



T5. EPIGENÉTICA, IMPRINTING GENÔMICO, DOENÇAS ASSOCIADAS E INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

RCG1002: Genética

Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto – Abril/ 2024

aparecidamfontes@usp.br

BIBLIOGRAFIA:

- ❑ The Basic Science of Oncology. Tannock, Hill, Bristow and Harrington. (2013). 5ª Edição. Editora McGraw Hill.
- ❑ Concepts of Genetics. Klug, Cummings, Spencer, Palladino e Killian. (2019). 12ª Edição. Editora Pearson.
- ❑ Genetics: from Gene to Genomes. Hartwell, Goldberg, Fischer e Hood. (2018). 6ª Edição. Editora McGraw Hill.
- ❑ The Human Genome in Health and Disease: A Story of four letters. Samuelson, T. (2019). 1ª Edição. Editora CRC.
- ❑ Managing Health in the Genomic Era. Henrich, V.C.; Orlando, L.A. And Shirts, B.H. (2020). 1ª Edição. Editora Elsevier e Academic Press.

BIBLIOGRAFIA:

- ❑ Biochemistry, Cell and Molecular Biology, and Genetics. Gromley Z and Gromley A. (2021), 1ª Edição. Editora Thieme
- ❑ Color Atlas of Genetics. Passarge, E. (2018). 5ª Edição. Editora Georg Thieme Verlag KG.

Principais Tópicos

1. A importância dos mecanismos epigenéticos ao longo do desenvolvimento.

2. Definição e tipos de mecanismos epigenéticos

3. Metilação do DNA e Doenças Associadas

3.1. Imprinting Genômico

3.2. Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman

3.3. Dissomia Uniparental ou não disjunção meiótica

3.4. Inativação do cromossomo X

Principais Tópicos

4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

4.1. Estrutura do nucleossomo

4.2. Empacotamento do DNA

4.3. Modificações epigenéticas de histonas

4.4. Doença associada com modificações epigenéticas



Os irmãos gêmeos monozigóticos astronautas, Scott e Mark Kelly. Scott passou quase um ano no espaço, a bordo da Estação Espacial Internacional (EEI) enquanto seu irmão gêmeo Mark permaneceu na Terra.

O estudo conduzido pela NASA revelou que ocorreram alterações epigenéticas significativas destacando a influência do ambiente espacial na expressão gênica.

A importância dos mecanismo epigenéticos

The Louisa Gross Horwitz Prize



COLUMBIA

COLUMBIA UNIVERSITY
IRVING MEDICAL CENTER

2016



Howard Cedar

**Metilação do
DNA**



Gary Felsenfeld

**Estrutura da
cromatina**



Aharon Razin

**Metilação do
DNA**

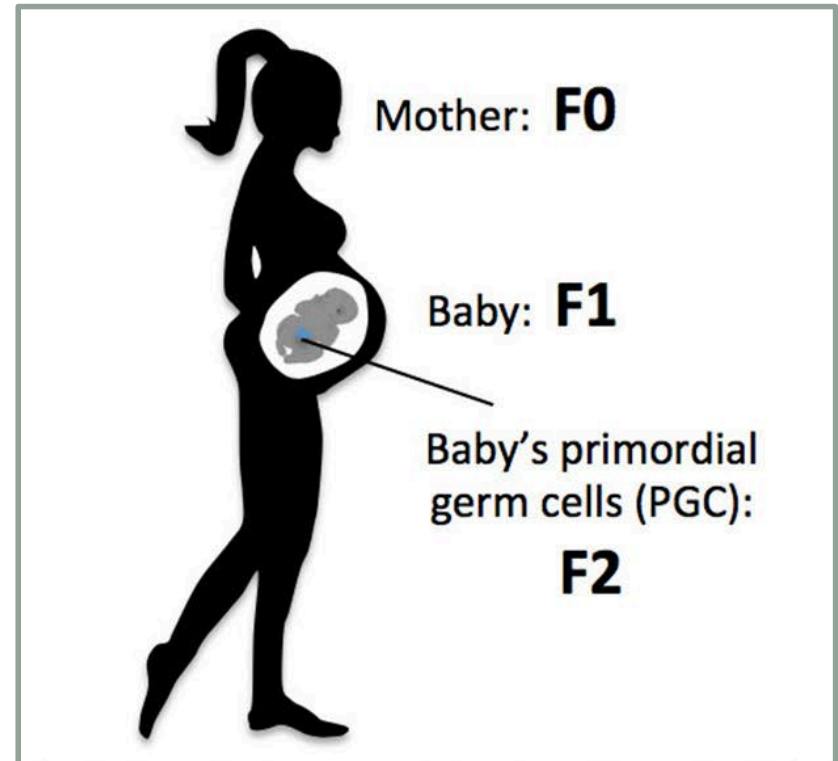
1. A importância da Epigenética

Epigenética e desenvolvimento embrionário, fetal e fase adulta

Uma exposição durante a gravidez pode afetar quantas gerações?

Três

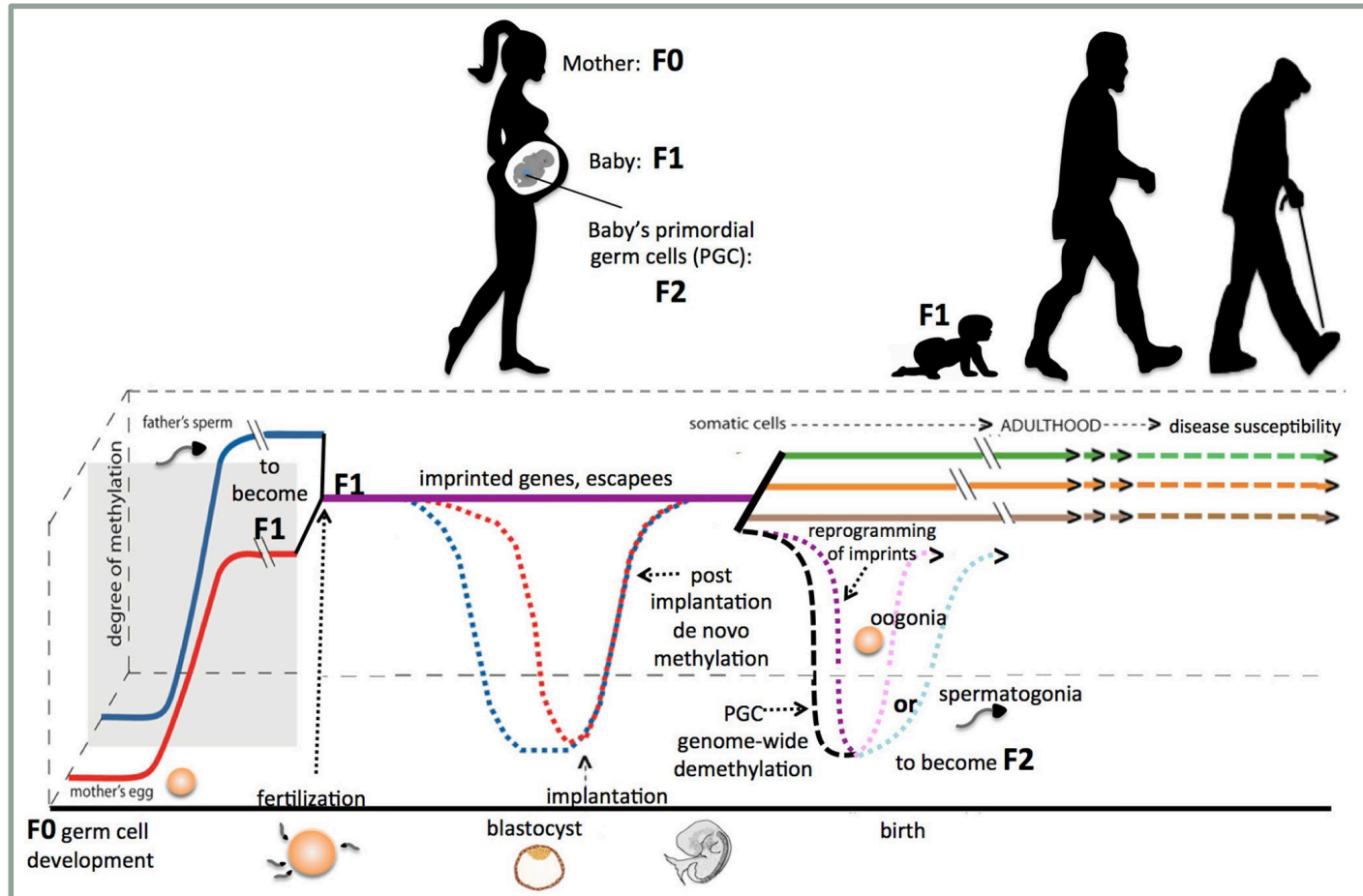
1. **F0**: a mãe.
2. **F1**: a criança em desenvolvimento
3. **F2**: os gametas do feto em desenvolvimento que sofrem reprogramação entre a semanas 4 e 12 da gestação.



1. A importância da Epigenética

Epigenética e desenvolvimento embrionário, fetal e fase adulta

Dinâmica da Metilação do DNA ao longo da vida.



1. A importância da Epigenética

Epigenética e desenvolvimento embrionário, fetal e fase adulta

A reprogramação epigenética após a fertilização ocorre em todo o genoma?

Não

Quais as regiões do genoma que não são submetidos a reprogramação epigenética após a fertilização?

Genes “imprinted”: expressão monoalélica dependendo da metilação ser paterna ou materna

Alguns elementos repetidos.

2. Definição

Mudanças que podem ser herdadas, isto é, mudanças epigenéticas, as quais são extremamente importantes para o controle transcricional.

É um tipo de herança que não resulta em mudança na sequência de nucleotídeos do DNA (mudanças genéticas), mas outros tipos de **modificações que afetam a estrutura da cromatina**, ou seja, **estão associadas com o controle da transcrição gênica.**

As mudanças genéticas estão presentes nas **células germinativas** e são **propagadas a todas as células filhas** durante o desenvolvimento.

2. Definição

As **mudanças epigenéticas** ocorrem também durante o desenvolvimento, e podem estabelecer um **padrão de expressão** e a **identidade de uma linhagem celular específica**.

De modo diferente das alterações genéticas que estão presentes na linhagem germinativa e todas as células do organismo apresentam aquela variante genética, **as mudanças epigenéticas** ocorrem ao longo de toda a vida, e, portanto um organismo tem **um genoma** que pode ser modificado diversas vezes e gerar diferentes **estados epigenômicos**.

Dois importantes tipos de mecanismos epigenéticos são: 1) **metilação do DNA** e 2) **modificação covalente das proteínas histonas**

2. Definição e Tipos de Mecanismos Epigenéticos

Compreender os mecanismos de modificações epigenéticas do genoma e como essas modificações são mantidas e transmitidas, bem como, sua relação com processos biológicos básicos é essencial para a compreensão da:

Reprodução, Desenvolvimento, Processos associados a Doenças e a Evolução das Adaptações ao Meio Ambiente, incluindo o Comportamento.

Pontos importantes investigados em epigenética: 1) como surgem os estados epigenômicos em células progenitoras e diferenciadas e 2) como esses estados epigenéticos são transmitidos na mitose e meiose, tornando esses traços herdáveis.

2. Definição e Tipos de Mecanismos Epigenéticos

Alterações no genoma controladas epigeneticamente estão associadas com doenças comuns como câncer e diabetes, entre outras.

Desta maneira, pesquisadores tem focado seus estudos em busca do desenvolvimento de **drogas** que podem **modificar ou reverter as mudanças epigenéticas** que fizeram com que células saudáveis passassem a apresentar fenótipos anormais.

Explorar esses mecanismos epigenéticos permitirá desenvolver terapias personalizadas para diferentes doenças comuns.

2. Definição e Tipos de Mecanismos Epigenéticos

1. Metilação do DNA e ilhas CpG

2. Modificação de histona e remodelagem da cromatina

A metilação do DNA e as modificações covalentes das histonas são importantes no controle transcricional e podem ser herdadas.

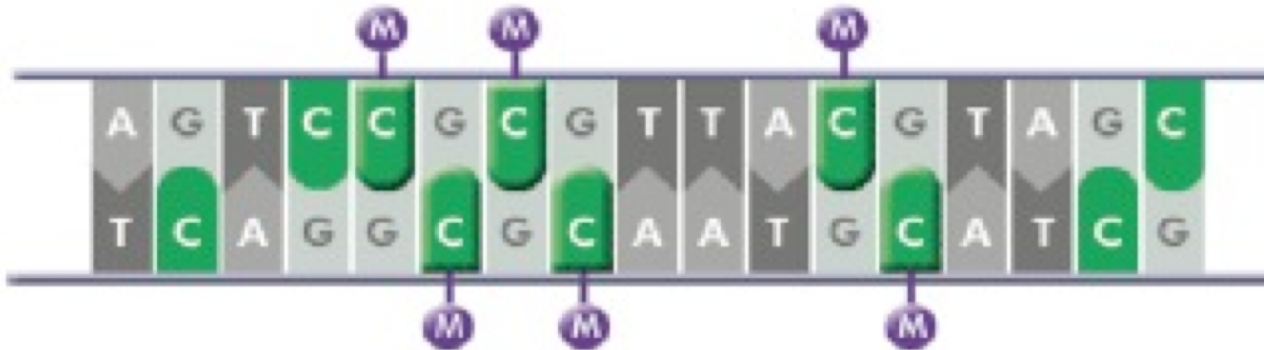


Epigenoma

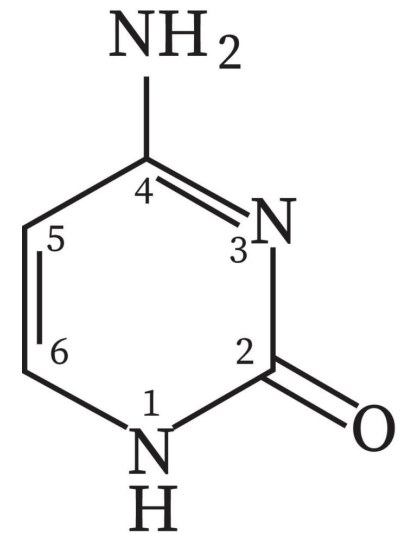
3. Metilação do DNA

Processo químico que adiciona o grupo metil à citosina do DNA (no carbono 5), resultando em 5-metilcitosina

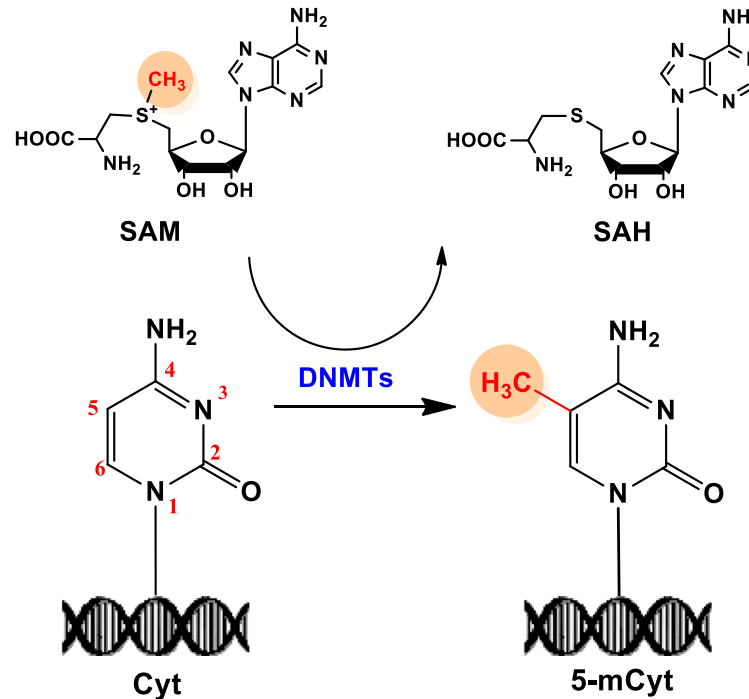
- ❑ Ocorre exclusivamente na base citosina adjacente a base guanina, uma combinação denominada CpG.



- ❑ Muitas ilhas CpG estão presentes em regiões promotoras e upstream.



3. Metilação do DNA

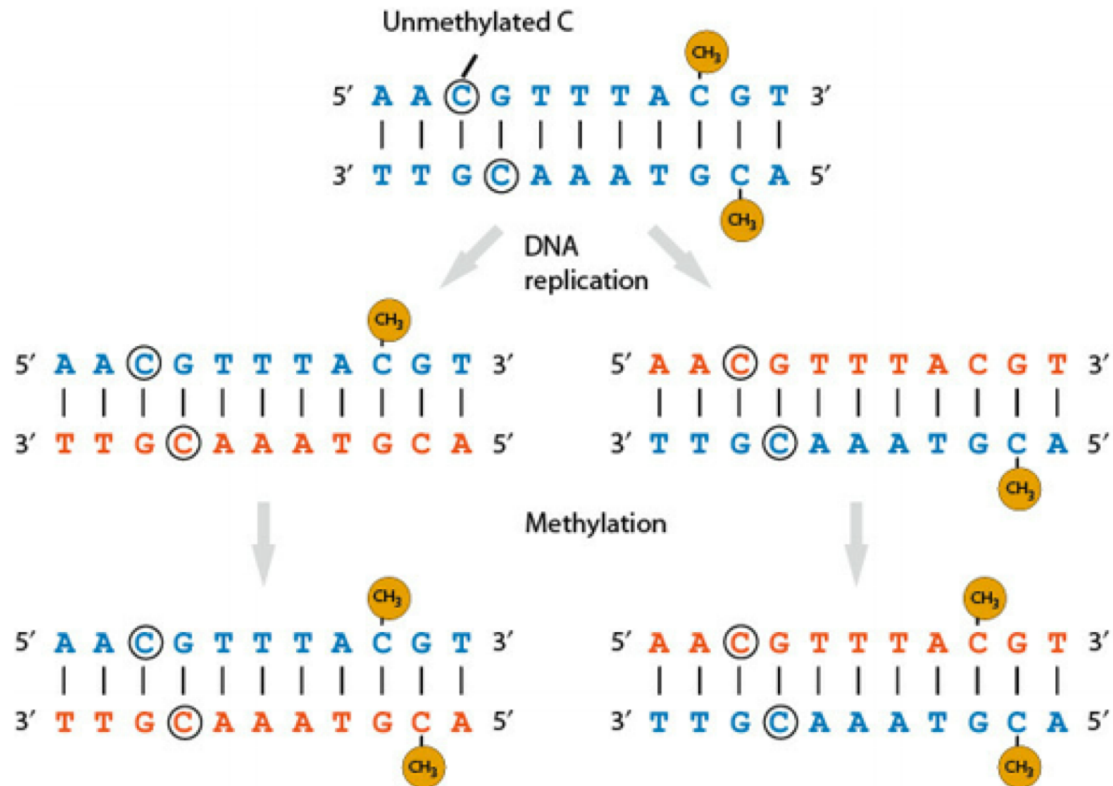


A enzima metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil de um doador para a citosina

- ❑ A % do resíduos C das ilhas CpG que são metiladas varia conforme a referência bibliográfica.

3. Metilação do DNA

O padrão de metilação dos sítios CpG são transmitidos para a célula filha por meio da **replicação do DNA**, durante a divisão celular.



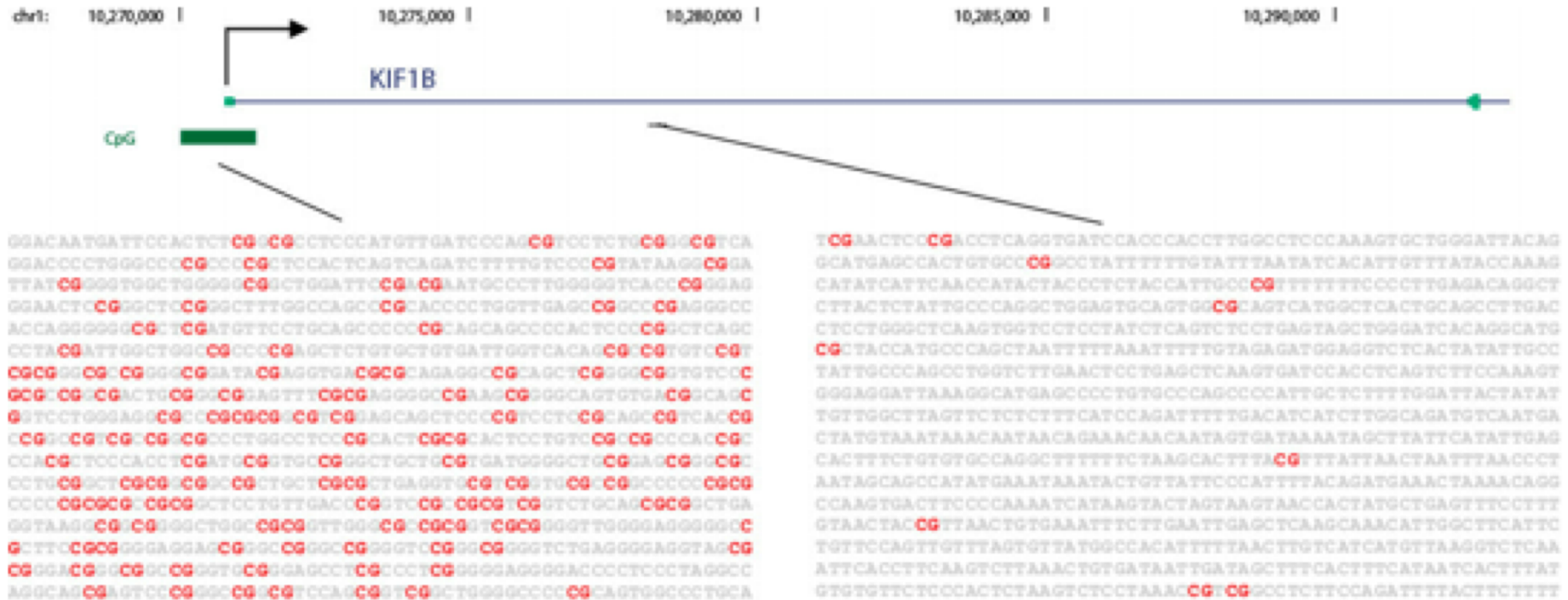
3. Metilação do DNA

Os resíduos de **C** metilados nos dinucleotídeos **CpG** são facilmente **desanimados para T** (mutação espontânea). Isto é, **CpG** tende a ser mutado para **TpG**. Por isso, dinucleotídeos CpG são marcadamente subrepresentado no genoma humano.

Entretanto, algumas regiões do genoma, em geral, **são ricas em CpG**, e conhecidas como **ilhas CpG**.

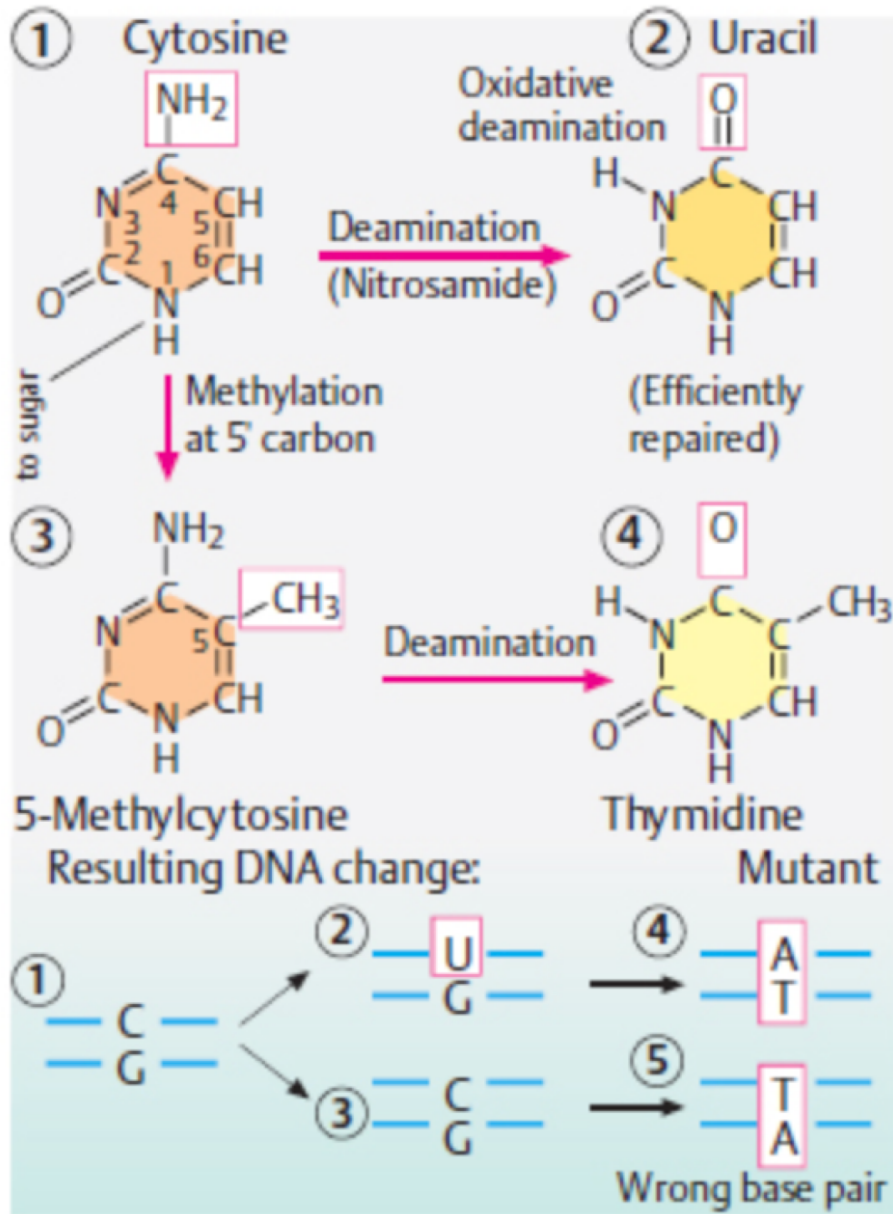
Ilhas CpG são definidas como regiões que: 1) comprimento > 200 nt; 2) tem conteúdo C+G > 50% e 3) tem uma taxa observada/esperada de CpG > 0,6.

3. Metilação do DNA



Ilhas CpG estão presentes nas **regiões promotoras** de muitos genes. As ilhas CpG tem um conteúdo de CG maior do que o resto do genoma. A figura acima mostra uma ilha CpG no gene KIF1B.

3. Metilação do DNA

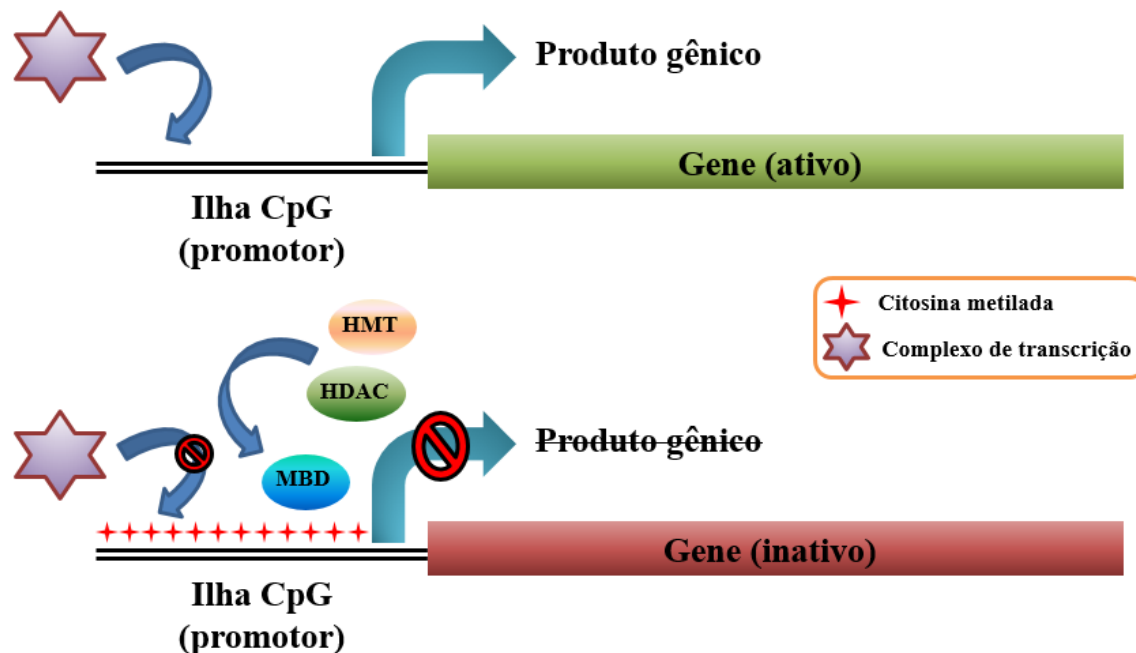


Desaminação espontânea da citosina ocorre há uma frequência de 100 bases/ célula/ dia. Como consequência, forma-se a base **uracila**. Normalmente, o **sistema de reparo BER** repara essa lesão

Desaminação da 5-metil citosina irá formar a **timina**. Essa mutação não é corrigida porque a timina é uma base normal do DNA

3. Metilação do DNA

O grupo metil bloqueia os fatores de transcrição e outras proteínas necessárias para formar o complexo transcrricional.



Cerca de 60-70% de todos os genes humanos tem ilhas CpG em suas regiões promotoras e são importantes para regulação transcrricional.

3. Metilação do DNA

Uma quantidade significativa de dinucleotídeos CpG metilados estão **localizados em regiões de DNA repetido**, que são as regiões de heterocromatina do genoma, incluindo os centrômeros.

Metilação dessas sequências contribuem para o silenciamento da transcrição e replicação de elementos transposons que constituem importante % do genoma.

As enzimas DNMT3A, DNMT3B adicionam grupos metil em novas posições em ambas fitas de DNA e a enzima DNMT3 protege o gameta masculino de atividade de transposon.

METILAÇÃO DO DNA

Câncer

Imprinting Genômico

Inativação do cromossomo X

3. Metilação do DNA

Metilação das ilhas CpG são componentes importantes no **desenvolvimento do câncer**. Em geral, nas células cancerígenas as **ilhas CpG são metiladas em uma extensão maior** que as células saudáveis, levando a **inibição da transcrição**.

Por outro lado, **ilhas CpG** podem estar **submetiladas na célula cancerígena** levando a **ativação da transcrição**.

Portanto, a **célula cancerígena** tem **metilação do DNA aberrante** e, como consequência, a **expressão de centenas de genes são alteradas por metilação**.

3. Metilação do DNA

Imprinting Genômico

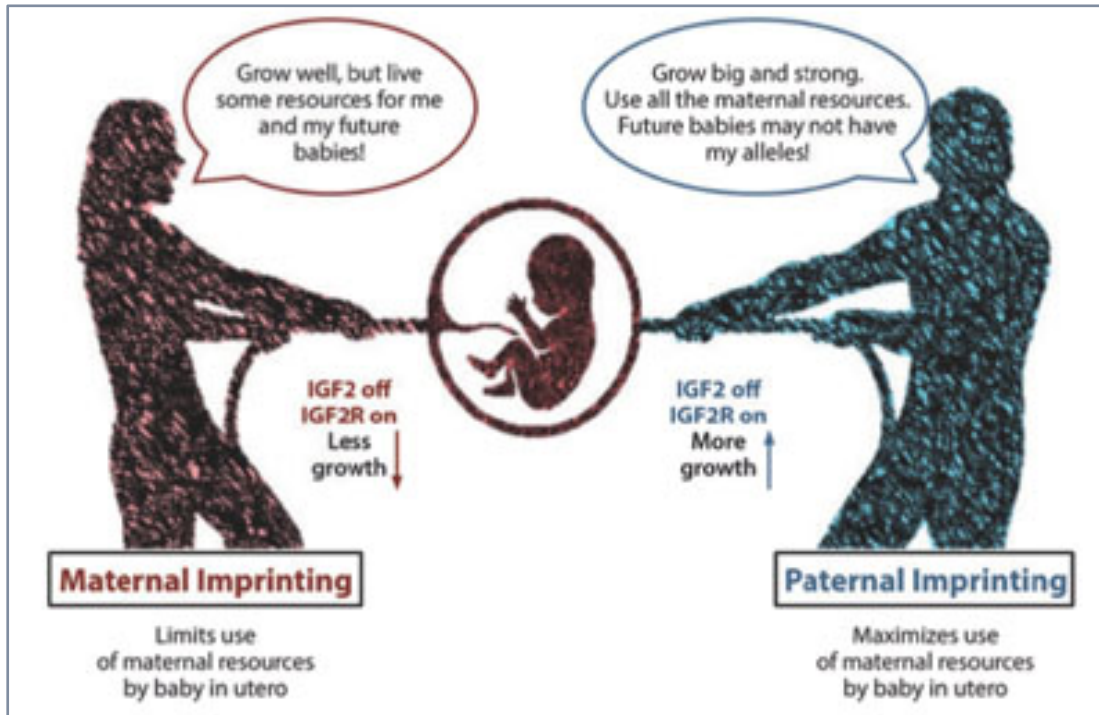
- O “*imprinting*” genômico cria uma condição de *hemizigose* e a expressão gênica depende se eles são herdados paternalmente ou maternalmente, o qual controla a metilação do DNA.

O **imprinting genômico** ocorre apenas em mamíferos placentários e alguns genomas de marsupiais.

O padrão de **imprinting genômico** é mantido durante a divisão celular.

Imprinting Genômico

Hipótese do conflito genético



Para equilibrar os **interesses competitivos** ocorre o **imprinting genômico** em algumas regiões do genoma. Cerca de **75 genes imprinted**

A **seleção natural** age de maneira diferente nos genomas paternos e maternos. Presumivelmente, ela favorece o **equilíbrio** entre **preservar as fontes maternas** e o **crescimento do feto**.

Imprinting Genômico

Falhas no imprinting resultam em doenças genéticas, por exemplo, **Síndrome de Prader-Willi** e **Síndrome de Angelman**.

Síndrome Prader-Willi (PWS)

Normalmente, genes da região 15q11-q13 são expressos apenas paternalmente

Na PWS não são formados os produtos funcionais do alelo paterno.

Mutação: 75%.

Dissomia uniparental materna (upd[15] mat): 25%.

Imprinting Genômico

Síndrome Prader-Willi (PWS)



(b)



Rápido ganho de peso e morte precoce, aos 30 anos de idade.

Imprinting Genômico

Síndrome de Angelman

O gene UBE3A, também da região 15q11-q13, é expresso apenas maternalmente

Na Síndrome de Angelman não são formados produtos funcionais de UBE3A.

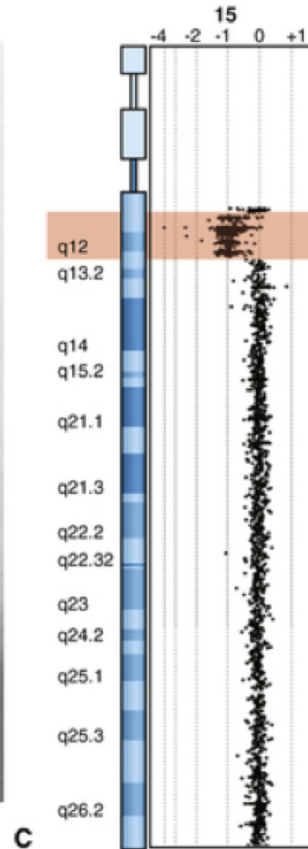
Deleção de novo: 70%

Dissomia uniparental paterna [upd(15)pat]: 7%

Mutações no centro de “imprinting”: 4%

Imprinting Genômico

Síndrome de Angelman



Retardo mental, ausência de fala e surtos descontrolados de risos

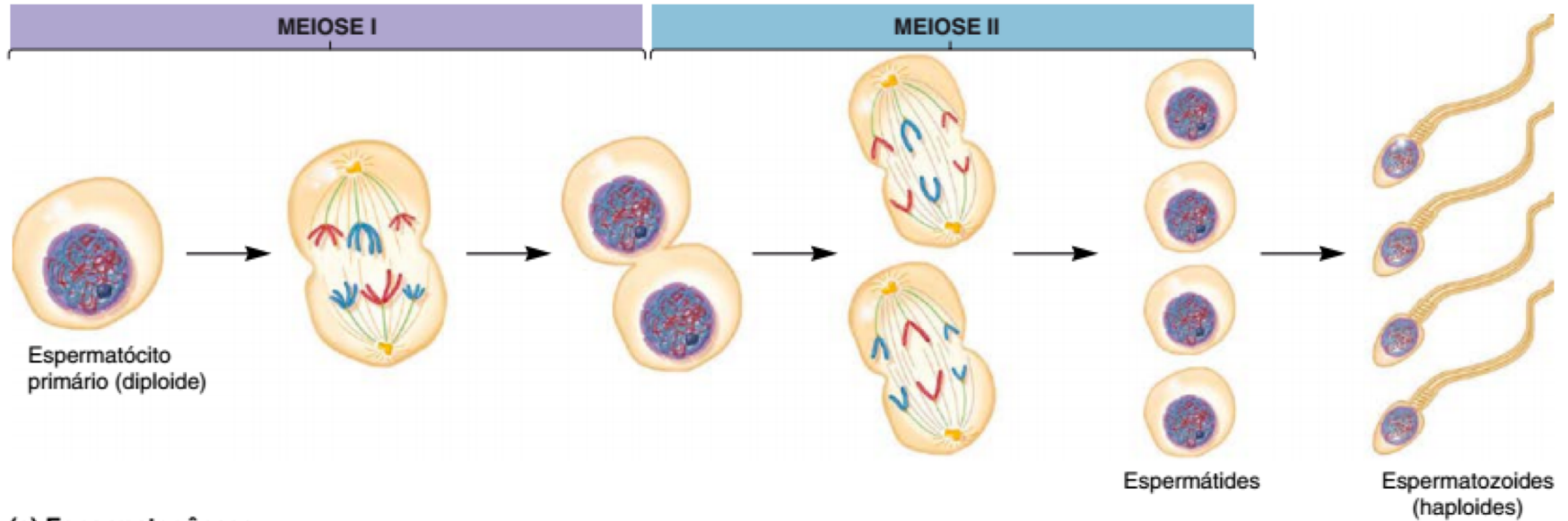
Dissomia Uniparental

O que é Dissomia Uniparental e qual é a outra nomenclatura para esse evento?

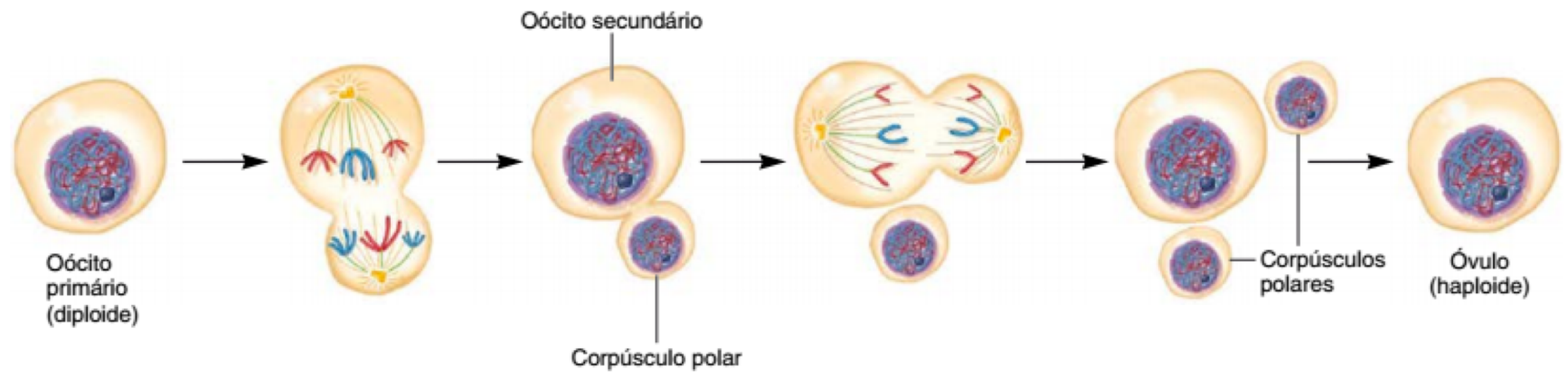
Também denominada não disjunção meiótica, é um processo em que durante a **meiose (I ou II)** os cromossomos não são distribuídos igualmente para os gametas.

- Como consequência ambas os **alelos de um determinado gene** originam-se do **mesmo genitor**.

Recapitulando meiose

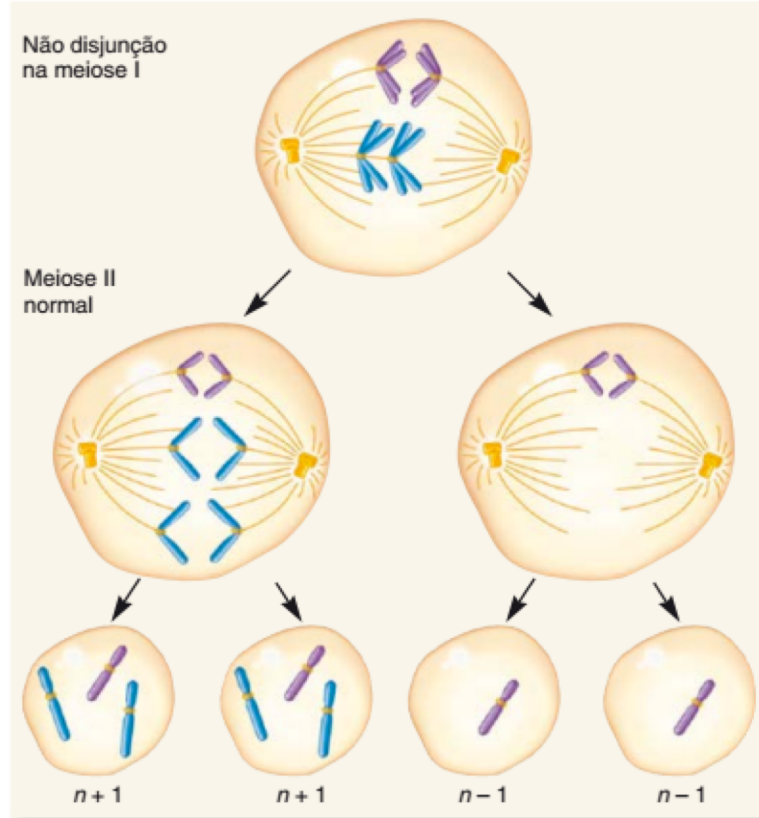


(a) Espermatogênese

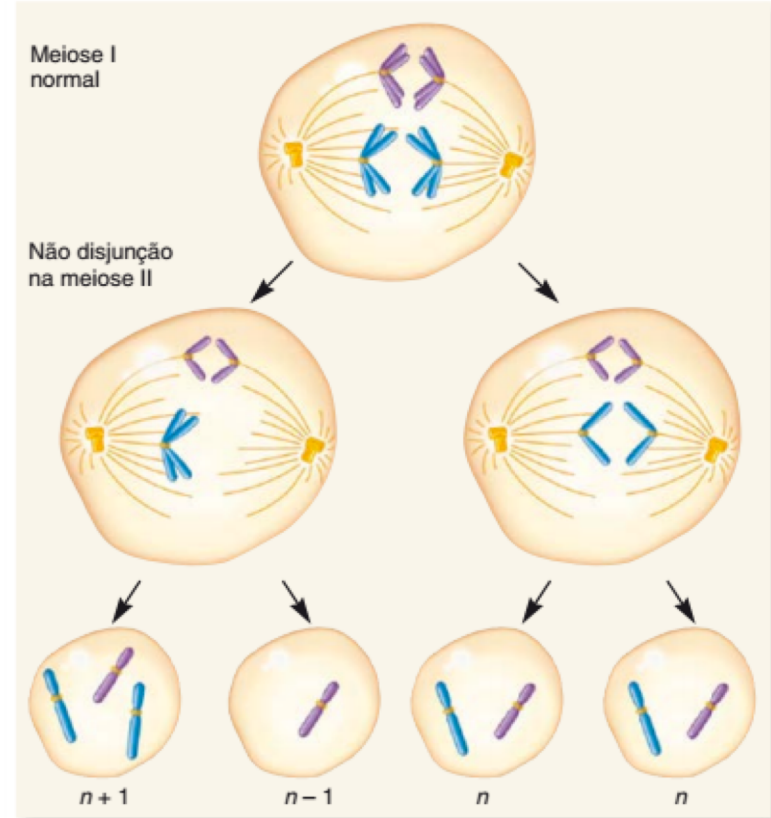


(b) Oogênese

Não disjunção meiótica



(a) Não disjunção na meiose I



(b) Não disjunção na meiose II

Há um **erro na segregação dos cromossomos** durante a **meiose** levando a uma **distribuição desigual dos cromossomos** entre os **gametas**

Não disjunção meiótica ou dissomia uniparental

Qual a consequência da **dissomia uniparental** ou **não disjunção meiótica**?

É formado um gameta com um cromossomo extra e após a fertilização resulta em um zigoto trissômico.

Como é formado o indivíduo, por exemplo, com dois cromossomos 15 se o zigoto é trissômico?

Ocorre o “resgate” da trissomia, isto é, a dissomia é restaurada

Não disjunção meiótica ou dissomia uniparental

Quais os **eventos celulares** que resultam na dissomia, após a formação do **zigoto com trissomia**?

Nas **primeiras mitoses zigóticas** um dos cromossomos é **perdido**.

Em 1/3 das vezes, **os dois cromossomos recuperados** são do mesmo genitor, o que é denominado **dissomia uniparental (UPD)**

Dissomia Uniparental: Descoberta - 1988



Uniparental Disomy as a Mechanism for Human Genetic Disease

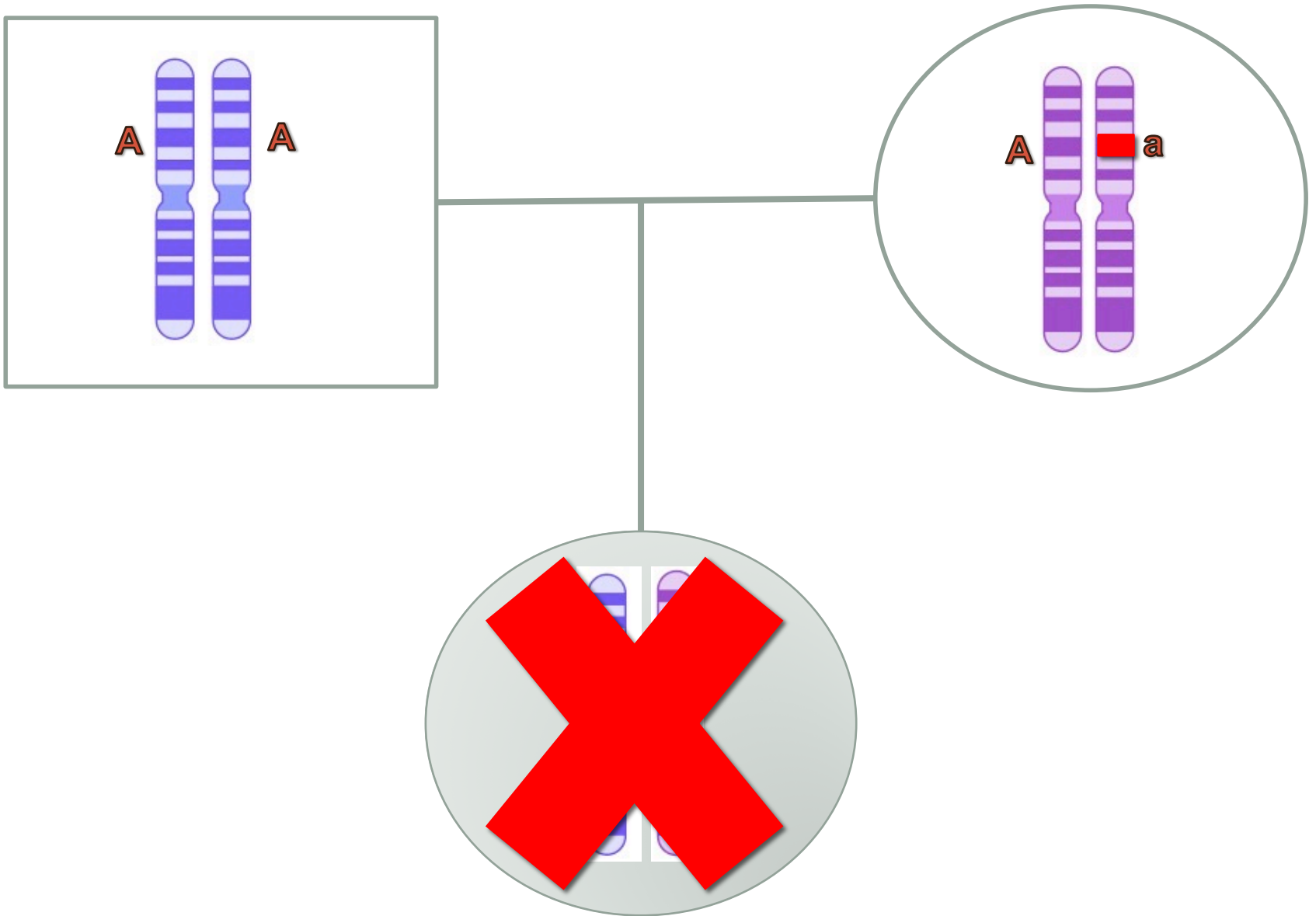
J. Edward Spence,[†] Ronald G. Perciaccante,[§] Gillian M. Greig,^{||} Huntington F. Willard,^{||} David H. Ledbetter,[†] J. Fielding Hejtmancik,[†] Marilyn S. Pollack,[‡] William E. O'Brien,^{*†} and Arthur L. Beaudet^{*†}

Am. J. Hum. Genet. 42:217–226, 1988

Arthur L. Beaudet
(1967 – MD Yale)
Genética Humana

Estudo de caso clínico de uma **criança com doença autossômica recessiva** em que apenas um dos pais era heterozigoto. A mãe era homozigota com os alelos normais (não mutados)

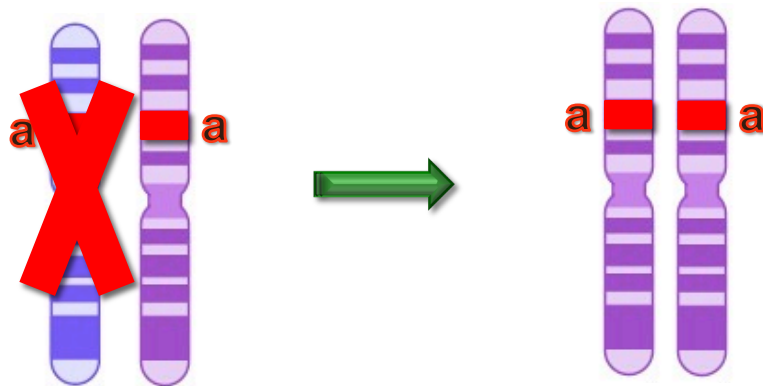
Dissomia Uniparental: Descoberta - 1988



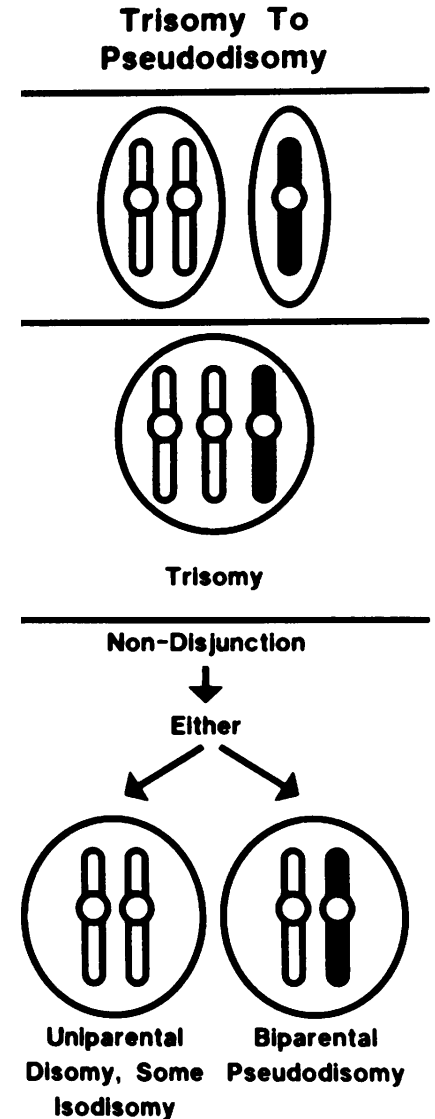
Dissomia Uniparental: Descoberta - 1988

Quais as possibilidades?

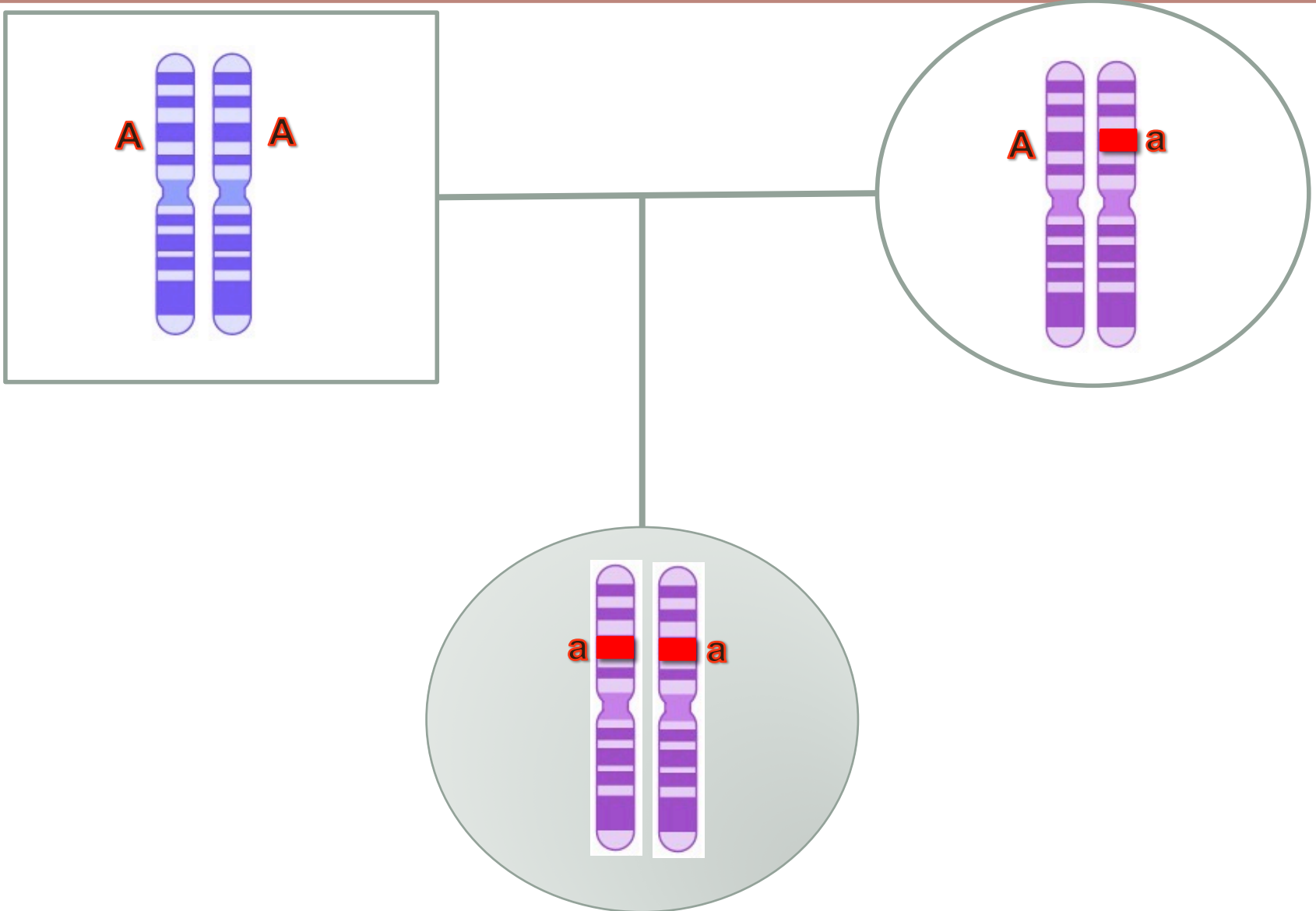
- ~~1. Outra paternidade~~
- ~~2. Mutação de novo no cromossomo 7 paterno~~
- ~~3. Mosaicismo~~



Falha na transmissão paterna



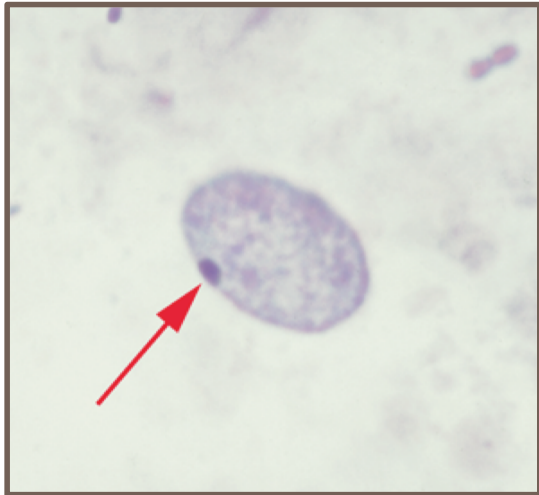
Dissomia Uniparental: Descoberta – 1988 – Fibrose Cística [CFTR]



3. Metilação do DNA

Inativação do cromossomo X

- Como mecanismo de **compensação de dose** na **célula feminina**, um dos **cromossomos X** é **inativado** por **mecanismos epigenéticos** e o mesmo é denominado **corpúsculo de Barr** ou **corpúsculo de cromatina sexual**.



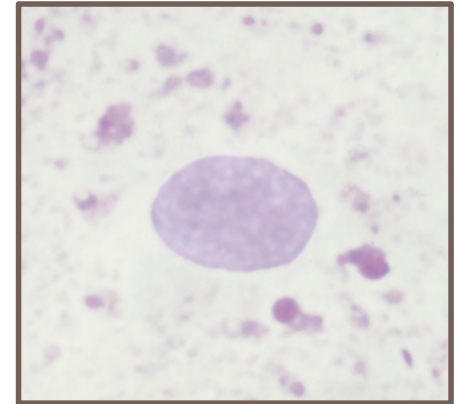
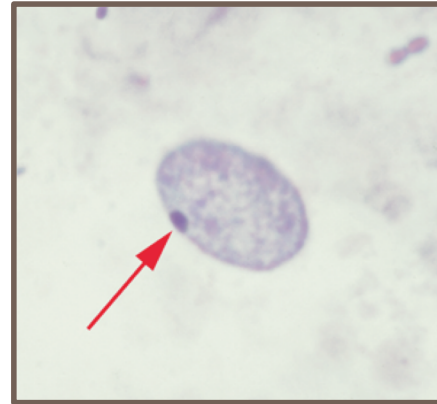
Corpúsculo de Barr: é um mecanismo epigenético em mamíferos que compensa a **disparidade de dosagem do cromossomo X**.

Inativação do cromossomo X – A compensação de dose – Corpúsculo de Barr

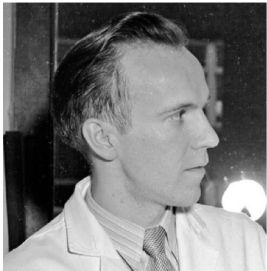
1948



Murray Barr
(1908 – 1995)



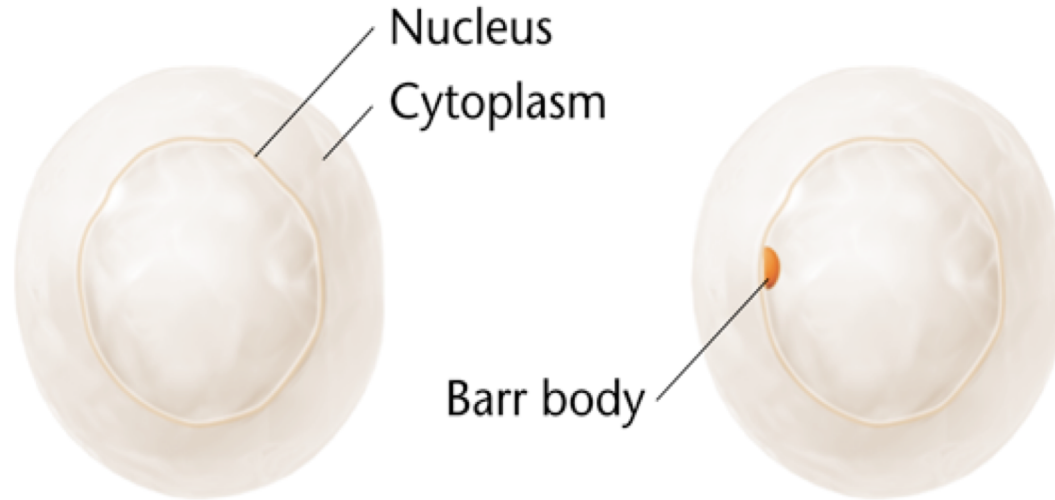
Célula epitelial da bochecha de **uma mulher** mostrando a **presença de corpúsculo de Barr**



Ewart G.
Bertran
(1923)

Célula epitelial da bochecha de **um homem** mostrando a **ausência de corpúsculo de Barr**

Inativação do cromossomo X – A compensação de dose – Corpúsculo de Barr



46, XY

46, XX

45, X

**Síndrome
de Turner**

47, XXY

**Síndrome de
Klinefelter**

Inativação do cromossomo X – A hipótese de Lyon (Mary Lyon, 1961).



Mary Lyon
(1925 – 2014)

A inativação de cromossomos X ocorre aleatoriamente nas células somáticas, em um momento precoce do desenvolvimento embrionário, provavelmente no estágio de **blastocisto**.

Uma vez ocorrida a **inativação**, todas as **células descendentes** têm o mesmo **cromossomo X inativado** que a sua célula genitora inicial.

Isso resulta em uma forma de **mosaico celular**, onde diferentes células do corpo expressam **diferentes cópias de genes ligados ao cromossomo X**.

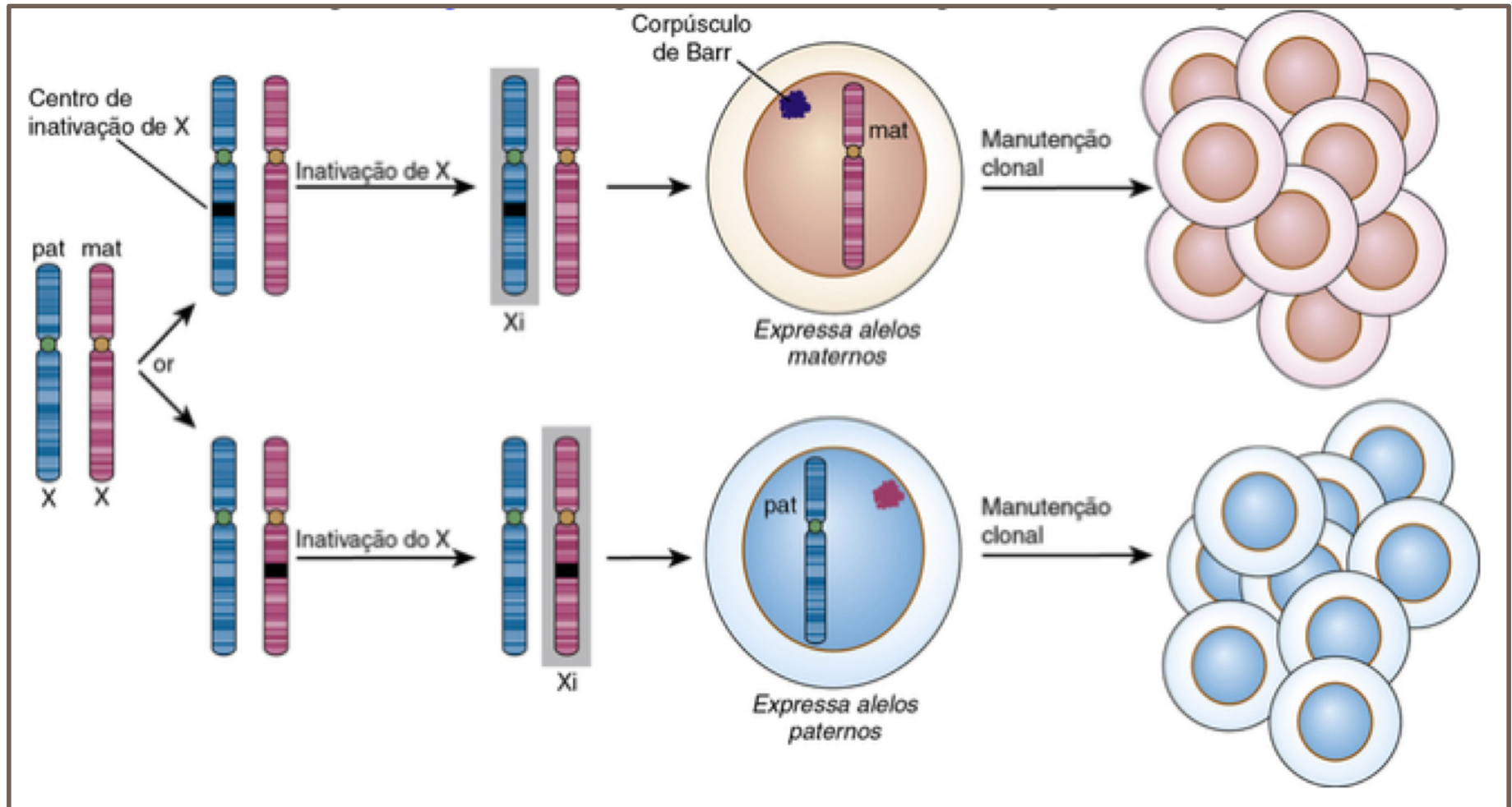
Inativação do cromossomo X – A hipótese de Lyon (Mary Lyon, 1961).

O que é o **mosaico** em relação aos **genes ligados ao cromossomo X**?

Em **algumas regiões do corpo** serão expressos, por exemplo, somente os **alelos no X herdados de origem materna** e em **outras regiões** somente os **alelos de origem paterna**.

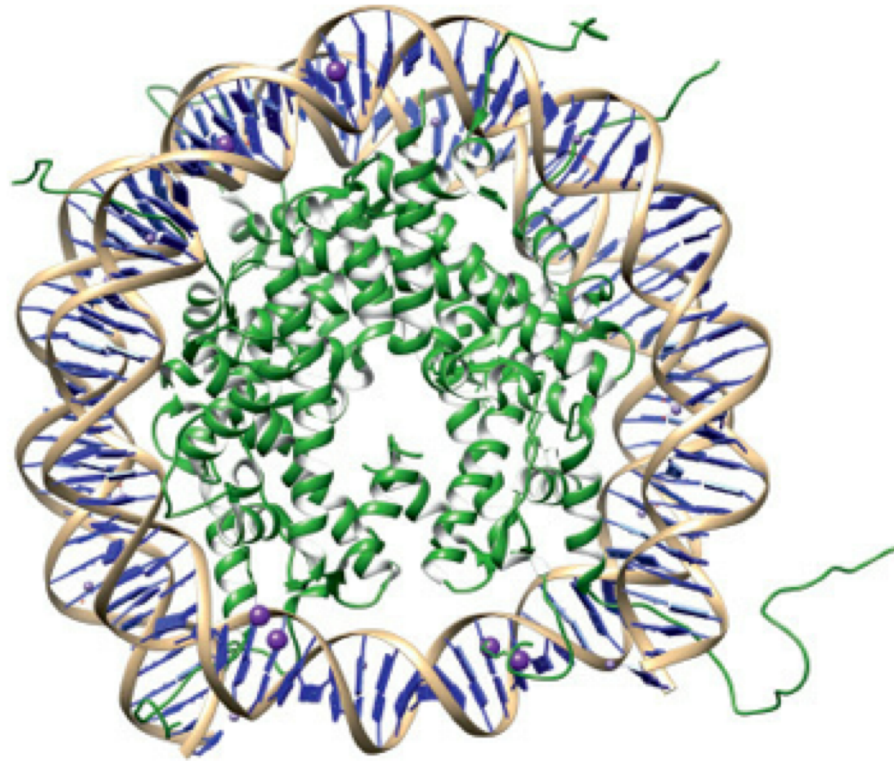
Convém ainda ressaltar que o **cromossomo X** que forma o **corpúsculo de Barr** não é **100% inativado**. Cerca de **15%** de seus genes escapam a inativação.

Inativação do cromossomo X – A hipótese de Lyon (Mary Lyon, 1961).



4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

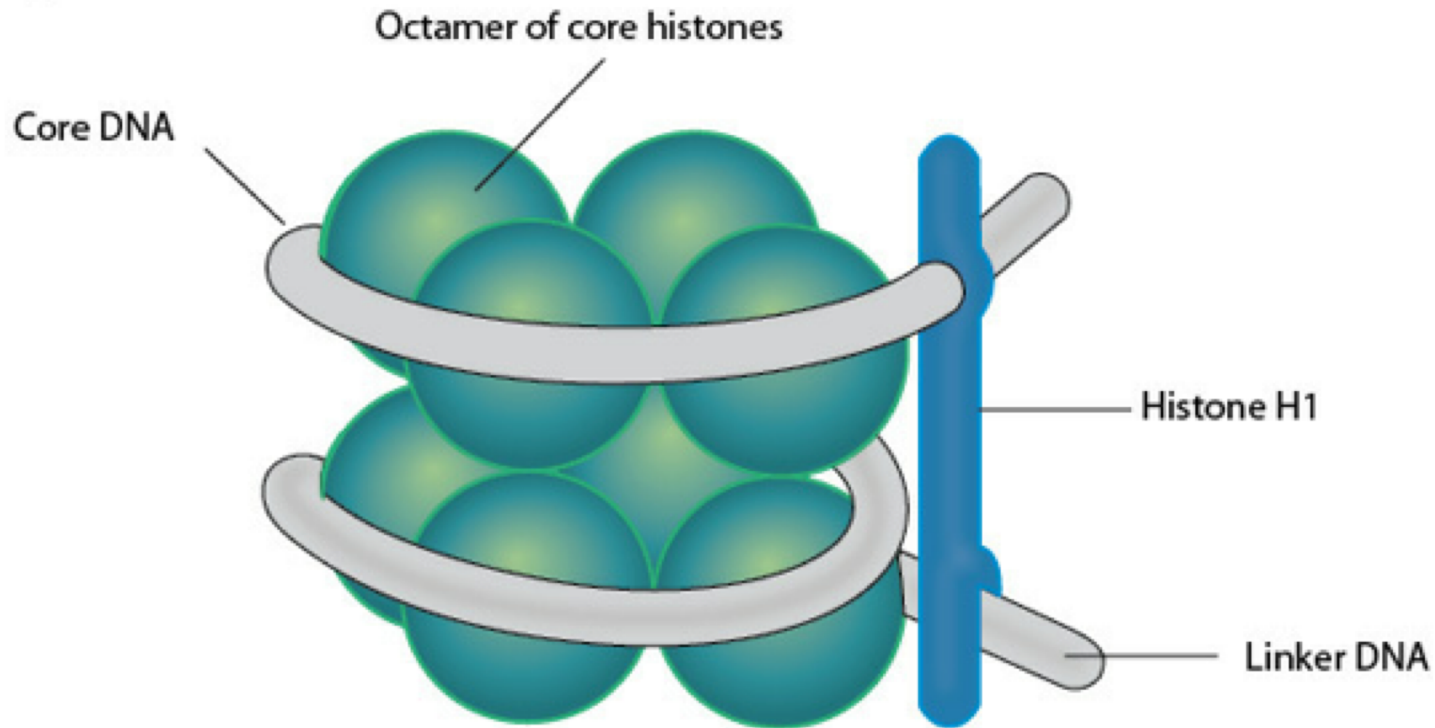
Estrutura do nucleossomo



Em nossas células o **DNA** é **empacotado** com o auxílio das **proteínas histonas** formando o **nucleossomo**.

4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

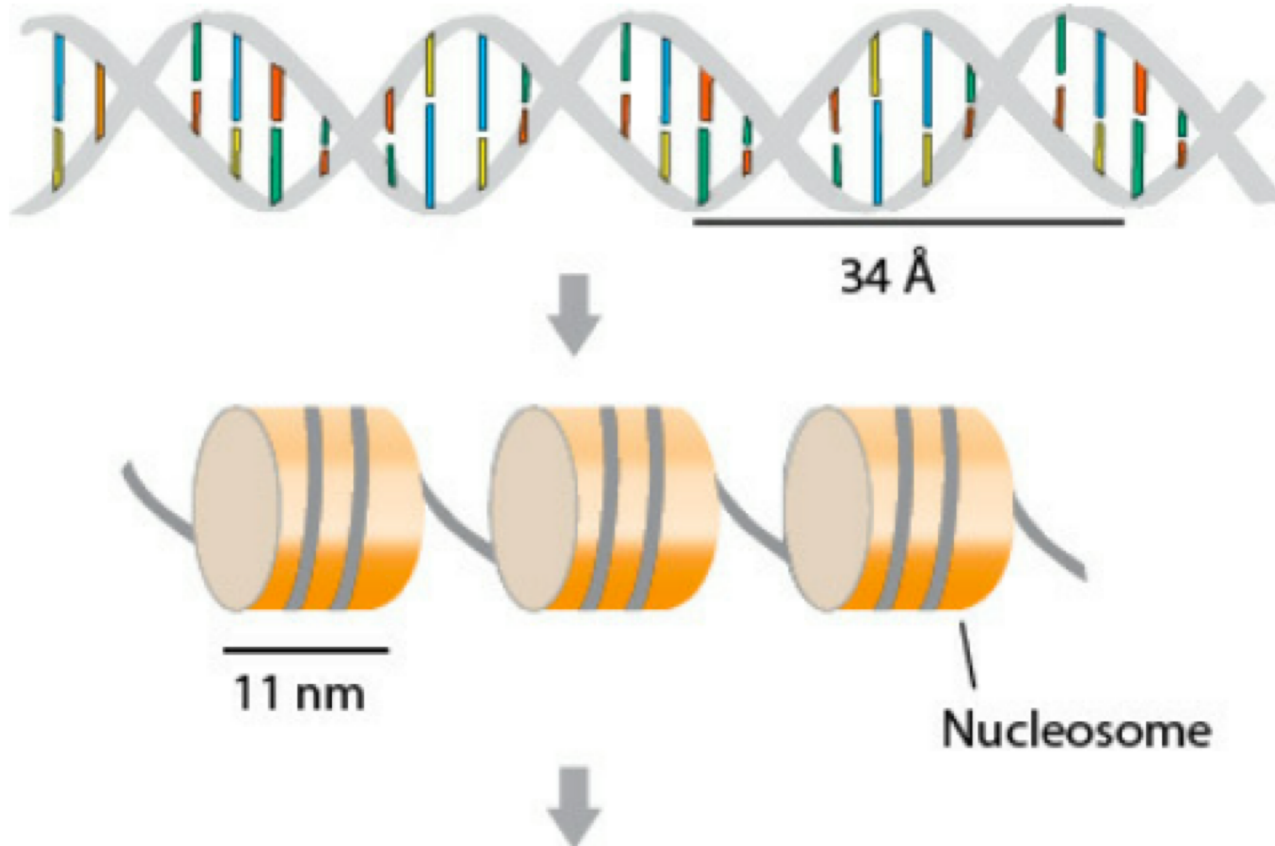
Estrutura do nucleossomo



O DNA é enrolado com um core de proteínas histonas denominadas H2A, H3B, H3 e H4. A histone H1 é o sítio onde o DNA entra e sai do nucleossomo.

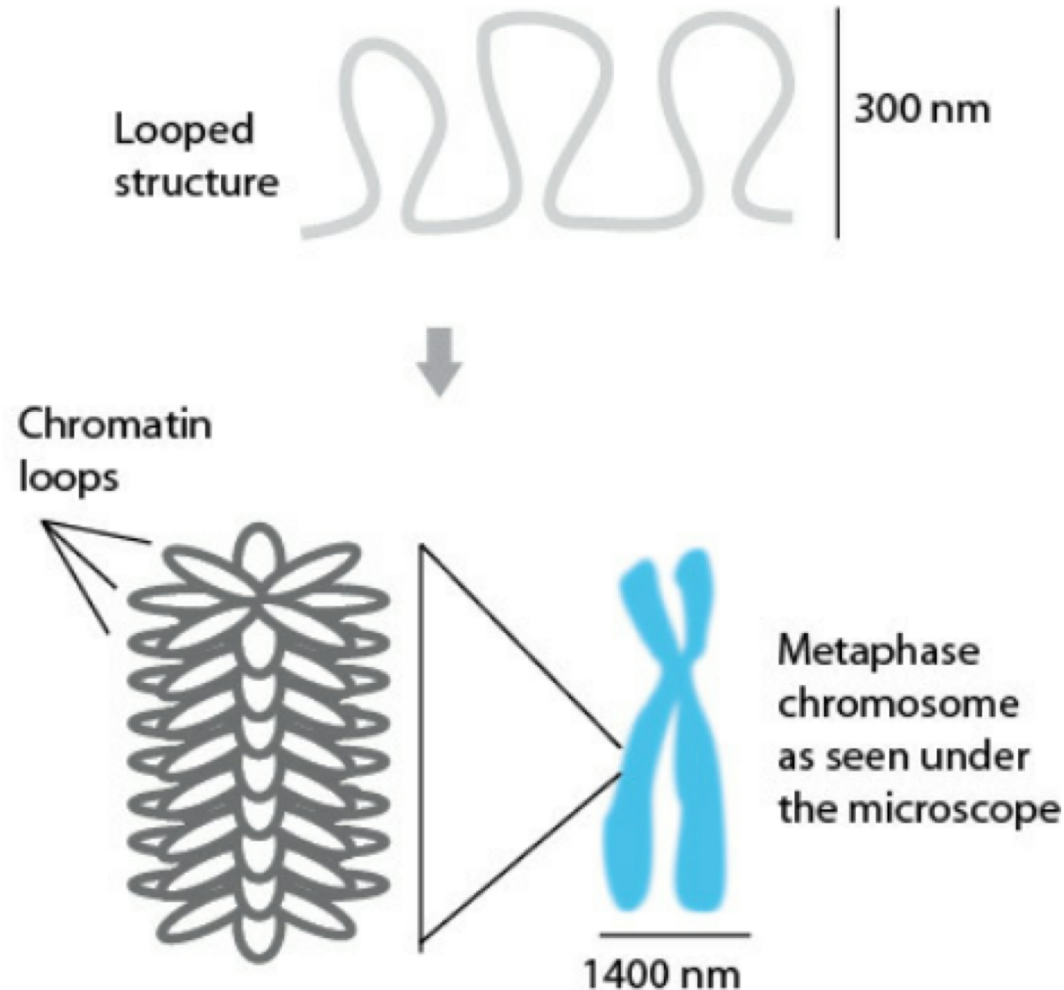
4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Empacotamento do DNA



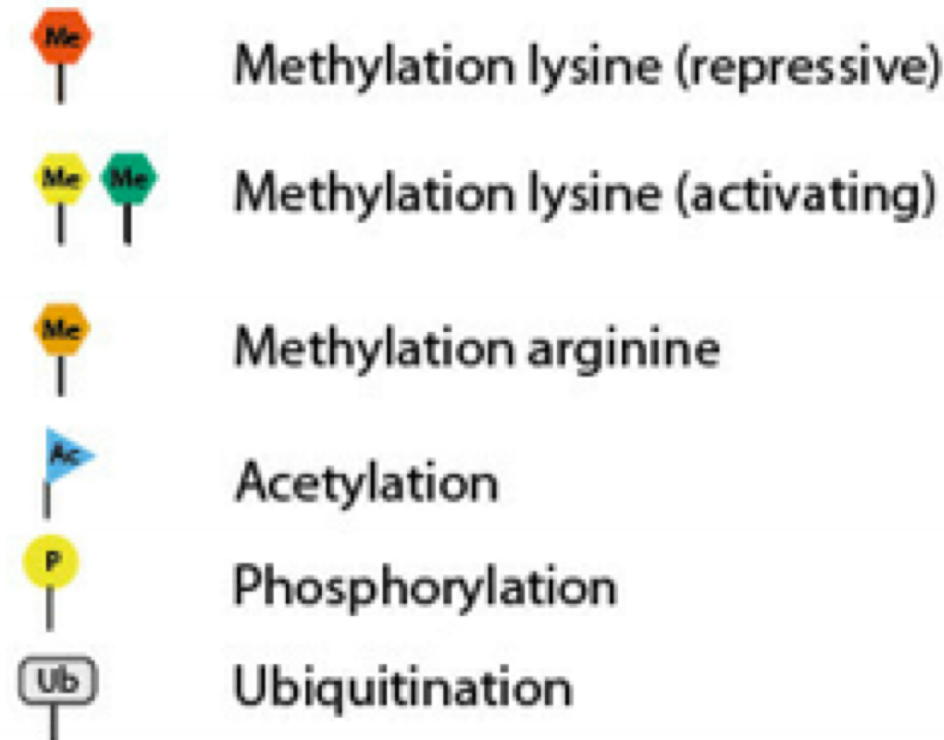
4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Empacotamento do DNA



4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Modificações epigenéticas de histonas



4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

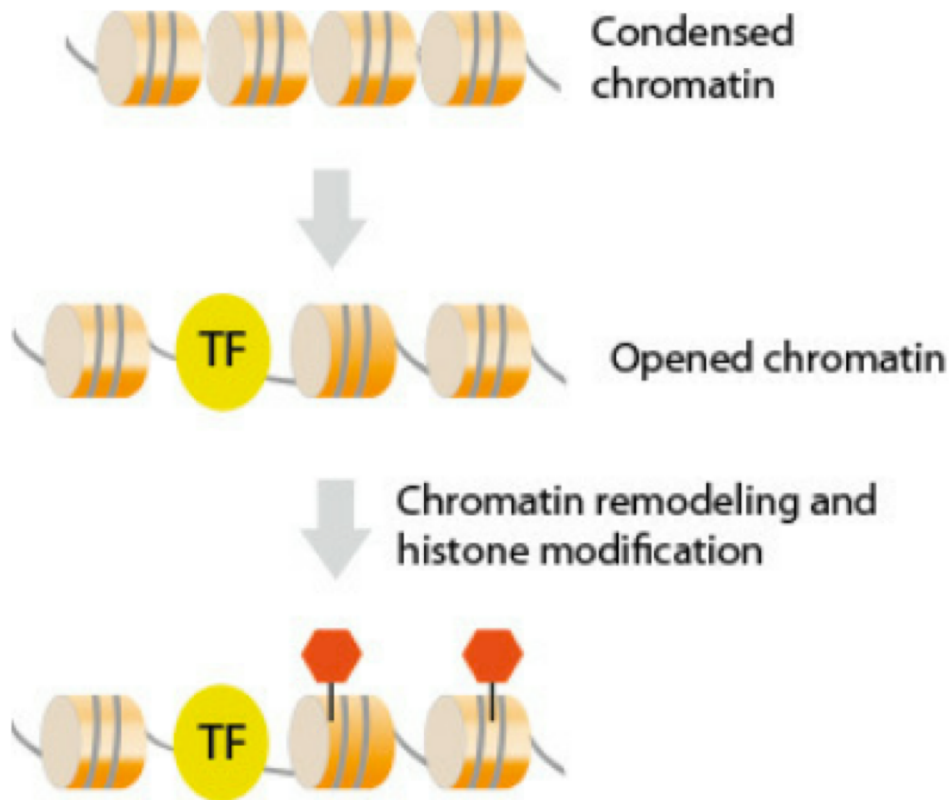
Modificações epigenéticas de histonas



A maior parte das modificações das histonas estão associadas com ativação transcricional, entretanto, metilação de três lisinas (H3K9, H3K27 e H4K20) estão associadas com modificações repressivas.

4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

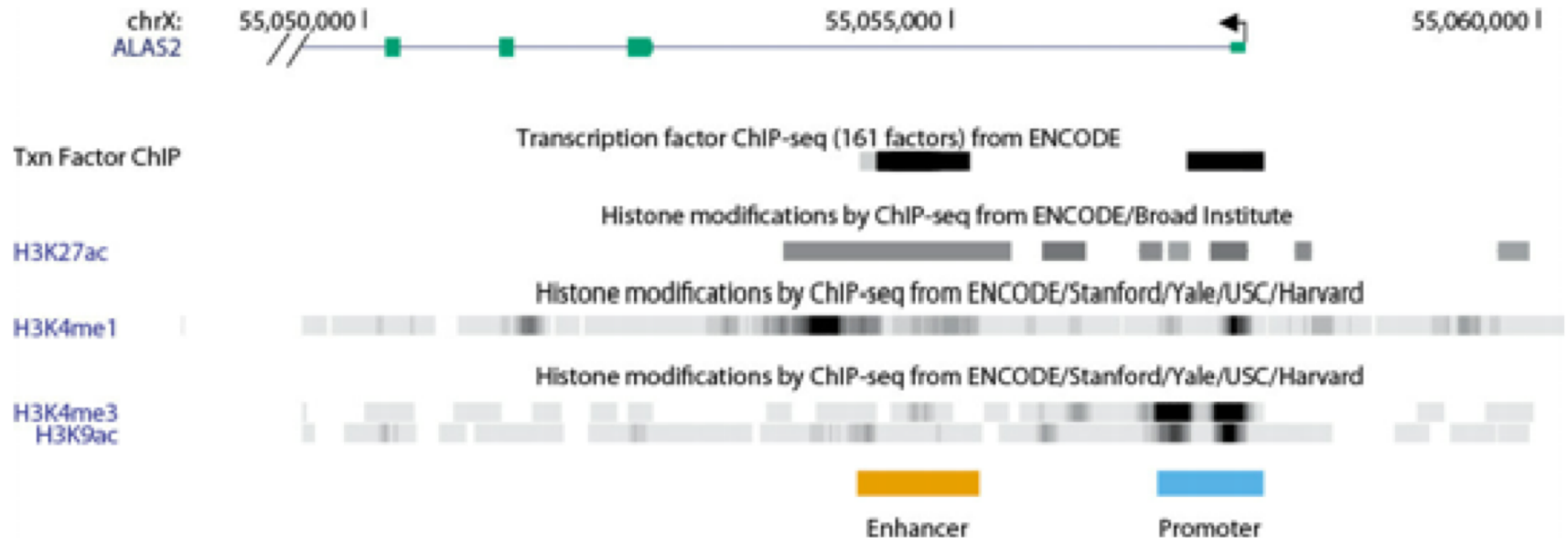
Modificações epigenéticas de histonas



Os fatores de transcrição desempenham importante papel em iniciar mudanças epigenéticas, e portanto, mutações em sítios ligantes de fator de transcrição podem causar a regulação epigenética aberrante.

4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Epigenoma



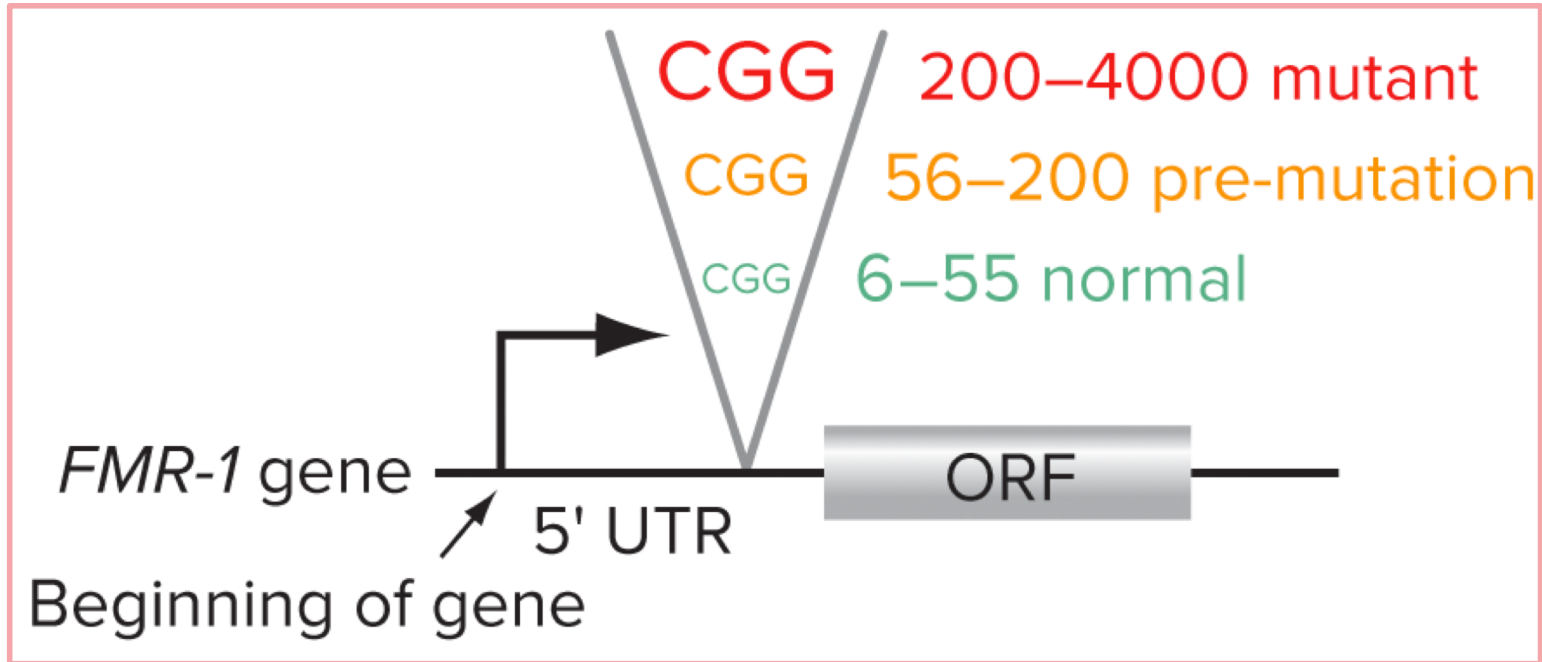
Marcas de histonas em regiões promotoras e enhancers. A estrutura do gene ALAS2 incluindo 4 exons e o estado da cromatina nas regiões de promotor e enhancer.

MODIFICAÇÃO EPIGENÉTICA DAS HISTONAS

Síndrome do X-frágil

4. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Síndrome do X-frágil (OMIM 300624)



A síndrome do X-fragil é caracterizada pela expansão do trinucleotídeo CGG na região 5'UTR do gene *FMR-1*. O alelo normal tem de 6 – 56 repetições, enquanto no alelo mutante esse número é > 200 repetições e como consequência não há a síntese da proteína *FMR-1*

3. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Síndrome do X-frágil (OMIM 300624)

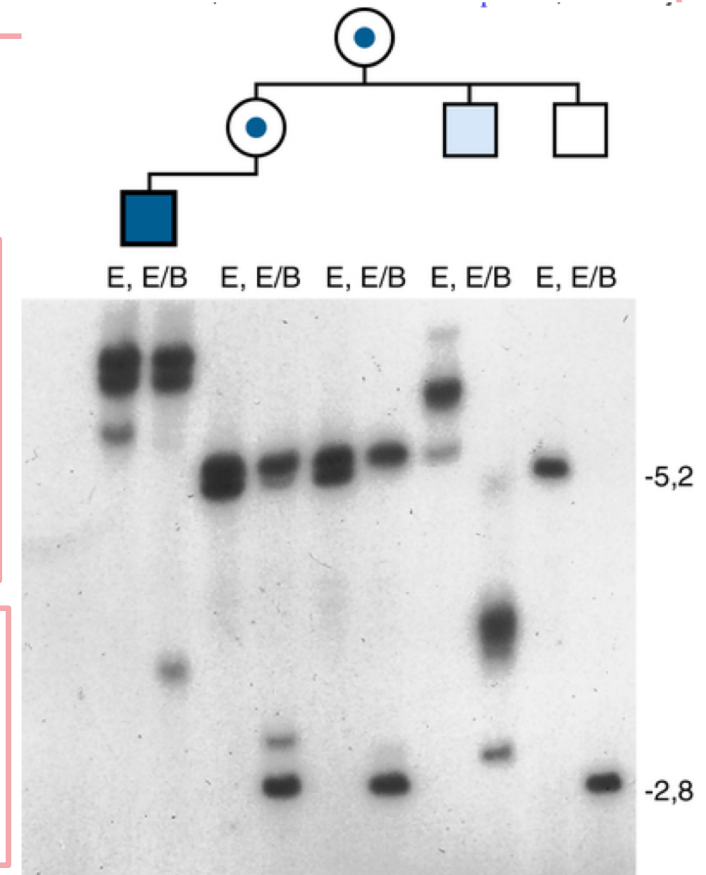
É a forma hereditária mais comum de deficiência intelectual de grau moderado. O número de repetições pode aumentar de geração para geração.



Em homens a incidência é 1: 3.000 – 4.000 nascidos

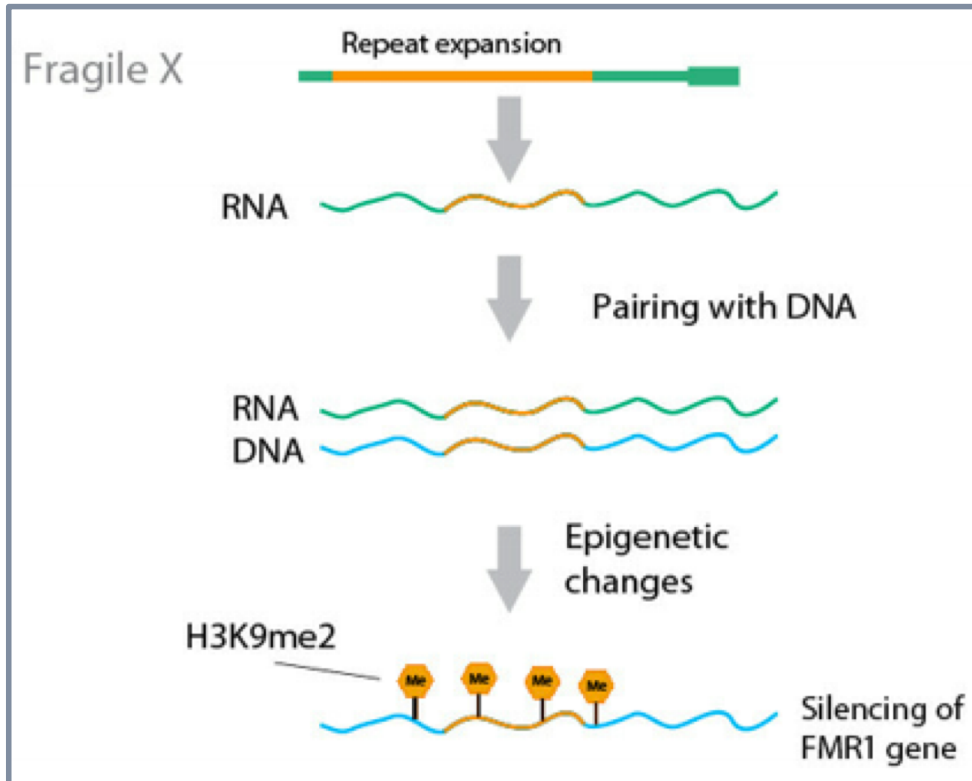
Amostras de DNA de uma família digeridas com duas enzimas de restrição E (EcoRI) e B (BssH2)

No tio não afetado, o alelo selvagem digerido com E resulta em uma banda de 5,2 e E + B de 2,8 kb. No probando o fragmento de E é > 5,2 kb



3. Mudanças reversíveis na estrutura da cromatina

Síndrome do X-frágil (OMIM 300624)



Na síndrome do X-fragil, a expansão do trinucleotídeo CGG resulta em repressão da transcrição. Um provável mecanismo para a repressão é que a **região repetida do mRNA** forma uma **molécula híbrida RNA-DNA por complementariedade**.

Como consequência, ocorrem marcas na histona H3K9Me₂ que resulta no silenciamento gênico. Portanto, a **síndrome do X-frágil é também uma doença epigenética**.

QUESTÕES DE APRENDIZAGEM
