-
H3K9	KMT1A (SUV39H1) KMT1B (SUV39H2) KMT1C (G9a ou EHMT2) KMT1D (EHMT1) KMT1E (ESET ou SETDB1) KMT1F (CLL8 ou SETDB2) KMT8 (RIZ1)	KDM1 (LSD1 ou BHC110) KDM1B (LSD2) KDM3A (JHDM2a) KDM3B (JHDM2b) KDM4A (JMJD2A ou JHD-M3A) KDM4B (JMJD2B) KDM4C (JMJD2C ou GASC1) KDM4D (JMJD2D) KDM7 (JHDM1D) PHF8 (JHDM1F)	CHD4 ICBP90 (Np95) JARID1C SMCX	BX1,3,5 CBX2,4,6,7,8 CDY1 HP1/spSwi6 L3MBTL1/2 MPP8 PC1/PC2/PC/ LHP1 SFMBT Tip60

Continua...

**Tabela 3.** Continuação.

Substrato	PMT <sup>(1)</sup>	Desmetilases <sup>(1)</sup>	PHD	Cromo
H3R17	PRMT4 (CARM1)	-	-	-
H3R26	PRMT4 (CARM1)	-	-	-
H3K27	KMT1C (G9A ou EHMT2) KMT1D (EHMT1) KMT6 (EZH2) KMT6B (EZH1) WHSC1L1 (NSD3)	KDM6A (UTX) KDM6B (JMJD3) PHF8 (JHDM1F) KDM7 (JHDM1D)	-	CBX2,4,6,7,8 PC1/PC2/PC/ LHP1
H3K36	KMT2H (ASH1L) KMT3A (SETD2) KMT3B (NSD1) KMT3C (SMYD2) WHSC1 (NSD2) SETMAR	KDM2A (JHDM1a ou FBXL11) KDM2B (JHDM1b ou FBXL10) KDM4A (JMJD2A ou JHDM3A) KDM4B (JMJD2B) KDM4C (JMJD2C ou GASC1) KDM8 (JMJD5) NO66	-	hMRG15 MSL3
H3K79	KMT4 (DOT1L)	-	-	-
H4R3	PRMT1 PRMT5 PRMT6	JMJD6	-	-
H4K20	KMT5A (SETD8) KMT5B (SUV420H1) KMT5C (SUV420H2) KMT3B (NSD1) WHSC1 (NSD2)	PHF8 (JHDM1F)	-	L3MBTL1 PHF20L1 SFMBT

<sup>(1)</sup> Os sinônimos, pelos quais as metiltransferases e as desmetilases também são conhecidas, figuram entre parênteses.

Fonte: Abcam (2011), Allis et al. (2007), Copeland et al. (2009) e Histome (2013).

Em parte, a metilação de histona afeta a expressão gênica por meio de sua associação à metilação do DNA, uma vez que as proteínas envolvidas na metilação do DNA (DNMTs) também interagem, diretamente, com as PMTs (IACOBUIZIO-DONAHUE, 2009).

### Proteínas regulatórias *Polycomb*

As proteínas do grupo *Polycomb* (PcG) são reguladoras epigenéticas essenciais para o desenvolvimento normal e a manutenção da



expressão gênica específica de tecido em organismos multicelulares (ZHOU et al., 2011). As proteínas PcG de mamíferos estão envolvidas (CASA; GABELLINI, 2012):

- Na memória celular durante o desenvolvimento e a diferenciação.
- Na proliferação celular.
- No *genomic imprinting*.
- Na inativação do cromossomo X em fêmeas.
- No desenvolvimento de câncer.

As proteínas desse grupo podem desempenhar sua atividade por interações de longa distância e em diferentes cromossomos, colaboram com os repressores para manter o silenciamento gênico e são contrabalanceadas pelas proteínas do grupo Tritorax (TrxG), que promovem a ativação gênica (CASA; GABELLINI, 2012; DE FELICI, 2011).

As proteínas PcG formam dois complexos multiproteicos principais: complexos repressivos *Polycomb* 1 (PRC1) e 2 (PRC2). O PRC1 possui o domínio *Ring1B*, que é uma ligase de ubiquitina E3, promove ubiquitinação de H2AK119 e, assim, evita a elongação do transcrito e promove, também, a compactação da cromatina (BLOMEN; BOONSTRA, 2011; CASA; GABELLINI, 2012). O PRC2, via subunidade catalítica EZH2, leva à H3K27me3, marca fundamental da ligação *Polycomb* associada ao silenciamento epigenético estável (ANGEL et al., 2011; DE FELICI, 2011). O PRC2 também contém a subunidade não catalítica *embryonic ectoderm development* (EED) que interage com as HDACs (DE FELICI, 2011).

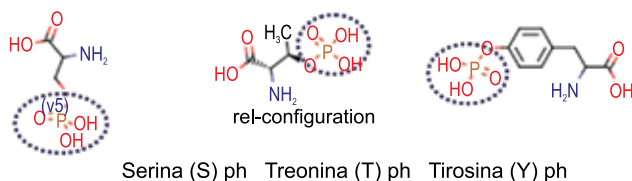
As modificações ativas, associadas à ativação gênica H3K4me3 e H3K27ac, são reguladas pelo grupo TrxG e facilitam a elongação transcricional (BLOMEN; BOONSTRA, 2011).

## Outras modificações de histonas

Outras possíveis modificações de histonas – como fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação, ADP-ribosilação, citrulinação, biotinilação e glicosilação – são descritas a seguir.

## Fosforilação de histonas

A fosforilação (ph) de histonas ocorre em serina (S), treonina (T) e tirosina (Y) (Figura 4) (HISTOME, 2013; NIGHTINGALE et al., 2006) e transmite uma carga negativa para o resíduo modificado. Como o esqueleto fosfato do DNA possui carga negativa, cria repulsão de cargas, o que potencialmente enfraquece a associação do DNA com as histonas (ZENTER; HENIKOFF, 2013).



**Figura 4.** Serina (S), treonina (T) e tirosina (Y) fosforiladas (ph).

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

A H3S10ph promove ativação transcricional, e a H3T118ph interfere no envelhecimento dos nucleossomos e torna a cromatina mais acessível, enquanto a fosforilação em H3 e em H1 leva à condensação cromossômica na mitose, e em H2A.XS139ph (ou  $\gamma$ -H2A.X) leva à apoptose. A fosforilação é feita por quinases, e a desfosforilação por fosfatases (Tabela 4).

**Tabela 4.** Modificações de fosforilação em resíduos de serina (S), treonina (T) e tirosina (Y) nas histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, substratos para as quinases e fosfatases de histonas.

Substrato	Quinase <sup>(1)</sup>	Fosfatase <sup>(1)</sup>
H1T10	GSK3B	-
H2AS1	MSK1 (RPS6KA5)	-
H2AT119	NHK-1	-
H2AT120	BUB1	-
H2AS139	ATM ATR PRKDC	PPM1D PPP2CA PPP2CB PPP4C

Continua...

**Tabela 4.** Continuação.

Substrato	Quinase <sup>(1)</sup>	Fosfatase <sup>(1)</sup>
H2AY142	WSTF (BAZ1B)	EYA1 EYA2 EYA3
H2BS14	MST1 (STK4)	-
H3T3	Haspin (GSG2)	-
H3S6	Aurora B (AURKB)	-
H3T6	PRKCB	-
H3S10	Aurora B (AURKB) IKK alfa (CHUK) MSK1 (RPS5KA5) MSK2 (RPS6KA4) Pim1 MAP3K8 PAK2 PKU-beta (TLK1)	PTPN10 (MKP-1)
H3T11	ZIP (DAPK3) PKN1 (DBK)	PPP1 gama
H3S28	Aurora B (AURKB) MSK1 (RPS5KA5) MSK2 (RPS6KA4)	-
H3Y41	JAK2	-
H3T45	PRKCD	-
H4S1	CKII	-

<sup>(1)</sup> Os sinônimos, pelos quais as quinases e as fosfatases também são conhecidas, estão entre parênteses.

Fonte: Abcam (2011) e Histome (2013).

## Ubiquitinação de histonas

A monoubiquitinação (ub) de histonas ocorre em lisina (K) (NIGHTINGALE et al., 2006), geralmente em H2A e em H2B. A ubiquitinação em corpos gênicos já foi associada à alongação da transcrição, enquanto em promotores provoca a repressão da arquitetura da cromatina (ZENTER; HENIKOFF, 2013). A H2BK123ub em *S. cerevisiae* está associada ao crescimento mitótico e meiótico; em H2BK123ub,

à ativação da transcrição; e em H2AK119ub, ao silenciamento gênico. As reações de ubiquitinação são promovidas pelas ligases de ubiquitina e as de desubiquitinação, pelas desubiquitinases (Tabela 5).

**Tabela 5.** Modificações de ubiquitinação em resíduos de lisina (K) das histonas H2A, H2B e H4, substratos para as ligases de ubiquitina e desubiquitinases de histonas.

Substrato	Ligase <sup>(1)</sup>	Desubiquitinase
H2AK119	Bmi RING1 RING2	MYSM1
H2AK121	RING2	-
H2BK120	RNF20 (BRE1A) RNF40 (BRE1B) RBX1 UBCH6	-
H4K91	DTX3L (BBAP)	-

<sup>(1)</sup> Os sinônimos, pelos quais as ligases também são conhecidas, estão entre parênteses. Fonte: Abcam (2011) e Histome (2013).

## SUMoilação de histonas

A mono-SUMoilação (sumo) de histonas ocorre em lisina (NIGHTINGALE et al., 2006) nas histonas H2A, H2B e H4 e foi uma modificação descoberta recentemente em leveduras. SUMO, do inglês *small ubiquitin-related modifier*, é similar à ubiquitinação e promove silenciamento quando associado à histona H4. A proteína ligadora de metil MBD1 também é modulada por um sistema de SUMoilação (FOURNIER et al., 2012).

## ADP-ribosilação de histonas

A mono- e poli-ADP ribosilação de histonas ocorre em glutamina e lisina das quatro histonas centrais e trata-se de uma marca transitória que também transmite carga negativa aos resíduos modificados e está associada ao afrouxamento da cromatina (NIGHTINGALE et al., 2006; ZENTER; HENIKOFF, 2013).

A ADP-ribosilação, pela enzima PARP1 (ARTD1), promove a adição de cadeias poli(ADP-ribose) a proteínas, como as histonas centrais (H2AK13, H2BK30, H3K27, H3K37 e H4K16), à histona H1 e a várias proteínas não histônicas, incluindo fatores de transcrição (MESSNER et al., 2010; TOLLEFSBOL, 2004).

### **Citrulinação, biotinição e glicosilação de histonas**

A citrulinação (ci), também chamada de desiminação, ocorre em resíduos de arginina de histonas e é mediada pelas enzimas desiminase de arginina de proteína (PAD). A citrulinação participa no processo de apoptose e evita a metilação dos resíduos de arginina por outras metiltransferases, como CARM1 (HISTOME, 2013). A PADI4 promove a citrulinação de H2AR3, H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 e de H4R3.

A biotinição (bio) de resíduos de lisina leva à formação de marcas abundantes em regiões reprimidas da cromatina (heterocromatina) e ao silenciamento gênico (HISTOME, 2013). A ligase de biotina HLCS promove a biotinição de H3K9, H3K18, H4K8 e H4K12.

A glicosilação em treonina e serina das histonas H2A, H2B e H4 está envolvida em repressão gênica, comprovada pela diminuição da sensibilidade da cromatina à digestão pela nuclease micrococcal. Entretanto, a glicosilação em H2BS112 está associada à H2BK120ub e à ativação da transcrição (ZENTER; HENIKOFF, 2013).

### **Código de histonas e estados de cromatina**

Em decorrência da existência de vários tipos de marcas de histonas e de inúmeros resíduos passíveis de modificação nas diferentes histonas, o número de combinações possíveis de modificações de histonas é enorme. Assim, o tipo e o número de modificações que direcionam uma resposta biológica são denominados de “código de histonas”. A hipótese do código de histonas é de que múltiplas modificações de histonas especificam funções subseqüentes únicas (NOZAKI et al., 2011).

Entretanto, é importante mencionar que o conceito de código de histonas ainda não está completamente estabelecido, visto que a combinação de modificações de histonas nem sempre leva a respostas diferentes das modificações isoladamente e mais de uma

combinação de modificações pode determinar uma mesma resposta biológica (RANDO, 2012).

Considerando o código de histonas, os diferentes aspectos da expressão gênica podem ser associados a diferentes padrões de modificações. Assim, os diferentes aspectos da expressão gênica são associados a diferentes padrões de modificações de histonas. A Tabela 6 mostra um sumário do padrão de expressão de um gene (ativo, inativo ou pausado) (BRETON et al., 2010; DE FELICI, 2011; NOZAKI et al., 2011; ZHOU et al., 2011) e dos níveis de expressão dos genes ativos (alta, intermediária ou baixa) (WANG et al., 2008), em função das marcas de histona neles presentes.

**Tabela 6.** Modificações de metilação (me) e acetilação (ac) de resíduos de lisina (K) nas histonas H2B, H3 e H4 e enriquecimento em H2A.Z, associadas à ativação (expressão gênica alta, intermediária e baixa), repressão ou pausa da expressão gênica.

Marca de histona	Ativação			Repressão	Pausa
	Alta	Intermediária	Baixa		
H2A.Z	X	X	X		
H2BK5me1	X				
H2BK5ac	X	X			
H2BK12ac	X	X			
H2BK20ac	X	X			
H2BK120ac	X	X			
H3K4me1	X	X	X		
H3K4me2	X	X	X		X
H3K4me3	X	X	X		X
H3K3ac	X	X			
H3K9me1	X	X	X		
H3K9me2				X	
H3K9me3				X	
H3K9ac	X	X			

Continua...

**Tabela 6.** Continuação.

Marca de histona	Ativação			Repressão	Pausa
	Alta	Intermediária	Baixa		
H3K14ac					
H3K18ac	X	X			
H3K27me1			X		
H3K27me2				X	
H3K27me3				X	X
H3K27ac	X	X			
H3K36me3		X			
H3K36ac	X	X			
H3K79me1	X				
H3K79me2	X				
H3K79me3				X	
H4K5ac	X	X			
H4K8ac	X	X			
H4K16ac	X				
H4K20me1	X				
H4K91ac	X	X			

As configurações específicas de cromatina podem ser determinadas pela sequência de DNA, pelos padrões de metilação do DNA, pelos fatores de transcrição, além de outras proteínas regulatórias, e pela atividade transcricional. As características de sequência, como ilhas CpG, promotores e elementos repetitivos, tendem a assumir padrões característicos de modificação e estados de cromatina, que facilitam o reconhecimento pelos fatores de transcrição e pela maquinaria regulatória (ZHOU et al., 2011). Assim como o padrão de expressão gênica, a função de diferentes regiões do genoma está associada a padrões de modificações de histonas (estados de cromatina) (BONN et al., 2012; DE FELICI, 2011; ZHOU et al., 2011).

Como definição para compreender os estados de cromatina, os *enhancers* ou acentuadores são elementos de DNA que recrutam fatores de transcrição, RNA polimerase II e reguladores de cromatina de modo a influenciar, positivamente, a transcrição de promotores gênicos localizados a jusante (ZHOU et al., 2011). Quando os *enhancers* são reconhecidos na fita de DNA, formam-se dobras que aproximam genes distantes à região de transcrição (SANYAL et al., 2012). Os *insulators* ou isoladores bloqueiam, fisicamente, o *enhancer* de modo que o estímulo não alcance o gene próximo a ele (SANYAL et al., 2012).

Por dependerem de processos regulatórios locais, os estados de cromatina variam no contexto celular (ZHOU et al., 2011). Ernst et al. (2011) mapearam 9 marcas de cromatina (CTCF, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K27me3, H3K27ac, H3K36me3 e H4K20me1) em 9 tipos celulares e verificaram 15 estados de cromatina, que incluíram:

- Promotor ativo.
- Promotor fraco.
- Promotor inativo/pausado.
- *Enhancer* forte.
- *Enhancer* fraco/pausado.
- *Insulator*.
- Transição transcricional.
- Elongação transcricional.
- Transcrição fraca.
- Repressão por *Polycomb*.
- Heterocromatina.
- Elemento repetitivo/CNV.

Pelo *The ENCODE Project Consortium* (2012), 7 estados de cromatina foram preditos em 2 tipos celulares:

- Elemento rico em CTCF (cromatina aberta; papel como *insulator*).
- Papel como *insulator*.
- *Enhancer* (cromatina aberta e H3K4me1).
- Região flanqueadora de promotor (região próxima ao sítio de início de transcrição – TSS).



- Região de baixa atividade ou reprimida (H3K27me3 *Polycomb*).
- Região de promotor que inclui o TSS (H3K4me3; cromatina aberta).
- Região transcrita (corpos gênicos; H3K36me3).
- *Enhancer* fraco (similar ao *enhancer*, mas com sinais mais fracos).

Na revisão feita por Zhou et al. (2011), sobre a associação entre elementos genômicos e modificações epigenéticas, foram descritas as seguintes marcas dos estados de cromatina:

**Promotor inativo** – H3K27me3, H3K9me3 e metilação de DNA.

**Promotor pausado** – H3K4me3, H3K27me3 e H2A.Z.

**Promotor ativo** – H3K4me2, H3K4me3, acetilação de histonas e H2A.Z.

**Corpos gênicos inativos** – H3K9me2 e H3K9me3.

**Corpos gênicos ativos** – H3K36me3, H3K79me2 e abundância de nucleossomos.

**Enhancers inativos** – H3K9me2, H3K9me3 e metilação de DNA.

**Enhancers ativos** – H3K3me1, H3K4me2, H3K27ac e H2A.Z.

Vale ressaltar que uma mesma função pode ser desempenhada por diferentes marcas de histona, dependendo do contexto de organização de cromatina na qual elas estão inseridas. Por exemplo, já foi descrita variação nas marcas de histonas que são dependentes do tipo de promotor TATA box ou CpG (NOZAKI et al., 2011) e dos níveis de expressão gênica alta, média ou baixa (VAVOURI; LEHNER, 2012). Vavouri e Lehner (2012) compararam promotores com ilhas CpG (CpG) e promotores sem ilhas CpG (não CpG) de genes com alta, média e baixa expressão, e observaram que, apesar de ambos os promotores apresentarem mesma densidade de éxons e de nucleossomos e mesmos níveis de metilação do DNA a jusante, as variações nas seguintes marcas de histonas foram observadas:

**H3K36me3 (marca de alongação de transcrição em corpos gênicos)** – Acúmulo linear em direção à extremidade 3' e associada aos níveis de expressão de genes com promotores CpG e não-CpG, mas maior acúmulo em promotores não CpG no nucleossomo +1 (primeiro nucleossomo após o TSS).

**H4K20me1, H2BK5me2 e H3K79me1/2/3 (marcas de elongação em corpos gênicos)** – Aumentam, rapidamente, em genes de alta expressão com promotores CpG, mas aparecem em menores níveis em genes com promotores não CpG, nos quais só aumentam em nucleossomos mais distantes do TSS.

**H3K9me1, H3K4me2, H3K4me1 e H3K27me1 (marcas de transcrição gênica)** – Aumentam com o aumento de expressão nos genes com promotores CpG; e menores níveis de modificação no nucleossomo +1 de genes de alta expressão.

**H3K36me1 (corpo gênico)** – Presente somente em genes ativos com promotores CpG; ausente em genes de alta expressão com promotores não CpG.

**H2AK5ac, H3K14ac e H3K23ac** – Diminuição na região próxima ao TSS somente em genes com promotores CpG.

## Combinação de eventos epigenéticos

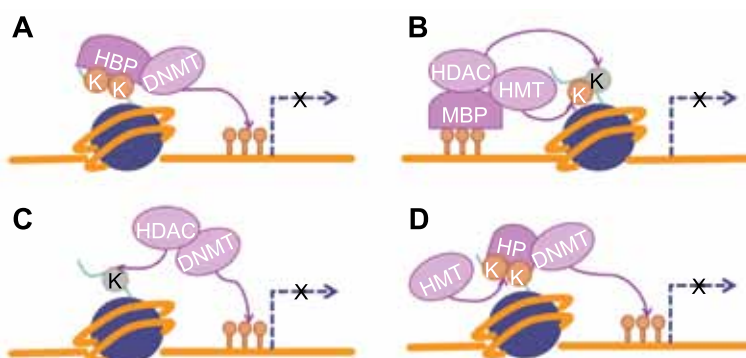
Os eventos epigenéticos não ocorrem isoladamente, eles são interdependentes e contribuem para o estado geral da cromatina e no controle epigenético da expressão gênica. A metilação de H3K9 inibe a acetilação de H3 em vários resíduos de lisina e pode promover metilação do DNA (Figura 5a), enquanto a metilação de H3K4 promove a acetilação da H3 (TOLLEFSBOL, 2004). A metilação do DNA estimula a desacetilação e a consequente metilação de H3K9 (Figura 5b). A metilação da histona H3K4 e a acetilação da H3K9 levam a uma estrutura de cromatina ativa, descondensada e geralmente associada a ilhas CpG não metiladas. Assim, em camundongos e em humanos, a densidade de ilhas CpG está correlacionada, positivamente, com o grau de H3K4me3 (ILLINGWORTH et al., 2010), sendo acompanhada por acetilação de histona, ocupação pela variante de histona H3.3 e hipersensibilidade à digestão com *DNaseI* (ZHOU et al., 2011). Por sua vez, a metilação de H3K9 é seguida por condensação e por formação de heterocromatina nas regiões genômicas afetadas. A fosforilação de histonas em resíduos adjacentes à lisina metilada reduz a afinidade da lisina pelas proteínas de ligação de metil (ZENTER; HENIKOFF, 2013).

As enzimas também atuam em conjunto: o domínio N-terminal da DNMT1 liga-se às HDACs e suprime a transcrição gênica pela facilitação da atividade de desacetilase de histonas (Figura 5c). Além da

HDAC1, a DNMT1 também é estabilizada pela desubiquitinase USP7 (HAUSP), mas é desestabilizada pela acetilação da acetiltransferase Tip60, o que permite a ubiquitinação de DNMT1 de modo a marcá-la para a degradação proteossomal (FOURNIER et al., 2012). A DNMT3A e a DNMT3B também recrutam as HDACs para silenciar genes e são encontradas, estavelmente, associadas aos nucleossomos, com altos níveis de metilação do DNA (WU et al., 2012).

Além disso, há participação das proteínas recrutadas na manutenção das marcas de histona, como (FOURNIER et al., 2012):

- Ligação entre DNMTs, HP1 e histonas metiladas (Figura 5d); TOLLEFSBOL, 2004).
- Ligação entre proteína ligadora de metil UHRF1, H3K9me3 e metiltransferase G9a.



**Figura 5.** Silenciamento gênico mediado por metilação de DNA, modificação de histonas e recrutamento de proteínas: A) histonas metiladas ligam-se a proteínas de ligação de histonas (HBPs), que recrutam metiltransferases de DNA (DNMTs), as quais promovem metilação do DNA (pirulitos alaranjados); B) DNA metilado recruta proteínas de ligação de metil (MBPs), que se associam a complexos de desacetilases de histonas (HDACs), os quais removem a acetilação de resíduos de lisina (K), e de metilases de histonas (HMTs), que promovem metilação de K; C) as DNMTs associam-se às HDACs, resultando em desacetilação de histonas e em metilação do DNA; D) a proteína de heterocromatina (HP) liga-se à histona metilada pelas HMTs e interage com as DNMTs, que promovem metilação do DNA.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

## Considerações finais

As modificações pós-traducionais das histonas também afetam a acessibilidade da cromatina e a expressão gênica. As modificações de histonas mais comuns são a acetilação, marca ativa de transcrição, e a metilação, que pode promover ativação ou silenciamento gênico, dependendo do resíduo de aminoácido modificado.

Há ação conjunta de diferentes tipos de modificações epigenéticas, e determinados padrões de combinações epigenéticas levam a funções subseqüentes específicas, denominadas de estados de cromatina.

## Referências

ABCAM. **Epigenetic modifications**. 2011. Disponível em: <<http://docs.abcam.com/pdf/chromatin/epigenetic-modifications.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

ALLIS, C. D.; BERGER, S. L.; COTE, J.; DENT, S.; JENUWIEN, T.; KOUZARIDES, T.; PILLUS, L.; REINBERG, D.; SHI, Y.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A.; WORKMAN, J.; ZHANG, Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell**, Cambridge v. 131, p. 633-636, 2007.

ANGEL, A.; SONG, J.; DEAN, C.; HOWARD, M. A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. **Nature**, London, v. 476, p. 105-108, 2011.

BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, p. 27-44, 2011.

BONN, S.; ZINZEN, R. P.; GIRARDOT, C.; GUSTAFSON, E. H.; PEREZ-GONZALEZ, A.; DELHOMME, N.; GHAVI-HELM, Y.; WILCZUŃSKI, B.; RIDDELL, A.; FURLONG, E. E. M. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. **Nature Genetics**, New York, v. 44, p. 148-156, 2012.

BRETON, A.; LE BOURHIS, D.; AUDOUARD, C.; VIGNON, X.; LELIEVRE, J. M. Nuclear profiles of H3 histones trimethylated on Lys27 in bovine (*Bos taurus*) embryos obtained after in vitro fertilization or somatic cell nuclear transfer. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 56, p. 379-388, 2010.

CASA, V.; GABELLINI, D. A repetitive elements perspective in Polycomb epigenetics. **Frontiers in Genetics**, Lausana, v. 3, p. 199, 2012.

COPELAND, R. A.; SOLOMON, M. E.; RICHON, V. M. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 8, p. 724-732, 2009.

DE FELICI, M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. **Stem Cells International**, London, v. 2011, p. 425863, 2011.

ERNST, J.; KHERADPOUR, P.; MIKKELSEN, T. S.; SHORESH, N.; WARD, L. D.; EPSTEIN, C. B.; ZHANG, X.; WANG, L.; ISSNER, R.; COYNE, M.; KU, M.; DURHAM, T.; KELLIS, M.; BERNSTEIN, B. E. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. **Nature**, London, v. 473, p. 43-49, 2011.

FOURNIER, A.; SASAI, N.; NAKAO, M.; DEFOSSEZ, P. A. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 2, p. 51-264, 2012.

**HISTOME**: the histone infobase. 2013. Disponível em: <<http://www.actrec.gov.in/histome/index.php>>. Acesso em: 7 mar. 2013.

IACOBUIZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 4, p. 229-249, 2009.

ILLINGWORTH, R. S.; GRUENEWALD-SCHNEIDER, U.; WEBB, S.; KERR, A. R. W.; JAMES, K. D.; TURNER, D. J.; SMITH, C.; HARRISON, D. J.; ANDREWS, R.; BIRD, A. P. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, p. e1001134, 2010.

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

MESSNER, S.; ALTMAYER, M.; ZHAO, H.; POZIVIL, A.; ROSCHITZKI, B.; GEHRIG, P.; RUTISHAUSER, D.; HUANG, D.; CAFLISCH, A.; HOTTIGER, M. O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. 6350-6362, 2010.

NIGHTINGALE, K. P.; O'NEILL, L. P.; TURNER, B. M. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 16, p. 125-136, 2006.

NOZAKI, T.; YACHIE, N.; OGAWA, R.; KRATZ, A.; SAITO, R.; TOMITA, M. Tight associations between transcription promoter type and epigenetic variation in histone positioning and modification. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 416, 2011.

RANDO, O. J. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 22, p. 148-155, 2012.

SANYAL, A.; LAJOIE, B. R.; JAIN, G.; DEKKER, J. The long-range interaction landscape of gene promoters. **Nature**, London, v. 489, p. 109-113, 2012.

SEGA, M. F.; LEE, K.; MACHATY, Z.; CABOT, R. Pronuclear stage porcine embryos do not possess a strict asymmetric distribution of lysine 9 dimethylation of histone H3 based solely on parental origin. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, p. 2-7, 2007.

SPIVAKOV, M.; FISHER, A. G. Epigenetic signatures of stem-cell identity. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 263-271, 2007.

TALASZ, H.; LINDNER, H. H.; SARG, B.; HELLIGER, W. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 38814-38822, 2005.

THE ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, London, v. 489, p. 57-74, 2012.

TOLLEFSBOL, T. O. **Epigenetics protocols**. Totowa: Humana Press, 2004. 320 p. (Methods in Molecular Biology, 287).

VAVOURI, T.; LEHNER, B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. **Genome Biology**, London, v. 13, p. R110, 2012.

WANG, Z.; ZANG, C.; ROSENFELD, J. A.; SCHONES, D. E.; BARSKI, A.; CUDDAPAH, S.; CUI, K.; ROH, T. Y.; PENG, W.; ZHANG, M. Q.; ZHAO, K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. **Nature Genetics**, New York, v. 40, p. 897-903, 2008.

WHITELAW, E.; GARRICK, D. The epigenome: epigenetic regulation of gene expression in mammalian species. In: RUVISNSKY, A.; GRAVES, J. A. M. (Ed.). **Mammalian genomics**. Wallingford: Cabi Publishing, 2005. p. 179-200.

WU, H.; TAO, J.; SUN, Y. E. Regulation and function of mammalian DNA methylation patterns: a genomic perspective. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 2, p. 240-250, 2012.

ZENTER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 20, p. 259-266, 2013.

ZHOU, V. W.; GOREN, A.; BERNSTEIN, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 7-18, 2011.



Capítulo 4

## **Modificações epigenéticas III**

### RNAs não codificadores (ncRNA)

*Flavia Lombardi Lopes*  
*Roberta Cordeiro Gaspar*  
*Daniel Robert Arnold*



## Introdução

Nos últimos anos, os estudos na área de regulação epigenética vêm adicionando uma nova dimensão ao entendimento dos processos de regulação da expressão gênica. Epigenética é a regulação herdável da expressão gênica, durante a mitose e a meiose, sem alteração na sequência do DNA (LEVENSON; SWEATT, 2005). A expressão é controlada através da modificação física do DNA ou RNA, seja direta ou indiretamente (proteínas, grupos metil), por fatores que se associam ao DNA/RNA.

Regulando o DNA e/ou o RNA, sem alterar a sequência deste, células geneticamente idênticas (como as células dentro de um mesmo organismo) são capazes de ser fenotipicamente distintas, dependendo de sua localização (por exemplo, células da pele são distintas de células da medula óssea dentro de um mesmo organismo, apesar de apresentarem o mesmo código genético) (LEVENSON; SWEATT, 2005). Além disso, o controle epigenético é reversível, podendo ser em curto prazo (expressão de um gene durante um período específico do desenvolvimento) ou em longo prazo (*imprinting* presente no genoma materno ou paterno).

A programação epigenética dos gametas e embriões iniciais é condição vital para o desenvolvimento de um novo organismo. Essa programação envolve a integração dos três processos epigenéticos:

- Metilação do DNA.
- Remodelamento das histonas.
- Ação de RNA não codificadores.

Esses eventos epigenéticos regulam a expressão gênica pelo controle da transcrição e/ou tradução.

Na última década, a visão de que a regulação da transcrição era comandada, exclusivamente, por fatores de transcrição, ganhou uma repaginada. Até então, acreditava-se que a porção do DNA que não era responsável por codificar proteínas, surpreendentemente cerca de 98% do genoma humano (MATTICK, 2005), nada mais era que *junk* (lixo), sem qualquer função biológica.

Outra ideia que foi derrubada na última década é a de que o genoma humano teria aproximadamente 100 mil genes, ideia essa

baseada na complexidade de seu organismo. Entretanto, o advento das técnicas de sequenciamento global de DNA e RNA mostra que, na realidade, o ser humano tem em torno de 20 mil genes codificadores de proteínas, o que o aproxima do número de genes observado em organismos muito mais simples como, por exemplo, o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Além disso, ao se comparar o genoma humano com o genoma de seu “parente” mais próximo, o chimpanzé, é possível notar que, aproximadamente 30% das proteínas ortólogas, codificadas nas duas espécies, são idênticas (WATANABE et al., 2004). Então, como explicar tamanha diferença entre espécies com tanta semelhança em tamanho e sequências de genomas? Diferença tanto em tamanho quanto em semelhança de sequências.

Recentemente, o que a comunidade científica mundial concluiu é que a informação necessária para agregar complexidade aos organismos está em outro lugar, além dos genes codificadores de proteínas. E esse outro lugar é exatamente dentro de uma classe de RNAs chamada RNAs não codificadores ou ncRNAs (do inglês *non-coding RNAs*).

Estudos conduzidos na última década descrevem a presença e a importância dos ncRNAs, de organismos unicelulares, plantas ou organismos mais complexos como os mamíferos. Os ncRNAs exercem as funções de reguladores de transcrição, *splicing*, transporte, controle de estabilidade e tradução de mRNA, participando assim de processos do desenvolvimento de organismos ou de tecidos, de mecanismos celulares, de processos fisiológicos e da etiologia de doenças. Esses ncRNAs estão divididos em várias classes, de acordo com tamanho, polaridade, maneira como são gerados e função. Neste capítulo, relata-se com mais detalhes, as seguintes categorias:

- *Long ncRNAs*.
- *Small ncRNAs*, incluindo-se *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs).
- *Small interfering RNAs* (siRNAs).
- MicroRNAs (miRNAs).

## Tipos de ncRNAs

Os ncRNAs são um grupo emergente de moléculas que regulam justamente a deposição das marcas epigenômicas (MATTICK et al.,

2009). Até o momento, todos os ncRNAs estudados agem por um mecanismo comum: associação com proteínas ligantes do RNA que, por sua vez, fazem parte de um complexo modificador da cromatina. RNAs não codificadores parecem direcionar esses complexos, ubiquitadamente expressos de uma maneira sequência-específica, às regiões da cromatina que serão modificadas. O melhor exemplo de modificação na cromatina direcionada por RNA são o processo de interferência por RNA, a inativação do cromossomo X e o *imprinting* (MORRIS, 2009), mas existem fortes evidências indicando que moléculas de RNA participam em todos os aspectos de regulação da estrutura da cromatina (MATTICK et al., 2009).

RNAs não codificadores são conhecidos há muito tempo, e apenas as classes que têm função no controle da transcrição e/ou tradução gênica é que foram descobertas mais recentemente. Entre os ncRNAs previamente conhecidos temos (WRIGHT; BRUFORD, 2011):

**RNA de transferência ou transportador (tRNA)** – Com aproximadamente 80 nucleotídeos, participam da tradução do mRNA para proteínas exercendo o papel de transporte dos aminoácidos até os ribossomos, no momento da formação e do alongamento da cadeia de peptídeos.

**RNA ribossômico (rRNA)** – O mais abundante dos RNAs exerce seu papel dentro dos ribossomos, facilitando a interação entre o tRNA e o mRNA, durante o processo de tradução.

**RNA spliceosomal ou *small nuclear RNA (snRNA)*** – Juntamente com uma série de ribonucleoproteínas, formam os spliceossomos, responsáveis pelo processamento de pré-mRNA (remoção de íntrons) em mRNA maduro.

***Small nucleolar RNA (snoRNA)*** – São responsáveis por modificações pós-transcricionais nos rRNAs, tRNAs e snRNAs.

A seguir, serão apresentados os ncRNAs que exercem papel regulatório na expressão de genes, por meio do controle da transcrição e/ou tradução. Esses ncRNAs são classificados em dois grupos, baseados, principalmente, no tamanho molecular:

- RNA não codificador longo (acima de 200 nucleotídeos).
- RNA não codificado curto (contendo de 18 a 22 nucleotídeos).

## **RNAs não codificadores longos (lncRNA; do inglês *long noncoding RNA*)**

A descoberta dessas sequências ocorreu pelo emprego das técnicas mais recentes de sequenciamento global de transcritos, pelas quais se percebeu que o genoma de eucariotos é altamente transcrito. Conforme relato anterior, apenas 2% do genoma resultam em proteínas. Conforme revisado em Clark e Mattick (2011), viu-se que essa alta quantidade de transcritos é formada pelas fitas senso e antisenso do genoma, ao redor de genes codificadores de proteínas ou em sequências intrônicas desses genes, bem como transcritas nas vastas regiões entre os genes, nas chamadas regiões intergênicas.

Apenas nas regiões intergênicas o número de lncRNAs até agora identificados já passa dos milhares (GUTTMAN et al., 2009; KHALIL et al., 2009; MARQUES; PONTING, 2009; ØROM et al., 2010), intrigando cada vez mais os pesquisadores sobre as diversas funções regulatórias desses RNAs, bem como mostrando a importância biológica dessa classe de RNAs (CARNINCI et al., 2005; CHENG et al., 2005; CLARK; MATTICK, 2011; ENCODE, 2007; HE et al., 2007, 2008; KAPRANOV et al., 2002; KATAYAMA et al., 2005; OKAZAKI et al., 2002; STOLC et al., 2004; WILHELM et al., 2008). Os lncRNAs apresentam tamanho de 200 nucleotídeos até superior a 100 kb (FURUNO et al., 2006; LYLE et al., 2000), sendo primariamente transcritos pela RNA polimerase, como os mRNA.

Inúmeros papéis já foram identificados para membros da família dos lncRNAs numa variedade de processos biológicos, como diferenciação celular (LOEWER et al., 2010; MERCER et al., 2010; RAVASI et al., 2006), controle epigenético da inativação do cromossomo X, um processo fundamental em animais, e o controle do *imprinting* genômico.

A compensação de dosagem trata do silenciamento de uma das cópias do cromossomo X em fêmeas, para garantir que machos e fêmeas tenham a mesma contribuição transcricional a partir desse cromossomo. Esse processo de silenciamento cromossomal, que será visto com maiores detalhes no Capítulo 7, envolve a participação do lncRNA chamado Xist, do inglês, *X-inactivation-specific transcript*. Um lncRNA de tamanho elevado (17 kb em murinos) é expresso a partir do cromossomo que será silenciado, recobrando este e recrutando

enzimas modificadoras de histona e enzimas que metilam o DNA, induzindo o silenciamento da fita em *cis* (BROCKDORFF et al., 1991; BROWN et al., 1991).

Conforme será abordado no Capítulo 6, o processo de *imprinting* trata do silenciamento de um alelo e da consequente expressão monoalélica (de origem materna ou paterna) de um grupo de genes. Esses genes costumam formar grupos ou *clusters* no genoma de uma grande variedade de espécies, e os três processos epigenéticos conhecidos (metilação do DNA, remodelamento de histonas e RNAs não codificadores) participam do controle desse intrigante e fundamental silenciamento alélico.

Alguns lncRNAs são transcritos dentro de regiões de *imprinting* ou *imprinting centers* (IC) e alguns participam do controle do *imprinting* de outros genes dentro do mesmo *cluster* gênico. Alguns exemplos de lncRNAs *imprinted* são o Kcnq1ot1 dentro do loco *KCNQ1* (THAKUR et al., 2004), Air do loco *IGF2R* (SLEUTELS et al., 2002) e o loco *H19/IGF2* (SCHOENFELDER et al., 2007). Kcnq1ot1, ou LIT1 em humanos, é um lncRNA de aproximadamente 90 kb responsável pelo silenciamento de uma região em torno de 1 megabase do genoma (CLARK; MATTICK, 2011; PANDEY et al., 2008; THAKUR et al., 2004).

O silenciamento envolve a participação dos outros dois processos epigenéticos, metilação do DNA e remodelamento de histonas e cromatina, através do recrutamento de metiltransferase de DNA (DNMT1) (MOHAMMAD et al., 2010) e enzimas e proteínas responsáveis por modificações repressivas nas histonas H3K9 e H3K27 da região, como metiltransferase de histona G9a e membros das famílias PRC1 e PRC2 (Ezh2 e Suz12), de maneira muito similar ao silenciamento do X pelo lncRNA Xist (CLARK; MATTICK, 2011; PANDEY et al., 2008; TERRANOVA et al., 2008). Já o H19 é um lncRNA com função ainda não conhecida, mas supostamente relacionado ao controle do crescimento. Esse lncRNA apresenta expressão monoalélica materna que, após *splicing* e poliadenilação, é exportado para o citoplasma, onde se encontra em altos níveis (BARTOLOMEI et al., 1991).

Para exercer uma variedade de funções biológicas, além do recrutamento de modificadores de cromatina, como mencionado acima, os lncRNAs podem também modular a expressão gênica pós-transcrição, durante processos como *splicing* e tradução de RNAs (GONG; MAQUAT, 2011; KUNG et al., 2013; TRIPATHI et al., 2010;

YOON et al., 2012;). Além de seu efeito sobre mRNA, os lncRNAs podem também interferir na função de microRNAs.

## **RNAs não codificadores curtos**

RNAs não codificadores curtos – do inglês *small ncRNA* – são originados a partir de precursores longos. A seguir, três classes principais de ncRNAs curtos serão discutidas. Essas três classes participam como moldes para que as proteínas Argonaute (AGO) regulem seus genes-alvo:

***Piwi-interacting RNAs (piRNAs)*** – Esses ncRNAs são os maiores dentro da classe de *small ncRNAs*, apresentando tamanho em torno de 25 a 30 nucleotídeos. Eles também diferem dos outros membros dessa classe em sua biogênese, a qual não envolve a enzima Dicer (VAGIN et al., 2006). Os piRNAs parecem estar presentes apenas em células germinativas ou em células somáticas em contato com células germinativas (ARAVIN et al., 2007). Sua função nas células germinativas é a de proteger contra transposons, promovendo o silenciamento destes (CASTEL; MARTIENSSEN, 2013; LIN, 2007). Os piRNAs também são encontrados em *clusters* no genoma.

***ncRNA de interferência (siRNA), do inglês *small interfering RNA**** – Esses pequenos ncRNAs derivam de RNAs de fita dupla precursores pela ação da enzima Dicer, associam-se a proteínas AGO e iniciam o processo de interferência por RNA nos transcritos-alvo. A fita dupla de RNA é formada por complementaridade de sequência e ligação nela própria pela formação de *hairpins* ou estruturas internas do tipo *stem-loop*, nas sequências chamadas *inverted-repeats* ou através de transposons.

Em mamíferos, o sistema imune nas células somáticas reconhece e destrói os precursores de fita dupla, mas em oócitos murinos, vários siRNAs já foram identificados (CHUNG et al., 2008; CZECH et al., 2008; GHILDIAL et al., 2008; KAWAMURA et al., 2008; OKAMURA et al., 2008a, 2008b; TAM et al., 2008; WATANABE et al., 2008), indicando que se trata de um processo endógeno com função biológica nesse tipo celular, sendo os transposons os maiores alvos do controle exercido por esses siRNAs endógenos, mas com a participação de indução de metilação de DNA e modificação de cromatina também (BROSNAN; VOINNET, 2009; SUH; BLELLOCH, 2011).

Por sua vez, siRNAs endógenos também foram reportados em células-tronco embrionárias, além de oócitos (BABIARZ et al., 2008; TAM et al., 2008; WATANABE et al., 2008). Os siRNAs participam do processo de maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário pré-implantacional (MA et al., 2010; SUH et al., 2010). O papel desses siRNAs endógenos só é possível graças à ausência do sistema de resposta interferon nesses tipos celulares (oócito e células-tronco embrionárias), que em células somáticas seria iniciado pela presença do precursor dsRNA, como mencionado anteriormente. Um estudo recente mostrou a presença de vários siRNAs endógenos em células germinativas masculinas, de modo que esses ncRNAs curtos também podem controlar o processo de espermatogênese (SONG et al., 2011).

**MicroRNAs (miRNA)** – Essas moléculas curtas de RNA (em torno de 22 nucleotídeos) que agem como reguladores pós-transcricionais, ligando-se complementarmente a mRNA-alvos, normalmente resultando em repressão da tradução ou em degradação do alvo, e conseqüentemente em silenciamento do gene-alvo (BARTEL, 2009).

Atualmente, existem mais de 600 miRNAs identificados em bovinos (miRBase<sup>1</sup>, e estima-se ser muito maior o número total presente. Os primeiros miRNAs foram identificados, pelo grupo do Dr. Victor Ambros em *Caenorhabditis elegans*, como uma classe de RNAs não codificadores curtos, envolvidos na regulação da expressão de genes (LEE et al., 1993). Esses miRNAs tendem a reprimir a tradução de mRNA-alvos, ao invés de efetuar a clivagem direta do transcrito.

Em animais, a ação dos miRNAs controlando a tradução do transcriptoma regula funções de importância fundamental em diversos processos biológicos, como:

- Desenvolvimento de organismos (celular, tecidual, organogênico).
- Regulação hormonal.
- Diversos processos da função celular.
- Adaptação a *stress* e ao meio ambiente.
- Participa da etiologia de algumas patologias como câncer (ver Capítulo 8).

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.mirbase.org>>.

Entre as classes de ncRNAs curtos, os miRNAs são os mais estudados. Eles originam-se de precursores dupla fita, os pri-miRNAs, do inglês *primary miRNA*, que são então processados em estruturas mais curtas contendo *stem-loop* (pre-miRNA) pela ação da enzima Drosha. Os pri-miRNAs são codificados no genoma por regiões intergênicas, intrônicas ou até mesmo codificadoras de mRNA. Seu modo de ação envolve pareamento com as regiões 3'-UTR, do inglês *3'-untranslated regions*, dos alvos, podendo a sequência do miRNA ser totalmente ou mesmo parcialmente complementar a esse alvo, e direcionamento dos complexos silenciadores ou complexo RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*, (BARTEL, 2009). A ação do complexo RISC pode levar ao silenciamento por sequestro do RNA ligado ao miRNA e à inibição da tradução, ou mesmo ao aceleração da destruição do mRNA, conforme já mencionado.

Os miRNAs encontram-se catalogados em inúmeras bases de dados como a miRBase (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011), com informação sobre sua origem genômica e acesso a sua sequência e ao seu alvo, quando conhecido.

## **Mecanismos de produção de ncRNA**

Geralmente, a transcrição e o processamento de ncRNA (nas formas longa e curta) são processos muito similares aos observados para RNAs codificadores de proteínas. A quantidade de passos necessários no processamento dos transcritos não codificadores dita a que classe – longa, média ou curta – o ncRNA pertence. Assim como RNA codificador de proteína, a maioria dos ncRNAs são transcritos pela RNA polimerase (RNAP) II. Alguns ncRNAs foram descritos na literatura como transcritos da RNAP III, comumente associada o RNA ribossomal 5S, ao tRNA e a outros RNAs curtos. Os ncRNAs originam-se a partir dos mais variados contextos genômicos:

### **Regiões gênicas (*enhancers*, *promoters*, 5'-UTR, íntrons, éxons e 3'-UTR) e intergênicas**

Assim como o mRNA, a maioria dos ncRNAs contém o *7-methylguanylate (m7G) cap* na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada no final 3' (BERTONE et al., 2004; CHENG et al., 2005; KAMPA et al.,

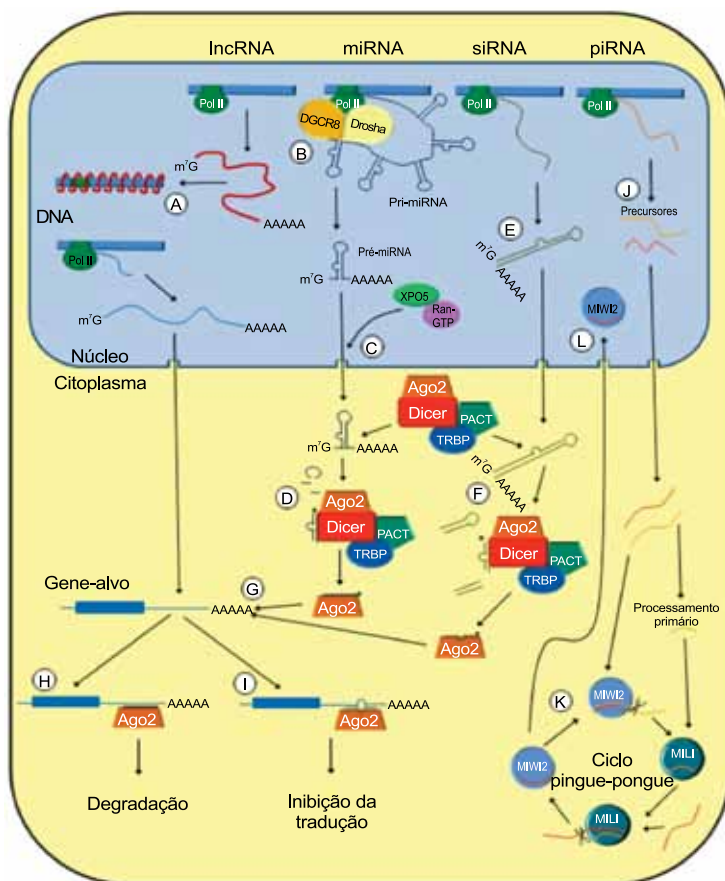


2004; RINN et al., 2003;). Além disso, os transcritos para ncRNA podem ter variantes de *splicing*. Todos esses fatores são típicos de transcrição guiada por RNAP II (TSIRIGOS; RIGOUTSOS, 2008). Em relação aos ncRNAs longos, existe pouco processamento após transcrição para torná-los funcionais. Já os ncRNAs curtos requerem maior processamento.

## miRNA

Os microRNAs passam por uma série de processos antes de atingir a maturidade na forma de um complexo miRNA ativo (Figura 1). Esses ncRNAs iniciam sua jornada como transcritos longos da RNAP II, os pri-miRNA, muitas vezes contendo milhares de nucleotídeos e formando *hairpins* ou *stem-loops*. Esses *hairpins* são, então, reconhecidos pelo complexo Drosha–DGCR8, também conhecido como complexo microprocessador. Drosha é uma endonuclease similar à RNase III, que contém um sítio de ligação ou *binding domain* para RNA dupla fita ou dsRNA (dsRBD), do inglês *double-stranded RNA-binding domain*, e dois sítios RNase III (COOK; CONTI, 2006; KIM et al., 2009). Já a DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) é uma proteína ligante de RNA de aproximadamente 120 kDa que reconhece a junção ssRNA-dsRNA (RNA fita simples – RNA fita dupla) do substrato (DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2004, 2006; LANDTHALER et al., 2004). A DGCR8 direciona a enzima Drosha para a clivagem na posição de 11 nucleotídeos a partir da junção do ssRNA.

O produto de 70 nucleotídeos, agora chamado de pré-miRNA, contém uma sequência de fita dupla complementar com um *stem-loop* de um lado e com ssRNA do outro. O fato de que Drosha e RNA pol II estão ligadas ao DNA próximo aos pré-miRNA *hairpins* (MORLANDO et al., 2008) – associado com a observação de que pré-miRNAs são gerados de sequências intrônicas pelo microprocessador antes do *splicing* dos éxons (KIM; KIM, 2007) – sugere que o processamento do pri-miRNA ocorre durante a transcrição. A partir de sua produção pelo complexo microprocessador, o pré-miRNA é então transportado pelas enzimas Exportina-5 e Ran-GTP para o citoplasma (BOHNSACK et al., 2004; LUND et al., 2004; YI et al., 2003, 2005).



**Figura 1.** Biogênese de RNAs não codificadores. RNAs não codificadores (ncRNAs) são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II). Os ncRNAs longos (lncRNA) agem via insulação do alvo (DNA) impedindo a transcrição (A). Os microRNAs (miRNA) formam uma série de alças *hairpin* durante a transcrição, que são processadas pelo complexo Droscha-DGCR8 para dar origem aos pré-miRNAs (B). Pré-miRNAs são exportados do núcleo pela ação da Exportina 5/Ran-GTP (C). Uma vez no citoplasma, a Dicer cliva o pré-miRNA em miRNAs maduros de 22 nt, que são associados à proteína Argonaute 2 (Ago2) (D). Essas proteínas formam o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). O processamento dos *small-interfering RNAs* (siRNA) começa com a formação de um longo ssRNA contendo um *hairpin* em sua sequência (E). Esse longo *hairpin* é processado pela enzima Dicer e inserido em Ago2, de maneira similar ao miRNA (F). Uma vez em Ago2, o miRNA ou siRNA podem reconhecer a região 3'-UTR do mRNA alvo (G) e promover degradação (H) ou inibição da tradução do mRNA alvo (I). Precursores de *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs) (J) são processados pelas proteínas Piwi (MIWI e MILI). A atividade de nuclease de MILI produz uma ponta 5' que é reconhecida por MIWI2. MIWI2 então produz uma ponta 5' que é reconhecida por MILI (K). Esse processo circular (ciclo *ping-pong*) permite a produção contínua de piRNAs. MIWI2 é transportada de volta ao núcleo (L).

Ilustração: Daniel Robert Arnold.

## Dicer e o complexo de silenciamento induzido por RNA

A expressão complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) vem do inglês *RNA-induced silencing complex*. Uma vez no citoplasma, Dicer, que é outra ribonuclease, cliva o pré-miRNA, para dar origem ao miRNA maduro, com sua fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse duplex é designado como miRNA/miRNA\*, no qual miRNA representa a fita antissenso, ou fita-guia, e miRNA\* representa a fita senso ou “passageira”. Apenas a fita-guia é incorporada ao complexo miRISC, para exercer a função biológica, enquanto a fita passageira é eliminada e degradada (HAMMOND et al., 2000).

Dicer é uma enzima RNase III citoplasmática, altamente conservada, de aproximadamente 200 kDa. Ela contém um sítio ou domínio helicase, um sítio PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), um sítio dsRBD (*dsRNA-binding domain*) e duas subunidades RNase III (COOK; CONTI, 2006; KIM et al., 2009). Mais de uma forma de Dicer foram identificadas em algumas espécies. No entanto, mamíferos apresentam uma única forma, a Dicer 1.

A Dicer associa-se in vivo com PACT (*protein activator of the interferon-induced protein kinase*) e TRBP (*transactivation-response element RNA-binding protein*), para facilitar a maturação do miRNA. Essas proteínas associadas não são necessárias para a ação da Dicer in vitro. Entretanto, essas proteínas associadas a Dicer são importantes para a separar as fitas duplas de miRNA e para posicionar a fita-guia no complexo RISC (CHENDRIMADA et al., 2005; GREGORY et al., 2005; HAASE et al., 2005; SINGH et al., 2008).

A forma madura do miRNA de 22 nucleotídeos é então colocada numa proteína Ago (Argonaute) do complexo RISC. A fita-guia permanece em Ago como um miRNA maduro, e a fita passageira (miRNA\*) é degradada por Ago. As proteínas Ago têm importância fundamental no silenciamento promovido por miRNAs. A Ago2 é uma de quatro proteínas Ago (Ago1 a Ago4) em mamíferos (CARMELL et al., 2002), mas é a única com atividade de clivagem, essencial ao desenvolvimento de um organismo (LIU et al., 2004; MEISTER et al., 2004; MORITA et al., 2007; RAND et al., 2004).

O complexo RISC, associado à fita-guia (miRNA), passa a se chamar miRISC e é funcionalmente ativo, podendo se ligar ao mRNA, impedindo sua tradução ou até mesmo degradando-o.

## siRNA

Precusores de siRNA endógenos são produzidos de três maneiras (CHUNG et al., 2008; CZECH et al., 2008; GHILDIYAL et al., 2008; KAWAMURA et al., 2008; TAM et al., 2008; WATANABE et al., 2008):

- Pares senso/antisense derivados de transposons, como o principal mecanismo.
- Transcrição convergente de genes codificadores de proteínas ou de regiões não anotadas do genoma.
- Fitas simples, mas autocomplementares, formando uma longa estrutura contendo *stem-loop*.

Por sua vez, precusores dupla-fita (dsRNAs) tendem a apresentar complementaridade imperfeita, formando pequenas alças nas regiões não complementares.

A maneira como essas estruturas são exportadas para fora do núcleo é um processo ainda desconhecido. Sabe-se que Dicer é necessária para a produção de siRNA endógenos em mamíferos. Uma vez no citoplasma, a Dicer cliva o precursor e posiciona o siRNA na proteína Ago2 do complexo RISC, de maneira bem similar ao observado nos miRNAs.

## piRNA

Os precusores de fita simples dos *piwi-interacting* RNAs (piRNAs) são transcritos de regiões intergênicas como regiões repetitivas, transposons ou *clusters* de piRNAs. Ao contrário dos miRNAs e dos siRNAs, piRNAs são produzidos sem a ação de Dicer. Entretanto, piRNAs associam-se com proteínas da subfamília Piwi que apresentam atividade de nuclease e estão envolvidas na biogênese de piRNAs. Esse processo envolve mecanismos primários e secundários. Ele ocorre no citoplasma, mas não se sabe como os precusores chegam até lá.

Até o momento, fatores de processamento primário e colocação de piRNAs nas proteínas PIWI (MIWI e MILI) são desconhecidos; já no processamento secundário, MILI introduz a clivagem ao precursor, definindo assim a ponta 5', que é então reconhecida e aceita pela proteína MIWI2 (ARAVIN et al., 2008). Por sua vez, MIWI2 cliva o precursor da fita de sentido contrário, criando o sítio de ligação para MILI.

A nuclease que cria a parte 3' ainda é desconhecida. Esse processo circular, conhecido como ciclo pingue-pongue, pode ocorrer continuamente, aumentando assim a população de piRNAs (BRENNECKE et al., 2007; GUNAWARDANE et al., 2007).

## Papel dos ncRNAs nos processos reprodutivos

### Gameta feminino

A importância de ncRNAs curtos nas fêmeas é evidenciada por uma série de estudos mostrando que perda das enzimas responsáveis pela formação de ncRNAs, em murinos, resulta em falhas reprodutivas. Perda das enzimas Dicer e Ago2 em oócitos leva a uma parada meiótica e a defeitos na formação dos fusos e consequente falha na segregação cromossomal (KANEDA et al., 2009; MURCHISON et al., 2007; SUH et al., 2010; SUH; BLELLOCH, 2011; TANG et al., 2007). Acredita-se que essa perda da enzima Dicer cause o fenótipo com resultado da perda da produção e da função dos siRNAs endógenos, uma vez que os miRNAs, apesar de também serem produzidos pela Dicer, necessitam também da ação da enzima DGCR8, e a perda dessa enzima em oócitos não resulta em alteração qualquer de fenótipo em relação a animais *wild-type* ou controle (SUH et al., 2010).

Assim como miRNAs, a terceira classe de ncRNAs curtos, os piRNAs, também são encontrados em oócitos, mas sua função não parece ser essencial, uma vez que uma deleção das proteínas PIWI, às quais esses RNAs se associam para exercer sua função, não resulta em alteração nos oócitos (CARMELL et al., 2007; COOK; BLELLOCH, 2013; DENG; LIN, 2002; KURAMOCHI-MIYAGAWA et al., 2004).

### Gameta masculino

Deleção das proteínas PIWI, mais especificamente MILI, MIWI e MIWI-2 (*mammalian Piwi homologs*), acarreta parada meiótica em diferentes estádios do ciclo meiótico, ativação de retrotransposons e até mesmo esterilidade, sugerindo uma função importante dos piRNAs durante o processo de espermatogênese (ARAVIN et al., 2007; CARMELL et al., 2007; CASTEL; MARTIENSSEN, 2013; COOK; BLELLOCH, 2013; DENG; LIN, 2002; KURAMOCHI-MIYAGAWA et al., 2004, 2008; LIN, 2007).

Já a perda de Dicer em células germinativas primordiais masculinas leva a inúmeros defeitos na espermatogênese, na proliferação de células, bem como na própria morfologia e na motilidade (COOK; BLELLOCH, 2013; HAYASHI et al., 2008; MAATOUK et al., 2008). Já a deleção de Drosha, que participa apenas da biogênese de miRNAs em espermátócitos, leva à perda de tipos celulares como espermátides e até mesmo esterilidade (azoospermia) (WU et al., 2012), indicando que miRNAs apresentam função importante no desenvolvimento do gameta masculino.

## **Embriões**

Os ncRNAs curtos são fundamentais no desenvolvimento embrionário e fetal. Deleção da ribonucleotase Dicer é letal em camundongos, com morte embrionária aos 7,5 dias de gestação (BERNSTEIN et al., 2003). Estudos recentes indicam que, de fato, os miRNAs têm funções regulatórias vitais durante o desenvolvimento embrionário. Mineno et al. (2006) demonstraram a presença de 390 miRNAs em embriões e em fetos murinos de 9,5 a 11,5 dias da gestação, bem como expressão temporal diferenciada.

Além disso, a proteína Ago2, envolvida na formação do complexo RISC de ação dos miRNAs, é fundamental no desenvolvimento no momento de ativação do genoma embrionário. Nesse período, são destruídos os produtos remanescentes derivados da transcrição de genes maternos ou oocitários. Isso sugere que o processo epigenético – mediado pela interferência de miRNAs – deve participar de maneira importante nessa destruição (LYKKE-ANDERSEN et al., 2008).

Durante o estágio de mórula, miRNAs parecem estar envolvidos em adesão celular, enquanto no estágio de blastocisto, eles devem ter importância na diferenciação celular, podendo estar associados com a manutenção da pluripotência (YANG et al., 2008). De fato, estima-se que existam em torno de 110 mil transcritos totais de miRNAs em células-tronco embrionárias de murinos (CALABRESE et al., 2007).

Conforme mencionado anteriormente, miRNAs podem se ligar, imperfeitamente, a seus genes-alvo, o que dificulta a identificação destes. Entretanto, muitos genes já tiveram seu papel identificado como sendo importantes na regulação de genes específicos da massa celular interna (MCI), tanto em células-tronco embrionárias de camundongos

quanto em células de humanos. Por exemplo, miR-134 e miR470 controlam *SOX2* e *OCT4*, respectivamente, e miR-296 e miR470 regulam a expressão de *NANOG* (TAY et al., 2008). Em células-tronco embrionárias de humanos, miR-145 também reprime a expressão de *OCT4*, *SOX2* e *KLF4* (XU et al., 2009). Todos esses miRNAs regulam, negativamente, fatores de pluripotência, indicando que podem estar envolvidos na indução da formação de células trofoblásticas, bem como na diferenciação de células da MCI em outros tipos celulares.

Um gene alvo do miR-290, específico de células-tronco embrionárias, já foi identificado. Essa família de miRNAs reprime o gene *RBL2*, que por sua vez age reprimindo a expressão da metiltransferase de DNA DNMT3, responsável pela metilação *de novo* em células embrionárias e germinativas. Assim, a perda dessa família de miRNAs eleva a expressão de *RBL2*, que por sua vez reduz DNMT3, levando à hipometilação em células-tronco (BENETTI et al., 2008; SINKKONEN et al., 2008). Até o momento, apesar de um pequeno grupo de miRNAs ter sido identificado em células trofoblásticas, nenhum alvo foi identificado nesses miRNAs. A identificação de mais miRNAs, bem como alvos para eles, contribuirá para que se entenda o papel desse processo epigenético na segregação das células totipotentes embrionárias em massa celular interna e trofoblasto.

Recentemente, foram publicados alguns estudos sobre miRNAs em bovinos. Abd El Naby et al. (2013) relataram diminuição dramática em seis miRNAs, altamente expressos em oócitos, durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, esses miRNAs seguem um padrão similar de degradação dos demais transcritos maternos, sugerindo que eles sejam parte ativa do processo de degradação dos transcritos maternos que ocorre durante a ativação do genoma embrionário. Em estudos envolvendo embriões produzidos por transferência nuclear em bovinos, Castro et al. (2010) mostraram que, em embriões que sobreviveram ao 17º dia da gestação, 14 de 56 miRNA avaliados estavam alterados quando comparados com embriões produzidos por fertilização *in vitro*.

## Placenta

MicroRNAs já foram descritos associados aos mais diversos eventos reprodutivos, incluindo processos de modulação uterina como

a implantação (CHAKRABARTY et al., 2007; PAN; CHEGINI, 2008). Um estudo muito interessante, conduzido em 2007, demonstrou um perfil de tecido específico para a expressão de miRNAs, incluindo um perfil placentário (LIANG et al., 2007), com um número importante de genes trofoblástico-específicos (DONKER et al., 2012; MORALES-PRIETO et al., 2012).

Outros estudos também identificaram que a placenta apresenta inúmeros miRNAs agrupados em três *clusters* em humanos, nos seguintes locos (LIANG et al., 2007; MIURA et al., 2010; MORALES-PRIETO et al., 2012; MORALES-PRIETO; MARKERT, 2011), apresentando expressão temporal e diferenciada em pacientes com parto prematuro (MAYOR-LYNN et al., 2011):

- Cromossomo 14 (14q32).
- Cromossomo 19 (19q13.41).
- *Cluster* denominado miR-371-3.

É importante ressaltar que esses *clusters* encontram-se em regiões *imprinted* do genoma, ou seja, de controle e expressão monoalélica (BORTOLIN-CAVILLE et al., 2009; SEITZ et al., 2004).

## **Tecidos somáticos reprodutivos**

Além do fenótipo causado em células germinativas, a deleção de Dicer1 em tecidos somáticos reprodutivos também causa falhas consideráveis em suas funções.

Em camundongos, deleção dessa enzima em células da granulosa nos ovários provoca (GONZALEZ; BEHRINGER, 2009; LEI et al., 2010):

- Aumento no número de folículos primordiais.
- Recrutamento acelerado de folículos.
- Maior número de folículos degenerados.
- Oócitos anormais.
- Infertilidade.

Por sua vez, ausência de Dicer1 em células mesenquimais do oviduto também causa defeito no transporte de embriões (GONZALEZ; BEHRINGER, 2009), possivelmente por falhas na formação da camada muscular lisa nessas estruturas.



Esse modelo transgênico condicional também apresenta defeitos na junção tubo-uterina. Além disso, também foram encontradas anormalidades no útero dessas fêmeas mutantes para Dicer, como redução no número de glândulas endometriais, importantes para secreção de hormônios fundamentais no estabelecimento e na manutenção da gestação, bem como para o transporte de nutrientes (GONZALEZ; BEHRINGER, 2009; LUENSE et al., 2009).

Em machos murinos, a deleção da Dicer1 em células de Sertoli resulta em severos defeitos na espermatogênese e eventual degeneração testicular após o nascimento, seguida por enorme alteração na expressão gênica no tecido testicular (PAPAIOANNOU et al., 2009, 2011), que por sua vez pode ter causado alteração na sinalização hormonal, controlada pelas células de Sertoli, e de fundamental importância na espermatogênese

## Considerações finais

Conforme abordado neste capítulo, a descoberta de transcritos não codificadores (curtos e longos) adicionou um novo nível de complexidade aos processos de controle da transcrição e da tradução do RNA mensageiro. Isso também faz entender a importância das vastas sequências genômicas não codificadoras de proteínas, previamente vistas como não funcionais. A expressão temporal e específica de tecido posiciona os ncRNAs como figuras importantes no entendimento dos padrões de expressão gênica, função e fenótipo tão diferenciados entre tipos celulares de órgãos distintos, descrevendo assim importante papel desses RNAs no controle epigenético do desenvolvimento, da manutenção e da função dos organismos.

## Referências

ABD EL NABY, W. S.; HAGOS, T. H.; HOSSAIN, M. M.; SALILEW-WONDIM, D.; GAD, A. Y.; RINGS, F.; CINAR, M. U.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; TESFAYE, D. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 21, p. 31-51, 2013.

ARAVIN, A. A.; HANNON, G. J.; BRENECKE, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. **Science**, Washington, DC, v. 318, p. 761-764, 2007.

ARAVIN, A. A.; SACHIDANANDAM, R.; BOURC'HIS, D.; SCHAEFER, C.; PEZIC, D.; TOTH, K. F.; BESTOR, T.; HANNON, G. J. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice.

**Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, p. 785-799, 2008.

BABIARZ, J. E.; RUBY, J. G.; WANG, Y.; BARTEL, D. P.; BLELLOCH, R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes & Development**, New York, v. 22, p. 2773-2785, 2008.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 215-233, 2009

BARTOLOMEI, M. S.; ZEMEL, S.; TILGHMAN, S. M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. **Nature**, London, v. 351, p. 153-155, 1991.

BENETTI, R.; GONZALO, S.; JACO, I.; MUÑOZ, P.; GONZALEZ, S.; SCHOEFTNER, S.; MURCHISON, E.; ANDL, T.; CHEN, T.; KLATT, P.; LI, E.; SERRANO, M.; MILLAR, S.; HANNON, G. J.; BLASCO, M. A. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 15, p. 238-279, 2008.

BERNSTEIN, E.; KIM, S. Y.; CARMELL, M. A.; MURCHISON, E. P.; ALCORN, H.; LI, M. Z.; MILLS, A. A.; ELLEDGE, S. J.; ANDERSON, K. V.; HANNON, G. J. Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics**, New York, v. 35, p. 215-217, 2003.

BERTONE, P.; STOLC, V.; ROYCE, T. E.; ROZOWSKY, J. S.; URBAN, A. E.; ZHU, X.; RINN, J. L.; TONGPRASIT, W.; SAMANTA, M.; WEISSMAN, S.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. **Science**, Washington, DC, v. 306, p. 2242-2246, 2004.

BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA Biology**, Georgetown, v. 10, p. 185-191, 2004.

BORTOLIN-CAVILLE, M. L.; DANCE, M.; WEBER, M.; CAVAILLE, J. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 3464-3473, 2009.

BRENNECKE, J.; ARAVIN, A. A.; STARK, A.; DUS, M.; KELLIS, M.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. **Cell**, Cambridge, v. 128, p. 1089-1103, 2007.

BROCKDORFF, N.; ASHWORTH, A.; KAY, G. F.; COOPER, P.; SMITH, S.; MCCABE, V. M.; NORRIS, D. P.; PENNY, G. D.; PATEL, D.; RASTAN, S.

Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. **Nature**, London, v. 351, p. 329-331, 1991.

BROSNAN, C. A.; VOINNET, O. The long and the short of noncoding RNAs. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 21, p. 416-425, 2009.

BROWN, C. J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J. L.; LAFRENIERE, R. G.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H. F. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, London, v. 349, p. 38-44, 1991.

CALABRESE, J. M.; SEILA, A. C.; YEO, G. W.; SHARP, P. A. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 104, p. 18097-18102, 2007.

CARMELL, M. A.; GIRARD, A.; VAN DE KANT, H. J.; BOURC'HIS, D.; BESTOR, T. H.; DE ROOIJ D. G.; HANNON; G. J. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. **Developmental Cell**, New York, v. 12, p. 503-514, 2007.

CARMELL, M. A.; XUAN, Z.; ZHANG, M. Q.; HANNON, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & Development**, New York, v. 16, p. 2733-2742, 2002.

CARNINCI, P.; WELLS, C.; NISHIKAWA, S.; NORI, F.; OHARA, O.; OKAZAKI, Y.; ORLANDO, V.; PANG, K. C. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science**, Washington, DC, v. 309, p. 1559-1563, 2005.

CASTEL, S. E.; MARTIENSSEN, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 14, p. 100-112, 2013.

CASTRO, F. O.; SHARBATI, S.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L. L.; COX, J. F.; HULTSCHIG, C.; EINSPANIER, R. MicroRNA expression profiling of elongated cloned and in vitro-fertilized bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 73, p. 71-85, 2010.

CHAKRABARTY, A.; TRANGUCH, S.; DAIKOKU, T.; JENSEN, K.; FURNEAUX, H.; DEY, S. K. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 104, p. 15144-15149, 2007.

CHENDRIMADA, T. P.; GREGORY, R. I.; KUMARASWAMY, E.; NORMAN, J.; COOCH, N.; NISHIKURA, K.; SHIEKHATTAR, R. TRBP recruits the Dicer

complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, London, v. 436, p. 740-744, 2005.

CHENG, J.; KAPRANOV, P.; DRENKOW, J.; DIKE, S.; BRUBAKER, S.; PATEL, S.; LONG, J.; STERN, D.; TAMMANA, H.; HELT, G.; SEMENTCKENKO, V.; PICCOLBONI, A.; BEKIRANOV, S.; BAILEY, D. K.; GANESH, M.; GHOSH, S.; BELL, I.; GERHARD, D. S.; GINGERAS, T. R. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. **Science**, Washington, DC, v. 308, p. 1149-1154, 2005.

CHUNG, W. J.; OKAMURA, K.; MARTIN, R.; LAI, E. C. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against Drosophila transposons. **Current Biology**, London, v. 18, p. 795-802, 2008.

CLARK, M. B.; MATTICK, J. S. Long noncoding RNAs in cell biology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 22, p. 366-376, 2011.

COOK, A.; CONTI, E. Dicer measures up. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 13, p. 190-192, 2006.

COOK, M. S.; BLELLOCH, R. Small RNAs in germline development. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 102, p. 159-205, 2013.

CZECH, B.; MALONE, C. D.; ZHOU, R.; STARK, A.; SCHLINGEHEYDE, C.; DUS, M.; PERRIMON, N.; KELLIS, M.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J.; BRENNECKE, J. An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. **Nature**, London, v. 453, p. 798-802, 2008.

DENG, W.; LIN, H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 2, p. 819-830, 2002.

DENLI, A. M.; TOPS, B. B.; PLASTERK, R. H.; KETTING, R. F.; HANNON, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, London, v. 432, p. 231-235, 2004.

DONKER, R. B.; MOUILLET, J. F.; CHU, T.; HUBEL, C. A.; STOLZ, D. B.; MORELLI, A. E.; SADOVSKY, Y. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 18, p. 417-424, 2012.

ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**, Washington, DC, v. 447, p. 799-816, 2007.

FURUNO, M.; PANG, K. C.; NINOMIYA, N.; FUKUDA, S.; FRITH, M. C.; BULT, C.; KAI, C.; KAWAI, J.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; MATTICK, J. S.;

SUZUKI, H. Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, p. e37, 2006.

GHILDYAL, M.; SEITZ, H.; HORWICH, M. D.; LI, C.; DU, T.; LEE, S.; XU, J.; KITTLER, E. L.; ZAPP, M. L.; WENG, Z.; ZAMORE, P. D. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. **Science**, Washington, DC, v. 320, p. 1077-1081, 2008.

GONG, C.; MAQUAT, L. E. IncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. **Nature**, London, v. 470, p. 284-288, 2011.

GONZALEZ, G.; BEHRINGER, R. R. Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 76, p. 678-688, 2009.

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, Cambridge, v. 123, p. 631-640, 2005.

GREGORY, R. I.; YAN, K. P.; AMUTHAN, G.; CHENDRIMADA, T.; DORATOTAJ, B.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, London, v. 432, p. 235-240, 2004.

GUNAWARDANE, L. S.; SAITO, K.; NISHIDA, K. M.; MIYOSHI, K.; KAWAMURA, Y.; NAGAMI, T.; SIOMI, H.; SIOMI, M. C. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5'-end formation in *Drosophila*. **Science**, Washington, DC, v. 315, p. 1587-1590, 2007.

GUTTMAN, M.; AMIT, I.; GARBER, M.; FRENCH, C.; LIN, M. F.; FELDSER, D.; HUARTE, M.; ZUK, O.; CAREY, B. W.; CASSADY, J. P.; CABILI, M. N.; JAENISCH, R.; MIKKELSEN, T. S.; JACKS, T.; HACOEN, N.; BERNSTEIN, B. E.; KELLIS, M.; REGEV, A.; RINN, J. L.; LANDER, E. S. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, London, v. 458, p. 223-227, 2009.

HAASE, A. D.; JASKIEWICZ, L.; ZHANG, H.; LAINE, S.; SACK, R.; GATIGNOL, A.; FILIPOWICZ, W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. **EMBO Reports**, Oxford, v. 6, p. 961-967, 2005.

HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, London, v. 404, p. 293-296, 2000.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; KIM, Y. K.; JIN, H.; KIM, V. N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & Development**, New York, v. 18, p. 3016-3027, 2004.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; NAM, J. W.; HEO, I.; RHEE, J. K.; SOHN, S. Y.; CHO, Y.; ZHANG, B. T.; KIM, V. N. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, Cambridge, v. 125, p. 887-901, 2006.

HAYASHI, K.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; KANEDA, M.; TANG, F.; HAJKOVA, P.; LAO, K.; O'CARROLL, D.; DAS, P. P.; TARAKHOVSKY, A.; MISKA, E. A.; SURANI, M. A. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, p. e1738, 2008.

HE, H.; WANG, J.; LIU, T.; LIU, X. S.; LI, T.; WANG, Y.; QIAN, Z.; ZHENG, H.; ZHU, X.; WU, T.; SHI, B.; DENG, W.; ZHOU, W.; SKOGERBØ, G.; CHEN, R. Mapping the *C. elegans* noncoding transcriptome with a whole-genome tiling microarray. **Genome Research**, New York, v. 17, p. 1471-1477, 2007.

HE, Y.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V.E.; PAPADOPOULOS, N.; KINZLER, K.W. The antisense transcriptomes of human cells. **Science**, Washington, DC, v. 322, p. 1855-1857, 2008.

KAMPA, D.; CHENG, J.; KAPRANOV, P.; YAMANAKA, M.; BRUBAKER, S.; CAWLEY, S.; DRENKOW, J.; PICCOLBONI, A.; BEKIRANOV, S.; HELT, G.; TAMMANA, H.; GINGERAS, T. R. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. **Genome Research**, New York, v. 14, p. 331-342, 2004.

KANEDA, M.; TANG, F.; O'CARROLL, D.; LAO, K.; SURANI, M. A. Essential role for Argonaute2 protein in mouse oogenesis. **Epigenetics Chromatin**, London, v. 2, p. 9, 2009.

KAPRANOV, P.; CAWLEY, S. E.; DRENKOW, J.; BEKIRANOV, S.; STRAUSBERG, R. L.; FODOR, S. P.; GINGERAS, T. R. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. **Science**, Washington, DC, v. 296, p. 916-919, 2002.

KATAYAMA, S.; TOMARU, Y.; KASUKAWA, T.; WAKI, K.; NAKANISHI, M.; NAKAMURA, M.; NISHIDA, H.; YAP, C. C.; SUZUKI, M.; KAWAI, J.; SUZUKI, H.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; WELLS, C.; FRITH, M.; RAVASI, T.; PANG, K. C.; HALLINAN, J.; MATTICK, J.; HUME, D. A.; LIPOVICH, L.; BATALOV, S.; ENGSTRÖM, P. G.; MIZUNO, Y.; FAGHIHI, M. A.; SANDELIN, A.; CHALK, A. M.; MOTTAGUI-TABAR, S.; LIANG, Z.; LENHARD, B.; WAHLESTEDT, C. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. **Science**, Washington, DC, v. 309, p. 1564-1566, 2005.

KAWAMURA, Y.; SAITO, K.; KIN, T.; ONO, Y.; ASAI, K.; SUNOHARA, T.; OKADA, T. N.; SIOMI, M. C.; SIOMI, H. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. **Nature**, London, v. 453, p. 793-797, 2008.

KHALIL, A. M.; GUTTMAN, M.; HUARTE, M.; GARBER, M.; RAJ, A.; RIVEA MORALES, D.; THOMAS, K.; PRESSER, A.; BERNSTEIN, B. E.; VAN OUDENAARDEN, A.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; RINN, J. L. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, New York, v. 106, p. 11667-11672, 2009.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 10, p. 126-139, 2009.

KIM, Y. K.; KIM, V. N. Processing of intronic microRNAs. **EMBO Journal**, Oxford, v. 26, p. 775-783, 2007.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39D, p. 152-157, 2011.

KUNG, J. T.; COLOGNORI, D.; LEE, J. T. Long noncoding RNAs: past, present, and future. **Genetics**, Austin v. 193, p. 651-669, 2013.

KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; KIMURA, T.; IJIRI, T. W.; ISOBE, T.; ASADA, N.; FUJITA, Y.; IKAWA, M.; IWAI, N.; OKABE, M.; DENG, W.; LIN, H.; MATSUDA, Y.; NAKANO, T. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 839-849, 2004.

KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; WATANABE, T.; GOTOH, K.; TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; IKAWA, M.; ASADA, N.; KOJIMA, K.; YAMAGUCHI, Y.; IJIRI, T. W.; HATA, K.; LI, E.; MATSUDA, Y.; KIMURA, T.; OKABE, M.; SAKAKI, Y.; SASAKI, H.; NAKANO, T. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. **Genes & Development**, New York, v. 22, p. 908-917, 2008.

LANDTHALER, M.; YALCIN, A.; TUSCHL, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. **Current Biology**, London, v. 14, p. 2162-2167, 2004.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, Cambridge, v. 75, p. 843-854, 1993.

LEI, L.; JIN, S.; GONZALEZ, G.; BEHRINGER, R. R.; WOODRUFF, T. K. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. **Molecular Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 315, p. 63, 2010.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 6, p. 108-118, 2005.

- LIANG, Y.; RIDZON, D.; WONG, L.; CHEN, C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 166, 2007.
- LIN, H. PiRNAs in the germ line. **Science**, Washington, DC, v. 316, p. 397, 2007.
- LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G.; THOMSON, J. M.; SONG, J. J.; HAMMOND, S. M.; JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, Washington, DC, v. 305, p. 1437-1441, 2004.
- LOEWER, S.; CABILI, M. N.; GUTTMAN, M.; LOH, Y. H.; THOMAS, K.; PARK, I. H.; GARBER, M.; CURRAN, M.; ONDER, T.; AGARWAL, S.; MANOS, P. D.; DATTA, S.; LANDER, E. S.; SCHLAEGER, T. M.; DALEY, G. Q.; RINN, J. L. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. **Nature Genetics**, New York, v. 42, p. 1113-1117, 2010.
- LUENSE, L. J.; CARLETTI, M. Z.; CHRISTENSON, L. K. Role of Dicer in female fertility. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 20, p. 265-272, 2009.
- LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, Washington, DC, v. 303, p. 95-98, 2004.
- LYKKE-ANDERSEN, K.; GILCHRIST, M. J.; GRABAREK, J. B.; DAS, P.; MISKA, E.; ZERNICKA-GOETZ, M. Maternal Argonaute 2 is essential for early mouse development at the maternal-zygotic transition. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 19, p. 4383-4392, 2008.
- LYLE R.; WATANABE, D.; TE VRUCHTE, D.; LERCHNER, W.; SMRZKA, O. W.; WUTZ, A.; SCHAGEMAN, J.; HAHNER, L.; DAVIES, C.; BARLOW, D. P. The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. **Nature Genetics**, New York, v. 25, p. 19-21, 2000.
- MA, J.; FLEMR, M.; STEIN, P.; BERNINGER, P.; MALIK, R.; ZAVOLAN, M.; SVOBODA, P.; SCHULTZ, R. M. MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. **Current Biology**, London, v. 20, p. 265-270, 2010.
- MAATOUK, D. M.; LOVELAND, K. L.; MCMANUS, M. T.; MOORE, K.; HARFE, B. D. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 79, p. 696-703, 2008.
- MARQUES, A. C.; PONTING, C. P. Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness. **Genome Biology**, London, v. 10, p. R124, 2009.



- MATTICK, J. S. The functional genomics of noncoding RNA. **Science**, Washington, DC, v. 309, p. 1527-1528, 2005.
- MATTICK, J. S.; AMARAL, P. P.; DINGER, M. E.; MERCER, T. R.; MEHLER, M. F. RNA regulation of epigenetic processes. **Bioessays**, Cambridge, v. 31, p. 51-59, 2009.
- MAYOR-LYNN, K.; TOLOUBEYDOKHTI, T.; CRUZ, A. C.; CHEGINI, N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. **Reproductive Sciences**, [S.l.], v. 18, p. 46-56, 2011. Disponível em: <<http://rsx.sagepub.com/content/by/year>>. Acesso em: 5 abr. 2013.
- MEISTER, G.; LANDTHALER, M.; PATKANIOWSKA, A.; DORSETT, Y.; TENG, G.; TUSCHL, T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 15, p. 185-197, 2004.
- MERCER, T. R.; QURESHI, I. A.; GOKHAN, S.; DINGER, M. E.; LI, G.; MATTICK, J. S.; MEHLER, M. F. Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. **BMC Neuroscience**, London, v. 11, p. 14, 2010.
- MINENO, J.; OKAMOTO, S.; ANDO, T.; SATO, M.; CHONO, H.; IZU, H.; TAKAYAMA, M.; ASADA, K.; MIROCHNITCHENKO, O.; INOUE, M.; KATO, I. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, p. 1765-1771, 2006.
- MIURA, K.; MIURA, S.; YAMASAKI, K.; HIGASHIJIMA, A.; KINOSHITA, A.; YOSHIURA, K.; MASUZAKI, H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 56, p. 1767-1771, 2010.
- MOHAMMAD, F.; MONDAL, T.; GUSEVA, N.; PANDEY, G. K.; KANDURI, C. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. **Development**, Cambridge, v. 137, p. 2493-2499, 2010.
- MORALES-PRIETO, D. M.; CHAIWANGYEN, W.; OSPINA-PRIETO, S.; SCHNEIDER, U.; HERRMANN, J.; GRUHN, B.; MARKERT, U. R. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. **Placenta**, London, v. 33, p. 725-734, 2012.
- MORALES-PRIETO, D. M.; MARKERT, U. R. MicroRNAs in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 88, p. 106-111, 2011.
- MORITA, S.; HORII, T.; KIMURA, M.; GOTO, Y.; OCHIYA, T.; HATADA, I. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. **Genomics**, San Diego, v. 89, p. 687-696, 2007.

MORLANDO, M.; BALLARINO, M.; GROMAK, N.; PAGANO, F.; BOZZONI, I.; PROUDFOOT, N. J. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 15, p. 902-909, 2008.

MORRIS, K. V. Non-coding RNAs, epigenetic memory and the passage of information to progeny. **RNA Biology**, Georgetown, v. 6, p. 242-247, 2009.

MURCHISON, E. P.; STEIN, P.; XUAN, Z.; PAN, H.; ZHANG, M. Q.; SCHULTZ, R. M.; HANNON, G. J. Critical roles for Dicer in the female germline. **Genes & Development**, New York, v. 21, p. 682-693, 2007.

OKAMURA, K.; BALLA, S.; MARTIN, R.; LIU, N.; LAI, E. C. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 15, p. 581-590, 2008a.

OKAMURA, K.; CHUNG, W. J.; RUBY, J. G.; GUO, H.; BARTEL, D. P.; LAI, E. C. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. **Nature**, London, v. 453, p. 803-806, 2008b.

OKAZAKI, Y.; KASUKAWA, T.; ADACHI, J.; BONO, H.; KONDO, S.; NIKAIDO, I.; OSATO, N.; SAITO, R.; SUZUKI, H.; YAMANAKA, I.; KIYOSAWA, H.; YAGI, K.; TOMARU, Y.; HASEGAWA, Y.; NOGAMI, A.; SCHÖNBACH, C.; GOJOBORI, T.; BALDARELLI, R.; HILL, D. P.; BULT, C.; HUME, D. A.; QUACKENBUSH, J.; SCHRIML, L. M.; KANAPIN, A.; MATSUDA, H.; BATALOV, S.; BEISEL, K. W.; BLAKE, J. A.; BRADT, D.; BRUSIC, V.; CHOTHIA, C.; CORBANI, L. E.; COUSINS, S.; DALLA, E.; DRAGANI, T. A.; FLETCHER, C. F.; FORREST, A.; FRAZER, K. S.; GAASTERLAND, T.; GARIBOLDI, M.; GISSI, C.; GODZIK, A.; GOUGH, J.; GRIMMOND, S.; GUSTINCICH, S.; HIROKAWA, N.; JACKSON, I. J.; JARVIS, E. D.; KANAI, A.; KAWAJI, H.; KAWASAWA, Y.; KEDZIERSKI, R. M.; KING, B. L.; KONAGAYA, A.; KUROCHKIN, I. V.; LEE, Y.; LENHARD, B.; LYONS, P. A.; MAGLOTT, D. R.; MALTAIS, L.; MARCHIONNI, L.; MCKENZIE, L.; MIKI, H.; NAGASHIMA, T.; NUMATA, K.; OKIDO, T.; PAVAN, W. J.; PERTEA, G.; PESOLE, G.; PETROVSKY, N.; PILLAI, R.; PONTIUS, J. U.; QI, D.; RAMACHANDRAN, S.; RAVASI, T.; REED, J. C.; REED, D. J.; REID, J.; RING, B. Z.; RINGWALD, M.; SANDELIN, A.; SCHNEIDER, C.; SEMPLE, C. A.; SETOU, M.; SHIMADA, K.; SULTANA, R.; TAKENAKA, Y.; TAYLOR, M. S.; TEASDALE, R. D.; TOMITA, M.; VERARDO, R.; WAGNER, L.; WAHLESTEDT, C.; WANG, Y.; WATANABE, Y.; WELLS, C.; WILMING, L. G.; WYNSHAW-BORIS, A.; YANAGISAWA, M.; YANG, I.; YANG, L.; YUAN, Z.; ZAVOLAN, M.; ZHU, Y.; ZIMMER, A.; CARNINCI, P.; HAYATSU, N.; HIROZANE-KISHIKAWA, T.; KONNO, H.; NAKAMURA, M.; SAKAZUME, N.; SATO, K.; SHIRAKI, T.; WAKI, K.; KAWAI, J.; AIZAWA, K.; ARAKAWA, T.; FUKUDA, S.; HARA, A.; HASHIZUME, W.; IMOTANI, K.; ISHII, Y.; ITOH, M.; KAGAWA, I.; MIYAZAKI, A.; SAKAI, K.; SASAKI, D.; SHIBATA, K.; SHINAGAWA, A.; YASUNISHI, A.;

YOSHINO, M.; WATERSTON, R.; LANDER, E. S.; ROGERS, J.; BIRNEY, E.; HAYASHIZAKI, Y. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. **Nature**, London, v. 420, p. 563-573, 2002.

ØROM, U. A.; DERRIEN, T.; BERINGER, M.; GUMIREDDY, K.; GARDINI, A.; BUSSOTTI, G.; LAI, F.; ZYTNIICKI, M.; NOTREDAME, C.; HUANG, Q.; GUIGO, R.; SHIEKHATTAR, R. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. **Cell**, Cambridge, v. 143, p. 46-58, 2010.

PAN, Q.; CHEGINI, N. MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 26, p. 479-493, 2008.

PANDEY, R. R.; MONDAL, T.; MOHAMMAD, F.; ENROTH, S.; REDRUP, L.; KOMOROWSKI, J.; NAGANO, T.; MANCINI-DINARDO, D.; KANDURI, C. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 32, p. 232-246, 2008.

PAPAIIOANNOU, M. D.; LAGARRIGUE, M.; VEJNAR, C. E.; ROLLAND, A. D.; KÜHNE, F.; AUBRY, F.; SCHAAD, O.; FORT, A.; DESCOMBES, P.; NEERMAN-ARBEZ, M.; GUILLOU, F.; ZDOBNOV, E. M.; PINEAU, C.; NEF, S. Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 10, 2011.

PAPAIIOANNOU, M. D.; PITETTI, J. L.; RO, S.; PARK, C.; AUBRY, F.; SCHAAD, O.; VEJNAR, C. E.; KÜHNE, F.; DESCOMBES, P.; ZDOBNOV, E. M.; MCMANUS, M. T.; GUILLOU, F.; HARFE, B. D.; YAN, W.; JÉGOU, B.; NEF, S. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. **Developmental Biology**, San Diego, v. 326, 250-259, 2009.

RAND, T. A.; GINALSKI, K.; GRISHIN, N. V.; WANG, X. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 101, p. 14385-14389, 2004.

RAVASI, T.; SUZUKI, H.; PANG, K. C.; KATAYAMA, S.; FURUNO, M.; OKUNISHI, R.; FUKUDA, S.; RU, K.; FRITH, M. C.; GONGORA, M. M.; GRIMMOND, S. M.; HUME, D. A.; HAYASHIZAKI, Y.; MATTICK, J. S. Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. **Genome Research**, New York, v. 16, p. 11-19, 2006.

RINN, J. L.; EUSKIRCHEN, G.; BERTONE, P.; MARTONE, R.; LUSCOMBE, N. M.; HARTMAN, S.; HARRISON, P. M.; NELSON, F. K.; MILLER, P.; GERSTEIN, M.; WEISSMAN, S.; SNYDER, M. The transcriptional activity of

human Chromosome 22. **Genes & Development**, New York v. 17, p. 529-540, 2003.

SCHOENFELDER, S.; SMITS, G.; FRASER, P.; REIK, W.; PARO, R. Non-coding transcripts in the H19 imprinting control region mediate gene silencing in transgenic *Drosophila*. **EMBO Reports**, Oxford, v. 8, p. 1068-1073, 2007.

SEITZ, H.; ROYO, H.; BORTOLIN, M. L.; LIN, S. P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; CAVAILLE, J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. **Genome Research**, New York, v. 14, p. 1741-1748, 2004.

SINGH, S. K.; PAL BHADRA, M.; GIRSCHICK, H. J.; BHADRA, U. MicroRNAs - micro in size but macro in function. **FEBS Journal**, New York, v. 275, p. 4929-4944, 2008.

SINKKONEN, L.; HUGENSCHMIDT, T.; BERNINGER, P.; GAIDATZIS, D.; MOHN, F.; ARTUS-REVEL, C. G.; ZAVOLAN, M.; SVOBODA, P.; FILIPOWICZ, W. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 15, p. 259-67, 2008.

SLEUTELS, F.; ZWART, R.; BARLOW, D. P. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. **Nature**, London, v. 415, p. 810-813, 2002.

SONG, R.; HENNIG, G. W.; WU, Q.; JOSE, C.; ZHENG, H.; YAN, W. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 108, p. 13159-13164, 2011.

STOLC, V.; GAUHAR, Z.; MASON, C.; HALASZ, G.; VAN BATENBURG, M. F.; RIFKIN, S. A.; HUA, S.; HERREMAN, T.; TONGPRASIT, W.; BARBANO, P. E.; BUSSEMAKER, H. J.; WHITE, K. P. A gene expression map for the euchromatic genome of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Washington, DC, v. 306, p. 655-660, 2004

SUH, N.; BAEHNER, L.; MOLTZAHN, F.; MELTON, C.; SHENOY, A.; CHEN, J.; BLELLOCH, R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. **Current Biology**, London, v. 20, p. 271-277, 2010.

SUH, N.; BLELLOCH, R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. **Development**, Cambridge, v. 138, p. 1653-1661, 2011.

TAM, O. H.; ARAVIN, A. A.; STEIN, P.; A. GIRARD, A.; MURCHISON, E. P.; CHELOUFI, S.; HODGES, E.; ANGER, M.; SACHIDANANDAM, R.; SCHULTZ, R. M.; HANNON, G. J. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. **Nature**, London, v. 453, p. 534-538, 2008.

- TANG, F.; KANEDA, M.; O'CARROLL, D.; HAJKOVA, P.; BARTON, S. C.; SUN, Y. A.; LEE, C.; TARAKHOVSKY, A.; LAO, K.; SURANI, M. A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes & Development**, New York, v. 21, p. 644-648, 2007.
- TAY, Y.; ZHANG, J.; THOMSON, A. M.; LIM, B.; RIGOUTSOS, I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, London, v. 455, p. 1124-1128, 2008.
- TERRANOVA, R.; YOKOBAYASHI, S.; STADLER, M. B.; OTTE, A. P.; VAN LOHUIZEN, M.; ORKIN, S. H.; PETERS, A. H. Polycomb group proteins Ezh2 and Rnf2 direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 15, p. 1-12, 2008.
- THAKUR, N.; TIWARI, V. K.; THOMASSIN, H.; PANDEY, R. R.; KANDURI, M.; GÖNDÖR, A.; GRANGE, T.; OHLSSON, R.; KANDURI, C. An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 24, p. 7855-7862, 2004.
- TRIPATHI, V.; ELLIS, J. D.; SHEN, Z.; SONG, D. Y.; PAN, Q.; WATT, A. T.; FREIER, S. M.; BENNETT, C. F.; SHARMA, A.; BUBULYA, P. A.; BLENCOWE, B. J.; PRASANTH, S. G.; PRASANTH, K. V. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 39, p. 925-938, 2010.
- TSIRIGOS, A.; RIGOUTSOS, I. Human and mouse introns are linked to the same processes and functions through each genome's most frequent non-conserved motifs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 3484-3493, 2008.
- VAGIN, V. V.; SIGOVA, A.; LI, C.; SEITZ, H.; GVOZDEV, V.; ZAMORE, P. D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. **Science**, Washington, DC, v. 313, p. 320-324, 2006.
- WATANABE, H.; WATANABE, H.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; TAYLOR, T. D.; TOYODA, A.; KUROKI, Y.; NOGUCHI, H.; BENKAHLA, A.; LEHRACH, H.; SUDBRACK, R.; KUBE, M.; TAENZER, S.; GALGOCZY, P.; PLATZER, M.; SCHARFE, M.; NORDSIEK, G.; BLÖCKER, H.; HELLMANN, I.; KHAITOVICH, P.; PÄÄBO, S.; REINHARDT, R.; ZHENG, H. J.; ZHANG, X. L.; ZHU, G. F.; WANG, B. F.; FU, G.; REN, S. X.; ZHAO, G. P.; CHEN, Z.; LEE, Y. S.; CHEONG, J. E.; CHOI, S. H.; WU, K. M.; LIU, T. T.; HSIAO, K. J.; TSAI, S. F.; KIM, C. G.; OOTA, S.; KITANO, T.; KOHARA, Y.; SAITOU, N.; PARK, H. S.; WANG, S. Y.; YASPO, M. L.; SAKAKI, Y. DNA sequence and comparative analysis of chimpanzee chromosome 22. **Nature**, London, v. 429, p. 382-388, 2004.
- WATANABE, T.; TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; KANEDA, M.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; OBATA, Y.; CHIBA, H.; KOHARA, Y.; KONO, T.; NAKANO, T.;

SURANI, M. A.; SAKAKI, Y.; SASAKI, H. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. **Nature**, London, v. 453, p. 539-543, 2008.

WILHELM, B. T.; MARGUERAT, S.; WATT, S.; SCHUBERT, F.; WOOD, V.; GOODHEAD, I.; PENKETT, C. J.; ROGERS, J.; BÄHLER, J. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, London, v. 453, p. 1239-1243, 2008.

WRIGHT, M. W.; BRUFORD, E. A. Naming 'junk': Human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. **Human Genomics**, London, v. 5, p. 90-98, 2011.

WU, Q.; SONG, R.; ORTOGERO, N.; ZHENG, H.; EVANOFF, R.; SMALL, C. L.; GRISWOLD, M. D.; NAMEKAWA, S. H.; ROYO, H.; TURNER, J. M.; YAN, W. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 287, p. 25173-25190, 2012.

XU, N.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; PAN, G.; THOMSON, J. A.; KOSIK, K. S. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 137, p. 647-658, 2009.

YANG, Y.; BAI, W.; ZHANG, L.; YIN, G.; WANG, X.; WANG, J.; ZHAO, H.; HAN, Y.; YAO, Y. Q. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. **Developmental Dynamics**, New York, v. 237, p. 2315-2327, 2008.

YI, R.; DOEHLE, B. P.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. **RNA Biology**, Georgetown, v. 11, p. 220-226, 2005.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, New York, v. 17, p. 3011-3016, 2003.

YOON, J. H.; ABDELMOHSEN, K.; SRIKANTAN, S.; YANG, X.; MARTINDALE, J. L.; DE, S.; HUARTE, M.; ZHAN, M.; BECKER, K. G.; GOROSPE, M. LincRNA p21 suppresses target mRNA translation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 47, p. 648-655, 2012.



Capítulo 6

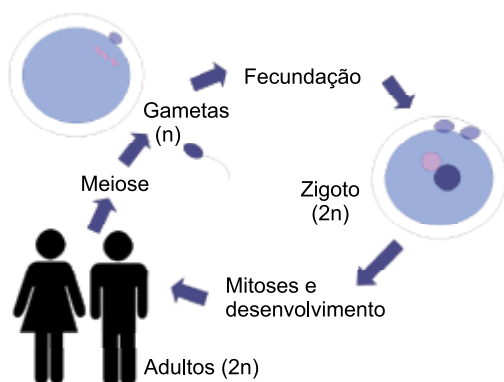
# **Impressão genômica**

*Simone Cristina Méo Niciura  
Felipe Percin*



## Introdução

O embrião mamífero diploide ( $2n$ ) é formado pela fusão dos gametas ( $1n$ ) masculino (espermatozoide) e feminino (oócito) (Figura 1). Uma vez que cada um dos genitores fornece a seus descendentes um gameta, ou seja, um conjunto haploide de cromossomos, parece óbvio supor que a contribuição genética transmitida aos filhos por ambos os pais deveria ser idêntica (WATSON et al., 1992). Entretanto, isso não é observado em alguns genes.

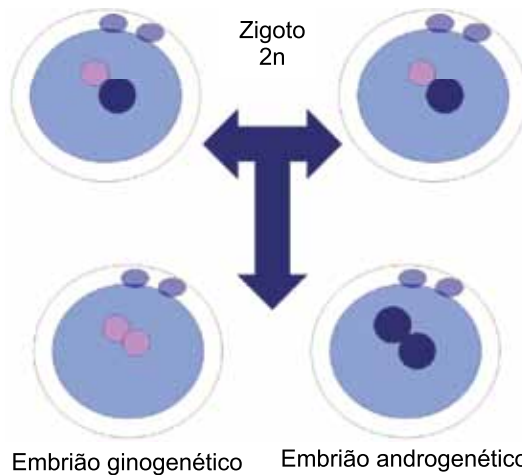


**Figura 1.** Indivíduos adultos diploides ( $2n$ ) produzem gametas haploides ( $n$ ): oócito na fêmea e espermatozoide no macho, que se unem, reconstituem o conteúdo cromossômico  $2n$  e formam o zigoto, que, por mitose, desenvolve-se num novo indivíduo.

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

Os primeiros indícios de contribuição assimétrica dos genomas parentais para o desenvolvimento embrionário foram obtidos durante a década de 1980. A partir de experimentos de transferência pronuclear (Figura 2) e partenogênese, observou-se que embriões murinos mono-parentais, formados exclusivamente por genoma de origem materna (ginogenéticos ou partenogenéticos) ou paterna (androgenéticos), eram incapazes de sustentar o desenvolvimento e morriam logo após a implantação (MCGRATH; SOLTER, 1984; SOLTER, 1988).

Na mesma época, experimentos com camundongos portadores de translocações cromossômicas revelaram que segmentos cromossômicos específicos, mas não o genoma por inteiro, tinham função diferencial, dependendo da origem parental (CATTANACH; KIRK, 1985). Em conjunto, esses resultados demonstraram que os genomas paterno e materno são funcionalmente não equivalentes e que a embriogênese completa é dependente de um zigoto formado por ambos os genomas parentais.



**Figura 2.** Transferência de pronúcleos entre dois zigotos (2n) para se obter embriões ginogenéticos (formados a partir de dois pronúcleos femininos (rosa)) e androgenéticos (dois pronúcleos masculinos (roxo)).

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

Posteriormente, estudos em camundongos transgênicos demonstraram a ocorrência de distúrbio de desenvolvimento quando alelos paternos ou maternos de um mesmo gene foram isoladamente inativados. Quando o alelo paterno do gene do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (*IGF2*) foi inativado por mutação, foram observadas alterações no desenvolvimento; ao contrário disso, animais portadores da inativação do alelo materno desenvolveram-se normalmente. Disso, concluiu-se que, enquanto o gene *IGF2* de origem

paterna é transcrito, o de origem materna permanece silencioso (ALBERTS et al., 1994).

Essas evidências despertaram a curiosidade de diversos pesquisadores que buscaram entender a maneira pela qual a expressão de alguns genes é controlada por sua origem (materna ou paterna) e os mecanismos e as implicações desse evento, o que levou à descoberta de vários genes com expressão dependente da origem parental. O “silêncio” de um gene dependente de sua origem foi denominado de *genomic imprinting* (impressão genômica) (KENDREW, 1994).

## Definição

O evento no qual a expressão de um gene depende de sua origem parental (materna ou paterna) é denominado de *genomic imprinting* (ALBERTS et al., 1994; JAENISCH, 1997; WATSON et al., 1992). Em outras palavras, o *genomic imprinting* é o evento epigenético que determina a expressão monoalélica de um gene. Enquanto a maioria dos genes autossômicos é expressa por ambos os cromossomos parentais, a expressão gênica *imprinted* é restrita a um dos alelos parentais. Assim, a atividade de um gene *imprinted* em cada indivíduo depende do sexo do progenitor do qual o alelo foi herdado (WATSON et al., 1992), de modo que alguns genes são expressos apenas pelo alelo herdado da mãe e outros só pelo alelo herdado do pai (KENDREW, 1994).

O *imprinting* surgiu em mamíferos há aproximadamente 180 a 210 milhões de anos, próximo do momento em que os humanos compartilhavam um ancestral comum com os marsupiais e os monotrematas (HORE et al., 2007). Assim, o *imprinting* ocorre em genes autossômicos de mamíferos eutérios (que possuem placenta verdadeira) e leva a desvios da herança mendeliana (RUVINSKY, 1999). Em marsupiais (metatérios), o número de genes *imprinted* descritos (seis genes até o momento) é bem menor que em mamíferos eutérios, enquanto ainda não foram relatados *imprints* em monotrematas (prototérios) e em aves (DAS et al., 2012). Fenômeno epigenético semelhante ao *genomic imprinting* já foi descrito em plantas angiospérmicas e em insetos (LIZE et al., 2007; SPIELMAN et al., 2001; TODER et al., 1996).

Os genes *imprinted* possuem algumas características em comum:

- São dispostos em grupos ou *clusters* (o que indica que podem sofrer interação).
- Apresentam assincronia na replicação do DNA, sequências repetitivas e poucos e pequenos íntrons.

Poucos são os genes *imprinted* isolados no genoma, a maioria (80%) deles localiza-se em *clusters* de até 4 megabases (Mb) de tamanho (BARLOW, 2011). Esses *clusters* – que se estendem por centenas a milhares de quilobases no genoma – englobam genes *imprinted* paternos ou maternos codificadores de proteínas, pelo menos um RNA não codificador e, em alguns casos, outros genes não *imprinted* (ARNAUD, 2010; STROGANTSEV; FERGUSON-SMITH, 2012).

Em bovinos, em comparação aos genes de expressão bialélica, os genes *imprinted* possuem (KHATIB et al., 2007):

- Maior conteúdo G + C.
- Maior número de ilhas CpG e de repetições em sequência, com menor número de *short interspersed nuclear elements* (SINEs) (KHATIB et al., 2007).

A maioria dos genes *imprinted* codifica proteínas, mas alguns genes produzem um RNA não codificador, como o *H19* (RUVINSKY, 1999; SASAKI et al., 1995; YOUNG; FAIRBURN, 2000). O *imprinting* dos genes é específico em tecidos e estádios do desenvolvimento e nem todos os genes *imprinted* numa espécie o são em outra, o que indica aquisição evolutiva (RUVINSKY, 1999). Assim, de 63 genes *imprinted* de humanos e camundongos, só 26 são conservados em ambas as espécies (ZAITOUN; KHATIB, 2008), enquanto de 22 genes *imprinted* em humanos ou em camundongos, apenas 14 são *imprinted* em bovinos (KHATIB et al., 2007).

## Hipóteses que explicam a ocorrência de *imprinting*

Há várias hipóteses que tentam explicar a ocorrência de *imprinting* e suas consequências. Uma teoria baseia-se na ideia do

conflito genético entre os genes maternos e os paternos durante a gestação, também conhecida como “batalha dos sexos”. Uma vez que os fetos de mamíferos são nutridos diretamente a partir dos tecidos maternos, seria vantajoso, para os alelos de origem paterna, promover maior crescimento do feto, de modo a aumentar suas chances de espalhar descendentes pela população, enquanto os alelos maternos deveriam evitar a sobrecarga da mãe e favorecer a manutenção de fetos pequenos para assegurar o sucesso do parto e das futuras gestações. Assim, o *imprinting* seria um compromisso entre mãe e feto, e entre genes maternos e paternos (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999).

Essa teoria prediz o comportamento dos genes *IGF2* e do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (*IGF2R*) com muita acurácia: a maior expressão do gene que codifica a proteína IGF-II (gene *IGF2*) pode aumentar o tamanho do feto e, por isso, está sob controle paterno, enquanto o gene que codifica o receptor (*IGF2R*), que se liga ao IGF-II e diminui sua disponibilidade está sob controle materno (KENDREW, 1994).

A teoria da “batalha dos sexos” também explica a ocorrência de doenças psiquiátricas, pois quando há pequenos desvios em expressão materna, os bebês tendem a ser menores, mais calmos e menos exigentes, enquanto os desvios em expressão paterna resultam em bebês mais exigentes (BADCOCK; CRESPI, 2008). Entretanto, essa teoria não explica a ocorrência de *imprinting* em diversos outros genes.

A teoria da coadaptação entre mãe e filho permitiria explicar a ocorrência de *imprinting* em genes relacionados à lactação, principalmente em tecido mamário. Uma vez que a glândula mamária é o único órgão mamífero que regula a transferência de nutrientes entre mãe e filho após o nascimento e para o qual há controle do sistema nervoso central, com a liberação de hormônios sob o estímulo da sucção, o *imprinting* desses genes poderia regular o desenvolvimento pós-natal dos mamíferos (STRINGER et al., 2012).

A teoria do modelo de desenvolvimento sugere que o *imprinting* seria uma aquisição evolutiva e ocorreria em resposta à pressão

ambiental, induzindo a rápidas mudanças de expressão ou à inativação dos alelos parentais de acordo com a necessidade (BEAUDET; JIANG, 2002). Entretanto, essa maior capacidade de adaptação é controversa, uma vez que, ao contrário do *imprinting* – que se assemelha à haploidia – a diploidia protege contra mutações recessivas deletérias (WOLF; HAGER, 2006).

Há também a hipótese de o ovário bomba-relógio, na qual o *imprinting* evitaria a partenogênese (ou reprodução assexuada) e assim asseguraria a variabilidade genética e protegeria a mãe contra doenças malignas do trofoblasto (HAGEMANN et al., 1998; VARMUZA; MANN, 1994). Apesar de não ocorrer, naturalmente, em mamíferos, a partenogênese já foi descrita em cerca de 70 espécies de vertebrados, como cobras e lagartos, entre esses o dragão-de-komodo (*Varanus komodoensis*)<sup>1</sup>, o que traz preocupações a respeito da diminuição da variabilidade genética e do aumento dos riscos de extinção dessa espécie (WATTS et al., 2006). Um fato interessante é que nas espécies de lagarto em que a fêmea é o sexo heterogamético (possui os cromossomos Z e W), o desenvolvimento partenogenético do gameta feminino produzirá somente descendentes machos (WATTS et al., 2006).

Além dessas, há a hipótese de que o *imprinting* permitiria a defesa do hospedeiro ou a vigilância contra a perda de cromossomos, de modo a prevenir o câncer e a silenciar elementos de DNA estranhos inseridos no genoma (JAENISCH, 1997; PASK et al., 2009).

## Principais genes *imprinted* descritos e suas funções

Estima-se a existência de 100 a 1.000 genes *imprinted* no genoma (YOUNG; FAIRBURN, 2000). Segundo o *Catálogo On-line de Genes Imprinted* (IMPRINTED..., 2013), foram descritos 79 genes *imprinted* em humanos e 122 em camundongos, enquanto o *Gene Imprint Database* (GENEIMPRINT, 2013) indica a existência de 88 genes *imprinted* confirmados em humanos e outros 108 prováveis genes *imprinted* ainda a serem confirmados. Entretanto, para os

<sup>1</sup> O dragão-de-komodo ou crocodilo-da-terra é uma espécie de lagarto pré-histórico que vive nas ilhas de Komodo, na Indonésia.

animais de produção (IMPRINTED, 2013; WEB..., 2013), esse número é bem menor<sup>2</sup>:

**Em bovinos, 22:** *ASCL2, GRB10, GTL2, H19, IGF2, IGF2R, ITUP1, MAGEL2, MEG8, MEST, NAP1L5, NESP55, NNAT, PEG3, PEG10, PEG11, PHLDA2, PLAGL1, SNRPN, TSSC4, USP29* e *XIST*.

**Em ovinos, 16:** *BEGAIN, CDKN1C, DAT, DLK1, GNAS, GRB10, GTL2, H19, IGF2, IGF2R, MEG8, MEST, PEG3, PEG11, PEG11-AS* e *SASH2*.

**Em suínos, 15:** (*COPG2, DIRAS3, DLK1, GNAS, GTL2, H19, IGF2, IGF2-AS, IGF2R, MEST, NNAT, PEG10, PHLDA2, PLAGL1* e *SGCE*).

Vale ressaltar que, alguns genes *imprinted*, são conhecidos por mais de uma denominação, por exemplo:

- *CDKN1C* e *p57KIP2*.
- *GNAS, GS-ALPHA, GNASXL* e *NESP*.
- *GTL2* e *MEG3*.
- *IGF2R* e *M6PR*.
- *ITUP1, MIM1, MIMT1* e *IMPO1*.

<sup>2</sup> *ASCL2 (MASH2): achaete-scute complex homolog 2* (expressão materna); *BEGAIN: brain-enriched guanylate kinase-associated protein 2B* (expressão paterna); *CDKN1C (p57KIP2): cyclin-dependent kinase inhibitor* (expressão materna); *COPG2: gamma2 subunit of the coatomer protein complex* (expressão materna); *DAT: DLK1-associated transcripts* (expressão paterna); *DIRAS3: GTP-binding RAS-like 3* (expressão paterna); *DLK1: delta-like 1* (expressão paterna); *GNAS (GS-ALPHA, GNASXL, NESP): guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating* (expressão materna em feto e paterna em membrana corioalantoide); *GRB10 (MEG1): growth factor receptor-bound protein 10* (expressão materna); *GTL2 (MEG3): gene trap locus 2* (expressão materna); *H19: H19 gene* (expressão materna); *IGF2: insulin-like growth factor 2* (expressão paterna); *IGF2-AS: IGF2-antisense* (expressão paterna); *IGF2R (M6PR): insulin-like growth factor 2 receptor* (expressão materna); *ITUP1 (MIM1, MIMT1, IMPO1): MER1 repeat-containing imprinted transcript 1* (expressão paterna); *MAGEL2: melanoma antigen, family L, 2* (expressão paterna); *MEG8: maternally expressed gene 8* (expressão materna); *MEST (PEG1): Mesoderm-specific transcript* (expressão paterna); *NAP1L5: nucleosome assembly protein 1-like 5* (expressão paterna); *NESP55: neuroendocrine secretory protein* (expressão materna); *NNAT: neuronatin* (expressão paterna); *PEG3: paternally expressed gene 3* (expressão paterna); *PEG10: paternally expressed gene 10* (expressão paterna); *PEG11 (RTL1): paternally expressed gene 11* (expressão paterna); *PEG11-AS (antiPEG11, RTL1-AS): antisense transcript from PEG11* (expressão materna); *PHLDA2 (TSSC3, IPL): pleckstrin homology-like domain, family A, member 2* (expressão materna); *PLAGL1: pleiomorphic adenoma gene-like 1* (expressão paterna); *SASH2 (ASCL2, MASH2): sheep achaete scute homolog 2* (expressão materna); *SGCE: epsilon-sarcoglycan* (expressão paterna); *SNRPN: small nuclear ribonucleo-protein polypeptide N* (expressão paterna); *TSSC4: tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 4* (expressão materna); *USP29: ubiquitin specific peptidase 29* (expressão paterna); *XIST: X (inactive)-specific transcript* (expressão paterna).

- *MEST* e *PEG1*.
- *PEG11* e *RTL1*.
- *PEG11-AS*, *antiPEG11* e *RTL1-AS*.
- *PHLDA2*, *TSSC3* e *IPL*.

Os genes *imprinted* representam menos de 1% dos genes em todo o genoma, mas possuem funções determinantes em vários processos. Entre essas funções, destacam-se:

- A regulação do crescimento fetal, por *IGF2*, *IGF2R* e *H19* (DEAN et al., 1998; KENDREW, 1994; SASAKI et al., 1995; WATSON et al., 1992).
- O suprimento sanguíneo e a formação da placenta, por *IGF2R*, *INS2* e *MASH2* (LOI et al., 1998; TANAKA et al., 1999; YOUNG; FAIRBURN, 2000).
- A inativação do cromossomo X pelo *XIST* (YOUNG; FAIRBURN, 2000).
- O comportamento materno, pelo *MEST* (LEFEBVRE et al., 1998).
- A aprendizagem pelo *XRL3B* (DAVIES et al., 2005).

Charalambous et al. (2007) sumarizaram as funções de genes *imprinted* em diferentes tecidos:

**Placenta** – Sobrevivência (*MASH2* e *PEG10*), crescimento e estrutura (*IPL* e *IGF2*), sistemas específicos de transporte (*SLC22A2* e *SLC22A3*), suprimento de nutrientes para o feto (*SLC22A1L/IMPT1*, *SLC22A2*, *SLC22A3* e *SLC38A4*).

**Crescimento e metabolismo pós-natal** – Liberação AMPc (*GNAS*), comportamento alimentar (*GNASXL*), sinalização de hormônio do crescimento (*RASGRF1*), transportador aminofosfolípido (*ATP10C*).

**Embrião e placenta** – Genes em rede e coordenados temporalmente, com efeitos no crescimento (*IGF2*, *IGF2R*, *DLK1/PREF1*, *CDKN1C*, *GRB10*, *ZAC1*, *PEG1* e *PEG3*).

**Crescimento pré-natal (interação entre feto, placenta e mãe)** – Efeito em T3 e T4 (*DIO3*), *IGF2* e *PEG*.

**Metabolismo/deposição de gordura e massa magra** – Diferenciação de pré-adipócito em adipócito (*DLK1/PREF1*), magreza (*IGF2* e *GRB10*).

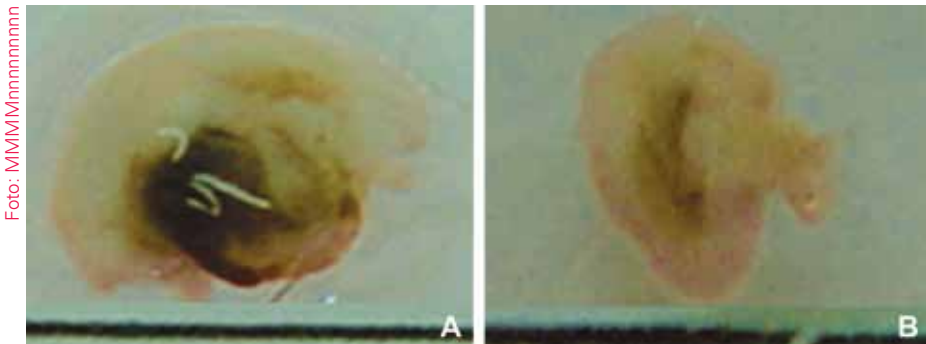


**Sensibilidade à insulina e produção de insulina** – Maturação de células  $\beta$  (*IGF2*), produção de insulina (*ZAC1*), desenvolvimento do pâncreas (*GRB10*).

**Apetite e hipotálamo** – Homeostase de energia (*IGF2* e *PEG3*), regulação de apetite (*ZAC1* e *DLK1/PREF1*).

Em camundongos, os genes de origem materna contribuem para o desenvolvimento do embrião propriamente dito, principalmente das estruturas axiais (cérebro, tubo neural e somitos), dos órgãos (rim e baço) e do endoderma do saco vitelino, enquanto os genes de origem paterna participam no desenvolvimento dos tecidos extraembrionários, especialmente do trofoblasto (CRUZ; PEDERSON, 1991; KENDREW, 1994; KONO, 1998).

Em bovinos e em ovinos, apesar de os genes de origem materna serem capazes de estabelecer o tamanho adequado das membranas extraembrionárias (HAGEMANN et al., 1998; MÉO-NICIURA, 2005), os embriões partenogenéticos (Figura 3) morrem na fase em que o desenvolvimento da placenta é crítico para a implantação (HAGEMANN et al., 1998). Assim, os embriões monoparentais (androgenéticos ou partenogenéticos) são incapazes de levar a gestação a termo e morrem durante a fase inicial do desenvolvimento intrauterino.



**Figura 3.** Embriões bovinos aos 35 e 36 dias de gestação: (A) embrião produzido por fecundação in vitro; (B) embrião partenogenético produzido por ativação química do oócito.

Estudos demonstraram que a manipulação do genoma de embriões partenogenéticos – que causou o aumento da expressão do *IGF2* e a expressão monoalélica do *H19* – normalizou a expressão de 32 outros

genes *imprinted* e possibilitou o nascimento de um camundongo partenogenético (KONO et al., 2004). Isso demonstra a intensa interação existente entre genes *imprinted*.

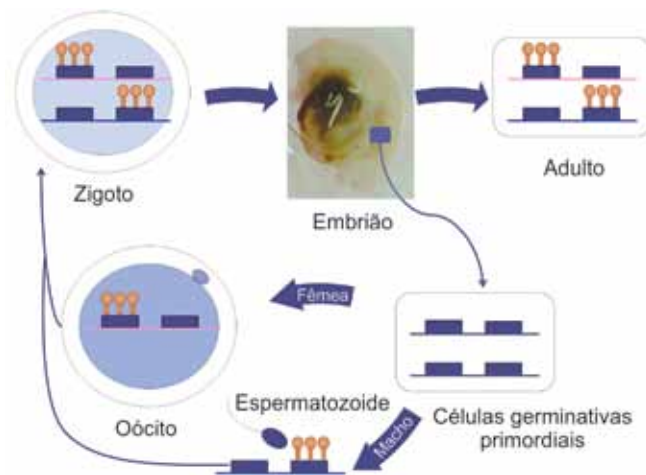
Em continuidade a esse estudo, a deleção da região diferencialmente metilada (DMR) do gene *H19* e da região intragênica *DLK1-DIO3* promoveu o nascimento de partenogenéticos em taxas similares às obtidas por fecundação in vitro, indicando que essas duas regiões são as únicas barreiras paternas ao desenvolvimento de indivíduo bimaterno em camundongos (KAWAHARA et al., 2007). Entretanto, esses estudos não foram repetidos em outras espécies animais.

## Mecanismos de estabelecimento e manutenção de *imprints*

O estabelecimento dos *imprints* é resultado de modificações epigenéticas diferenciais (metilação do DNA, modificações pós-traduccionais em histonas ou ação de RNAs não codificadores) entre alelos de um mesmo gene e que são replicadas, estavelmente, durante as divisões celulares.

A metilação da citosina do DNA em sítios CpG é o mecanismo epigenético mais compreendido e estudado responsável pela determinação dos *imprints* (ALBERTS et al., 1994; RUVINSKY, 1999). As ilhas de CpG – reguladas por metilação específica do alelo parental – constituem as DMRs que controlam o *imprinting* e, por isso, são chamadas de regiões de controle de *imprinting* (ICRs) (FEIL; BERGER, 2007). As ICRs contêm sítios de ligação para fatores de transcrição, como o YY1 e o CTCF (KIM, 2008).

Assim, nos genes *imprinted*, para que o padrão de metilação seja transmitido aos descendentes, é necessário que ele seja estabelecido nos gametas, durante a gametogênese, que é a única fase em que os genomas de origem materna e paterna estão fisicamente separados (SASAKI et al., 1995). Assim, é essencial que todos os *imprints* herdados do espermatozoide e do oócito sejam “apagados” nas células germinativas primordiais (PGCs) do embrião recém-formado, para que o indivíduo produza gametas apenas com os padrões de *imprints* relativos ao seu sexo. Portanto, os *imprints* desaparecem nas células germinativas primordiais (YOUNG; FAIRBURN, 2000) e voltam a aparecer durante a gametogênese, nos gametas maduros (RUVINSKY, 1999), conforme mostra a Figura 4:



**Figura 4.** Os *imprints* (alaranjados), estabelecidos nos genomas do oócito (rosa) e do espermatozoide (azul), são transmitidos ao zigoto e mantidos durante todo o desenvolvimento, exceto nas células germinativas primordiais (PGCs), em que são apagados e, posteriormente, restabelecidos nos gametas de acordo com o sexo do indivíduo (macho ou fêmea).

Ilustração: Simone Cristina Méo Niciura.

Durante a fase migratória, em que as PGCs migram do epiblasto e passam pelo saco vitelino e pelo mesoderma intraembrionário, ou durante a fase gonadal, depois de atingirem a crista gonadal, as PGCs passam por uma onda global de desmetilação que apaga as marcas epigenéticas nos genes *imprinted*. A perda de metilação nas PGCs provavelmente ocorre por um mecanismo ativo de excisão de base, no qual a 5-metil-citosina (5mC) é convertida em 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC) pelas enzimas Tet (STROGANTSEV; FERGUSON-SMITH, 2012), conforme o que foi visto no Capítulo 2.

Nos gametas em formação, o processo de metilação *de novo* restabelece as marcas epigenéticas nas DMRs que identificam a origem parental do alelo. De acordo com o que foi visto no Capítulo 2, a metilação *de novo* é promovida pelas metiltransferases de DNA (DNMTs) 3A e 3B. Nas linhagens germinativas, a DNMT3A forma um complexo com a DNMT3L, que interage com a H3K4 desmetilada ou

com transcritos e com as proteínas ZFP57/KAP1 e promove a metilação *de novo* (CHOTALIA et al., 2009; STROGANTSEV; FERGUSON-SMITH, 2012).

Os *imprints* são apagados e restabelecidos em momentos diferentes ao longo da formação dos gametas masculinos ou femininos a partir das PGCs. Por sua vez, a regulação de diferentes genes *imprinted* na mesma linhagem germinativa (masculina ou feminina) também é assíncronica. A desmetilação dos genes *imprinted* é precedida por modificações nas marcas epigenéticas de histonas, em especial, por diminuição acentuada dos níveis de H3K9me2 e pela elevação dos níveis de H3K27me nas PGCs migratórias (HAJKOVA et al., 2008). Os níveis de metilação do DNA nas PGCs decrescem ainda mais durante a fase migratória e na fase gonadal e geralmente a linhagem germinativa masculina reprograma, epigeneticamente, os genes *imprinted* antes da linhagem germinativa feminina (BIERMANN; STEGER, 2007).

Em suínos, por exemplo, a perda da metilação na DMR do gene *IGF2R* ocorre aproximadamente aos 22 dias do desenvolvimento em machos e entre os dias 29 e 31 em fêmeas, enquanto para a ICR do *IGF2-H19*, o decréscimo da metilação ocorre entre os dias 22 e 42, com retomada da metilação aproximadamente aos 35 dias em machos e depois de 42 dias em fêmeas (HYLDIG et al., 2011; PETKOV et al., 2009).

Quanto ao momento em que as marcas epigenéticas são restabelecidas nos *imprints*, a variação temporal entre gêneros é bastante evidente em camundongos. De um total de 21 DMRs estabelecidas durante a gametogênese, 17 são metiladas no alelo materno após o nascimento, no oócito em crescimento, e ocorrem em regiões promotoras, enquanto 4 são metiladas no alelo paterno ainda nas células germinativas e ocorrem em regiões intergênicas (STROGANTSEV; FERGUSON-SMITH, 2012). Assim, nos machos, os *imprints* são estabelecidos na fase pré-natal, nos espermatócitos ainda diploides, enquanto nas fêmeas, os *imprints* são estabelecidos no estágio do diplóteno da meiose (MURPHY; JIRTLE, 2003).

O mecanismo usado na identificação parental do alelo para a metilação ainda não é completamente conhecido, mas deve envolver a participação da estrutura da cromatina, de sítios de microRNA, de sítios hipersensíveis à DNaseI (BOYANO et al., 2008), de espaçamento

ótimo entre os dinucleotídeos CpG, de modificações de histonas (o alelo metilado apresenta H3K9me3 e H3K20me3, enquanto o alelo ativo possui H3K3me2 e H3K9ac, além de outras histonas acetiladas) (MONK et al., 2008; SINGH et al., 2010) e de transcrição gênica (CHOTALIA et al., 2009). Além desses elementos em *cis* – que ocorrem no próprio cromossomo – pode ocorrer a participação de fatores em *trans*, como as proteínas de ligação de metil (MeCP2, MBD1 e MBD3) (MCMURRAY; SCHMIDT, 2012).

As etapas de desmetilação e de metilação *de novo* – descritas anteriormente – são específicas para a linhagem germinativa e, nesses eventos, os genes *imprinted* são reprogramados de modo diferencial entre os alelos maternos e paternos. Uma segunda onda de desmetilação global, que promove a reprogramação epigenética de todos os demais genes (exceto os *imprinted*), ocorre logo após a fecundação, e o restabelecimento do padrão de metilação acontece no estágio de blastocisto, em camundongos, ou no estágio de 8 a 16 células, em bovinos (REIK et al., 2001; MANN; BARTOLOMEI, 2002).

Nessa segunda onda de desmetilação global do genoma – que ocorre durante o desenvolvimento do conceito – os genes *imprinted* são protegidos e permanecem metilados (JAENISCH, 1997; RUVINSKY, 1999) (Capítulo 7). A proteção dos genes *imprinted* contra a desmetilação ativa é mediada pelos fatores PGC7/Dppa3/Stella que são recrutados pela H3K9me2, enquanto a prevenção da ocorrência da desmetilação passiva ocorre pela manutenção da DNMT1 e da DNMT específica do oócito (DNMT1o) no núcleo (FAULK; DOLINOY, 2011; NAKAMURA et al., 2012; STROGANTSEV; FERGUSON-SMITH, 2012).

Além da metilação do DNA, as modificações de histonas e a expressão de transcrito *antisense* ou RNA não codificador também constituem mecanismos de controle de *imprinting* (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999; YOUNG; FAIRBURN, 2000; SPAHN; BARLOW, 2003). Dos 6 genes *imprinted* descritos em marsupiais, só 2 são regulados por metilação nas DMRs, enquanto os demais genes são controlados por marcas de histonas (H3K9me, H3K27me, H3K4me e acetilação) (DAS et al., 2012).

A metilação diferencial pode induzir o silenciamento de um alelo parental por vários mecanismos (MONK et al., 2008). O mecanismo mais simples envolve o silenciamento direto do promotor, como observado nos domínios *microimprinted* (gene *imprinted* localizado em íntron

de gene não *imprinted*): a metilação do promotor num alelo bloqueia a expressão do gene *imprinted* nesse alelo (Figura 5a). Exemplos: *NAP1L5*, *INPP5F\_V2* e *U2AF1-RS1* (WOOD; OAKEY, 2006).

Um segundo mecanismo envolve a ação do fator de transcrição CTCF como *insulator*, no modelo bloqueador de *enhancer* (*enhancer-blocker* ou *boundary*): a metilação na ICR impede a expressão do gene *imprinted* localizado a jusante ao mesmo tempo em que evita a ligação do *insulator* CTCF, permitindo que o *enhancer* estimule a expressão do gene *imprinted* a montante. Já a ausência de metilação na ICR resulta na expressão do gene *imprinted* adjacente e permite a ligação de CTCF que impede o acesso dos *enhancers* ao gene *imprinted* a montante (Figura 5b). Exemplos:

- Locos *IGF2/H19*, *DLK1/GTL2*.
- *RASGRF1/A19* (DELAVAL; FEIL, 2004).

O terceiro mecanismo envolve a ação de um transcrito RNA *antisense* ou não codificador. O RNA *antisense*, produzido por um alelo, bloqueia a expressão do gene *imprinted* nesse alelo (DELAVAL; FEIL, 2004):

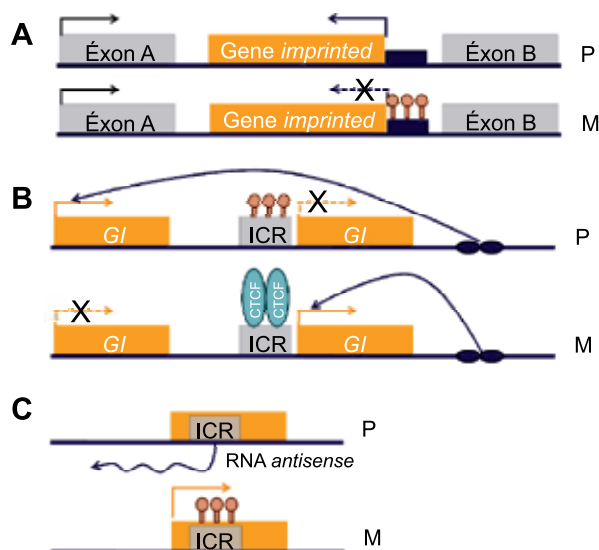
- Por oclusão do promotor ou do transcrito.
- Por competição por elementos regulatórios, como fatores de transcrição e *enhancers*.
- Por recrutamento de proteínas *Polycomb*.

Por enriquecimento em marcas repressivas de histonas (BERTEAUX et al., 2008; LATOS et al., 2009; MONK et al., 2008) enquanto a metilação na ICR no outro alelo bloqueia a expressão do RNA *antisense* e permite que o gene *imprinted* seja expresso (Figura 5c). Exemplo: *IGR2R*, *KCNQ1* e *GNAS*.

## Técnicas moleculares para identificar genes *imprinted*

Genes *imprinted* podem ser identificados (RUF et al., 2006):

- Pelo uso de animais portadores de dissomia uniparental ou de translocações cromossômicas.
- Pela avaliação de genes candidatos conhecidos como *imprinted* em outras espécies.



**Figura 5.** Controle epigenético do *genomic imprinting* nos alelos paterno (P) e materno (M). (A) Domínio *microimprinted*: a metilação (alaranjada) do promotor (roxo) em M promove silenciamento, enquanto a ausência de metilação em P resulta em expressão; (B) Modelo bloqueador de *enhancer*: a metilação na região de controle de *imprinting* (ICR) em P promove silenciamento do gene *imprinted* (GI) à jusante e evita ligação do CTCF, permitindo ao *enhancer* promover a expressão do gene a montante; em M, a ligação de CTCF evita a metilação da ICR, resultando na expressão do gene a jusante, e impede o acesso dos *enhancers* ao gene à montante; (C) RNA *antisense*: produzido em P, bloqueia a expressão gênica no próprio alelo, enquanto a metilação em M impede a produção de *antisense*, levando à expressão gênica. Fonte: modificado de Delaval e Feil (2004) e Wood e Oakey (2006).

- Pela avaliar a expressão diferencial (por hibridização subtrativa, *differential display* ou microarranjo) entre conceptos androge-néticos e partenogenéticos. Entretanto, a avaliação da expres-são diferencial entre conceptos monoparentais pode não ser muito eficiente para a descoberta de novos genes *imprinted*.

Com o uso de ferramentas de bioinformática, genes *imprinted* podem ser inferidos pela identificação de ilhas de CpG, por exemplo, nos programas MethPrimer<sup>3</sup>(LI; DAHIYA, 2002) e Emboss<sup>4</sup> de sítios de ligação de CTCF<sup>5</sup>; e por contagem de alelos (com SNPs) com representação desigual de transcritos em bibliotecas de cDNA depositadas em banco de dados de EST (SEOIGHE et al., 2006).

As tecnologias de nova geração também permitem identificar genes *imprinted* por meio da observação de SNPs identificados como heterozigotos pelo microarranjo de genotipagem, mas identificados como homozigotos pelos dados de RNA-seq, o que evidencia a expressão monoalélica ou o *imprinting* (HEAP et al., 2010); e, a partir dos dados gerados para estudos de expressão gênica alelo-específica, um SNP pode ser classificado como *imprinted* quando mais de 50% das *reads* mapearem para alelos do mesmo parental (DEVEALE et al., 2012; GREGG et al., 2010).

Além disso, o estado de metilação das DMRs pode ser determinado por meio de digestão do DNA com endonucleases de restrição sensíveis à metilação ou por tratamento com bissulfito seguido de sequenciamento ou de PCR específica de metilação (TRINH et al., 2001), técnicas detalhadas no Capítulo 5. Entretanto, a confirmação do *imprinting* dá-se somente por meio da avaliação da expressão gênica alelo-específica parental por discriminação alélica. Além da discriminação alélica por PCR em tempo real, as tecnologias de nova geração, em função da cobertura de sequenciamento, permitem de maneira muito precisa a identificação da expressão alelo-específica, por meio da contagem dos transcritos heterozigotos de genes autossômicos. Assim, a expressão alelo-específica ocorre quando um dos alelos de um indivíduo heterozigoto é mais expresso que o outro alelo ou quando a diferença entre as *reads* por RNA-seq para os dois alelos é significativa (SATYA et al., 2012).

Outra estratégia usada para identificar genes *imprinted* tem sido baseada em mapas de ligação, por meio de métodos estatísticos que incorporam o *genomic imprinting* no mapeamento genético de locos de caracteres quantitativos (QTL) (CUI, 2007).

<sup>3</sup> Disponível em: <<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>>.

<sup>4</sup> Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>>.

<sup>5</sup> Disponível em: <<http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/spa.htm>>.



## Considerações finais

A expressão de alguns genes controlada por sua origem (materna ou paterna), denominada de *genomic imprinting*, derrubou algumas bases genéticas estabelecidas e contribuiu para a compreensão de diversos fenômenos anteriormente pouco compreendidos. O *imprinting* participa:

- Na regulação do crescimento do feto.
- No suprimento sanguíneo e na formação da placenta.
- Na supressão de tumores.
- Na proteção do organismo contra DNA estranho.
- Na memória celular.
- Na expressão de hormônios.
- Na produtividade de animais, entre outros.

Portanto, tal mecanismo é de extrema importância para a vitalidade do organismo e para a realização plena de suas funções, e o *imprinting* anômalo pode acarretar falhas no desenvolvimento e no crescimento dos indivíduos afetados.

## Referências

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. p. 451.

ARNAUD, P. Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control. **Reproduction**, Surrey, v. 140, p. 411-423, 2010.

BADCOCK, C.; CRESPI, B. Battle of the sexes may set the brain. **Nature**, London, v. 454, p. 1054-1055, 2008.

BARLOW, D. P. Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 45, p. 379-403, 2011.

BEAUDET, A. L.; JIANG, Y. H. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprinting-dependent evolution. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 70, p. 1389-1397, 2002.

BERTEAUX, N.; APTEL, N.; CATHALA, G.; GENTON, C.; COLL, J.; DACCACHE, A.; SPRUYT, N.; HONDERMARCK, H.; DUGIMONT, T.; CURGY, J. J.; FORNÉ,

- T.; ADRIAENSSENS, E. A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 28, p. 6731-6745, 2008.
- BIERMANN, K.; STEGER, K. Epigenetics in male germ cells. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 28, p. 466-480, 2007.
- BOYANO, M. D.; ANDOLLO, N.; ZALDUENDO, M. M.; ARÉCHAGA, J. Imprinting of mammalian male gametes is gene specific and does not occur at a single stage of differentiation. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 52, p. 1105-1111, 2008.
- CATTANACH, B. M.; KIRK, M. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. **Nature**, London, v. 315, p. 496-498, 1985.
- CHARALAMBOUS, M.; ROCHA, S. T. da; FERGUSON-SMITH, A. C. Genomic imprinting, growth control and the allocation of nutritional resources: consequences for postnatal life. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, Oxford, v. 14, p. 3-12, 2007.
- CHOTALIA, M.; SMALLWOOD, S. A.; RUF, N.; DAWSON, C.; LUCIFERO, D.; FRONTERA, M.; JAMES, K.; DEAN, W.; KELSEY, G. Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 23, p. 105-117, 2009.
- CRUZ, Y. P.; PEDERSON, R. A. Origin of embryonic and extraembryonic cell lineages in mammalian embryos. In: PEDERSON, R. A.; MCLAREN, A.; FIRST, N. (Ed.). **Animal application of research in mammalian development**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 147-204.
- CUI, Y. A statistical framework for genome-wide scanning and testing of imprinted quantitative trait loci. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 244, p. 115-126, 2007.
- DAS, R.; ANDERSON, N.; KORAN, M. E. I.; WEIDMAN, J. R.; MIKKELSEN, T. S.; KAMAL, M.; MURPHY, S. K.; LINBLAD-TOH, K.; GREALLY, J. M.; JIRTLE, R. L. Convergent and divergent evolution of genomic imprinting in the marsupial *Monodelphis domestica*. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 394, 2012.
- DAVIES, W.; ISLES, A.; SMITH, R.; KARUNADASA, D.; BURRMANN, D.; HUMBY, T.; OJARIKRE, O.; BIGGIN, C.; SKUSE, D.; BURGOYNE, P.; WILKINSON, L. Xlr3b is a new imprinted candidate for X-linked parent-of-origin effects on cognitive function in mice. **Nature Genetics**, New York, v. 37, p. 625-629, 2005.

DEAN, W.; BOWDEN, L.; AITCHISON, A.; KLOSE, J.; MOORE, T.; MENESES, J. J.; REIK, W.; FEIL, R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 2273-2282, 1998.

DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 14, p. 188-195, 2004.

DEVEALE, B.; van der KOOY, D.; BABK, T. Critical evaluation of imprinted gene expression by RNA-Seq: a new perspective. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 8, p. e1002600, 2012.

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, Georgetown, v. 6, p. 791-797, 2011.

FEIL, R.; BERGER, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 192-199, 2007.

GENEIMPRINT database. 2013. Disponível em: <<http://www.geneimprint.com/site/gene-by-species>>. Acesso em: 11 abr. 2013.

GREGG, C.; ZHANG, J.; WEISSBOURD, B.; LUO, S.; SCHROTH, G. P.; HAIG, D.; DULAC, C. High resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. **Science**, Washington, DC, v. 329, p. 643-648, 2010.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, A. J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S.; TERVIT, H. R. In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 50, p. 154-162, 1998.

HAJKOVA, P.; ANCELIN, K.; WALDMANN, T.; LACOSTE, N.; LANGE, U. C.; CESARI, F.; LEE, C.; ALMOUZNI, G.; SCHNEIDER, R.; SURANI, M. A. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. **Nature**, London, v. 452, p. 877-881, 2008.

HEAP, G. A.; YANG, J. H. M.; DOWNES, K.; HEALY, B. C.; HUNT, K. A.; BOCKETT, N.; FRANKE, L.; DUBOIS, P. C.; MEIN, C. A.; DOBSON, R. J.; ALBERT, T. J.; RODESCH, M. J.; CLAYTON, D. G.; TODD, J. A. Genome-wide analysis of allelic expression imbalance in human primary cells by high-throughput transcriptome resequencing. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 19, p. 122-134, 2010.

HORE, T. A.; RAPKINS, R. W.; GRAVES, J. A. M. Construction and evolution of imprinted loci in mammals. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 440-448, 2007.

HYLDIG, S. M.; CROXALL, N.; CONTRERAS, D. A.; THOMSEN, P. D.; ALBERIO, R. Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. **BMC Developmental Biology**, London, v. 11, p. 11, 2011.

IMPRINTED gene catalogue. 2013. Disponível em: <<http://igc.otago.ac.nz/home.html>>. Acesso em: 11 mar. 2013.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 13, p. 323-329, 1997.

KAWAHARA, M.; WU, Q.; TAKAHASHI, N.; MORITA, S.; YAMADA, K.; ITO, M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; KONO, T. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 1045-1050, 2007.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; KIM, E. S. Comparative analysis of sequence characteristics of imprinted genes in human, mouse, and cattle. **Mammalian Genome**, New York, v. 18, p. 538-547, 2007.

KIM, J. Multiple YY1 e CTCF binding sites in imprinting control regions. **Epigenetics**, Georgetown, v. 3, p. 115-118, 2008.

KONO, T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. **Reproduction Fertility and Development**, Victoria, v. 10, p. 593-598, 1998.

KONO, T.; OBATA, Y.; WU, Q.; NIWA, K.; ONO, Y.; YAMAMOTO, Y.; PARK, E. S.; SEO, J.-S.; OGAWA, H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. **Nature**, London, v. 428, p. 860-864, 2004.

LATOS, P. A.; STRICKER, S. H.; STEENPASS, L.; PAULER, F. M.; HUANG, R.; SENNERGIN, B. H.; REGHA, K.; KOERNER, M. V.; WARCZOK, K. E.; UNGER, C.; BARLOW, D. P. An in vitro ES cell imprinting model shows that imprinted expression of the *Igf2r* gene arises from an allele-specific expression bias. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 437-448, 2009.

LEFEBVRE, L.; VIVILLE, S.; BARTON, S. C.; ISHINO, F.; KEVERNE, E. B.; SURANI, M. A. Abnormal maternal behavior and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. **Nature Genetics**, New York, v. 20, p. 163-169, 1998.

LI, L. C.; DAHIYA, MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, p. 1427-1431, 2002.

- LIZE, A.; CORTESERO, A. M.; ATLAN, A.; POINSOT, D. Kin recognition in *Aleochara bilineata* could support the kinship theory of genomic imprinting. **Genetics**, Austin, v. 175, p. 1735-1740, 2007.
- LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA JÚNIOR, J.; CAPPAL, P.; MOOR, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, p. 1177-1187, 1998.
- MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1003, 2002.
- MCGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 179-183, 1984.
- MCMURRAY, E. N.; SCHMIDT, J. V. Identification of imprinting regulators at the Meg3 differentially methylated region. **Genomics**, San Diego, v. 100, p. 184-194, 2012.
- MÉO-NICIURA, S. C. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes "imprinted" em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MONK, D.; WAGSCHAL, A.; ARNAUD, P.; MULLER, P.; PARKER-KATIRAEI, L.; BOURC'HIS, D.; SCHERER, S. W.; FEIL, R.; STANIER, P.; MOORE, G. E. Comparative analysis of human chromosome 7q21 and mouse proximal chromosome 6 reveals a placental-specific imprinted gene, TFPI2/Tfpi2, which requires EHMT and EED for allelic-silencing. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 1270-1281, 2008.
- MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. **Bioessays**, Cambridge, v. 25, p. 577-588, 2003.
- NAKAMURA, T.; LIU, Y. J.; NAKASHIMA, H.; UMEHARA, H.; INOUE, K.; MATOBA, S.; TACHIBANA, M.; OGURA, A.; SHINKAI, Y.; NAKANO, T. PGC7binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. **Nature**, London, v. 486, p. 415-419, 2012.
- PASK, A. J.; PAPPENFUSS, A. T.; AGER, E. I.; MCCOLL, K. A.; SPEED, T. P.; RENFREE, M. B. Analysis of the platypus genome suggests a transposon origin for mammalian imprinting. **Genome Biology**, London, v. 10, p. R1, 2009.
- PETKOV, S. G.; REH, W. A.; ANDERSON, G. B. Methylation changes in porcine primordial germ cells. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 76, p. 22-30, 2009.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, Washington, DC, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

- RUF, N.; DÜNZINGER, U.; BRINCKMANN, A.; HAAF, T.; NÜRNBERG, P.; ZECHNER, U. Expression profiling of uniparental mouse embryos is inefficient in identifying novel imprinted genes. **Genomics**, Austin, v. 87, p. 509-519, 2006.
- RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, supl. 2, p. 228-237, 1999.
- SASAKI, H.; FERGUSON-SMITH, A. C.; SHUM, A. S.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Temporal and spatial regulation of *H19* imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 4195-4202, 1995.
- SATYA, R. V.; ZAVALJEVSKI, N.; REIFMAN, J. A new strategy to reduce allelic bias in RNA-Seq readmapping. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. e127, 2012.
- SEOIGHE, C.; NEMBAWARE, V.; SCHEFFLER, K. Maximum likelihood inference of imprinting and allele-specific expression from EST data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, p. 3032-3039, 2006.
- SINGH, P.; CHO, J.; TSAI, S. Y.; RIVAS, G. E.; LARSON, G. P.; SZABÓ, P. E. Coordinated allele-specific histone acetylation at the differentially methylated regions of imprinted genes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. 7974-7990, 2010.
- SOLTER, D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 127-146, 1988.
- SPAHN, L.; BARLOW, D. P. An ICE pattern crystallizes. **Nature Genetics**, New York, v. 35, p. 11-12, 2003.
- SPIELMAN, M.; VINKENOOG, R.; DICKINSON, H. G.; SCOTT, R. J. The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, p. 705-711, 2001.
- STRINGER, J. M.; SUZUKI, S.; PASK, A. J.; SHAW, G.; RENFREE, M. B. Selected imprinting of *INS* in the marsupial. **Epigenetics & Chromatin**, London, v. 5, p. 14, 2012.
- STROGANTSEV, R.; FERGUSON-SMITH, A. C. Proteins involved in establishment and maintenance of imprinted methylation marks. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 2, p. 227-239, 2012.
- TANAKA, M.; PUCHYR, M.; GERTSENSTEIN, M.; HARPAL, K.; JAENISCH, R.; ROSSANT, J.; NAGY, A. Parental origin-specific expression of *Mash2* is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 87, p. 129-142, 1999.

TODER, R.; WILCOX, S. A.; SMITHWICK, N.; GRAVES, J. A. The human/mouse imprinted genes IGF2, H19, SNRPN and ZNF127 map to two conserved autosomal clusters in marsupial. **Chromosome Research**, Oxford, v. 4, p. 295-300, 1996.

TRINH, B. N.; LONG, T. I.; LAIRD, P. W. DNA methylation analysis by MethyLight technology. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 456-462, 2001.

VARMUZA, S.; MANN, M. Genomic imprinting defusing the ovarian time bomb. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 10, p. 118-123, 1994.

WATSON, J. D.; ZOLLER, M.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. **Recombinant DNA**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1992. p. 267-272.

WATTS, P. C.; BULEY, K. R.; SANDERSON, S.; BOARDMAN, W.; CIOFI, C.; GIBSON, R. Parthenogenesis in Komodo dragons. **Nature**, London, v. 444, p. 1021-1022, 2006.

WEB atlas of imprinted genes in cattle. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/imprintedgenesinbovines/home/catalogue-of-imprinted-genes>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

WOLF, J. B.; HAGER, R. A maternal-offspring coadaptation theory for the evaluation of genomic imprinting. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 4, p. e380, 2006.

WOOD, A. J.; OAKEY, R. J. Genomic imprinting in mammals: emergin themes and established theories. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, p. e147, 2006.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Los Altos, New York, v. 53, p. 627-648, 2000.

ZAITOUN, I.; KHATIB, H. Comparative genomic imprinting and expression analysis of six cattle genes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 25-32, 2008.