

## Epigenética

### Como a dieta do seu avô pode afetar a sua saúde

A comunidade Överkalix, no norte da Suécia, localiza-se acima do Círculo Ártico, com um clima inóspito caracterizado por longos invernos frios e períodos curtos de verão. A comunidade sempre foi pequena; hoje em dia existem menos de 4.000 residentes. No século 19 e no início século 20, existiam poucas estradas na região, e o transporte durante o inverno era limitado pelo gelo e pela neve. Por causa da localização no extremo norte, era um desafio cultivar plantações. Quando as plantações morriam, a distância da região limitava a importação de alimento e as pessoas morriam de fome. As plantações fracassavam com frequência durante todo o século 19 (p. ex., em 1800, 1812, 1821 e 1829) e o período de 1831 a 1836 foi marcado por um fracasso total das plantações e extrema provação. Entretanto, em razão da imprevisibilidade do clima, com frequência anos de colheita bem-sucedida e fartura de alimentos ocorreram após esses anos difíceis.

Nos anos de 1980, os pesquisadores se interessaram pelos efeitos da fartura e da escassez sobre a saúde duradoura das pessoas no norte da Suécia. Eles queriam determinar se os períodos de escassez de alimento que as pessoas passavam na infância afetavam a saúde dos seus descendentes. Após examinar cuidadosamente a estatística de colheitas, preços de grãos e outros fatos históricos, os pesquisadores conseguiram determinar a disponibilidade de alimentos na durante o século 19 e início do século 20. Eles também examinaram os prontuários dos habitantes, graças à disponibilidade de registros médicos centralizados que a Suécia mantém sobre todos seus cidadãos.

Os pesquisadores se concentraram na saúde de três grupos de pessoas, nascidas em 1890, 1905 e 1920. Examinaram o tempo de vida desses indivíduos e examinaram seu risco de morrer de doença cardiovascular e diabetes melito. Depois, rastrearam seus pais e avós, determinaram a disponibilidade de alimento quando eram crianças e procuraram por correlações entre a dieta dos pais e avós e a saúde de seus descendentes.

O que os pesquisadores encontraram foi impressionante. Os indivíduos cujos pais e avós haviam sido expostos a períodos de falta de alimentos quando crianças viveram mais do que os indivíduos cujos ancestrais haviam sido expostos a excesso de alimentos. Por outro lado, as pessoas cujos ancestrais cresceram durante os períodos de fartura de alimentos morreram mais cedo e eram mais predispostas a doenças cardiovasculares e diabetes melito. Por exemplo, se um avô paterno teve acesso a alimentos em excesso quando criança, a probabilidade foi quatro vezes maior de que os netos morressem de diabetes melito do que os netos de pessoas que não foram expostas a alimentos em excesso durante a infância.

Como a quantidade de alimento disponível para uma pessoa durante a infância pode afetar a saúde de seus filhos e netos que vivem 20 a 60 anos depois? Um dos princípios da genética moderna é que nossos genes são estáveis (exceto por raras mutações) e não são alterados pelo ambiente, então como a dieta pode influenciar os traços dos descendentes por duas gerações? O efeito da dieta do avô sobre as gerações seguintes foi especialmente incrível. As mães fornecem o citoplasma do óvulo a seus descendentes e um ambiente uterino, assim como os genes; mas os espermatozoides de seus pais contribuem apenas com um conjunto de genes paternos a seus descendentes.

Os pesquisadores propuseram que o efeito observado foi consequente à epigenética: mudanças na cromatina e no DNA que são hereditárias, mas não envolvem alteração na sequência de bases do DNA. A herança epigenética não foi prevista por Mendel, nem até recentemente, pela maioria dos geneticistas modernos, mas parece que os processos epigenéticos são importantes na herança de muitos genótipos. Atualmente, o estudo da epigenética é o foco de pesquisa intensiva.

Outra pergunta que esse estudo levanta é por que as condições adversas de fome durante a infância *reduzem* o risco de morrer de doença cardiovascular e diabetes melito nas gerações futuras, enquanto as condições de fartura de alimento *umentam* o risco? Pode-se esperar justamente o oposto,

que o estresse nutricional durante a infância aumente o risco de morrer, enquanto o excesso de alimento reduz. Os biólogos evolucionistas propuseram uma explicação para essa relação, que também foi observada em outros estudos. Essa explicação, chamada de *hipótese do fenótipo poupador*, baseia-se na suposição de que as informações sobre o ambiente onde os pais viveram pode ser útil para os descendentes, permitindo que eles respondam de formas que aumentem sua própria sobrevivência e reprodução. Essa hipótese propõe que quando as condições ambientais são ruins para os pais, é provável que elas persistam e também sejam ruins para os descendentes. Portanto, quando o genitor passa por períodos difíceis, a seleção natural favorece os genitores que produzem descendentes metabolicamente poupadores, descendentes que comam o máximo possível quando o alimento estiver disponível, minimizem o gasto de energia e acumulem calorias, porque o ambiente dos genitores prevê que os descendentes terão pouco alimento disponível. Essa estratégia foi provavelmente vantajosa no passado distante, antes da agricultura, mas frequentemente tem efeitos deletérios na sociedade moderna. A ingestão de muita comida, a minimização do gasto energético e o acúmulo de calorias quando há fartura de alimentos resultam, com frequência, em obesidade, cardiopatia e diabetes melito, como foi observado nas crianças e netos das pessoas de Överkalix.

Este capítulo estuda a epigenética, a explicação proposta para o efeito da dieta sobre a saúde dos residentes de Överkalix. Começamos discutindo a origem do termo epigenética e o que esse termo abrange hoje em dia. Então vamos revisar os tipos de mudanças que ocorrem e os principais processos que alteram a estrutura da cromatina. Vamos examinar como as mudanças na estrutura da cromatina podem ser transmitidas para as células e as gerações futuras. Depois analisaremos vários efeitos epigenéticos, incluindo paramutação, efeitos comportamentais, efeitos de substâncias químicas, efeitos metabólicos, efeitos nos gêmeos monozigóticos, inativação do X, diferenciação celular e *imprinting* genômico. E terminamos o capítulo discutindo os esforços para mapear a localização de genoma amplo dos marcadores epigenéticos, o epigenoma.

## 21.1 O que é epigenética?

O termo epigenética foi usado pela primeira vez por Conrad Waddington em 1942 para descrever como, por meio do processo de desenvolvimento, um genótipo produz um fenótipo. Waddington combinou as palavras “epigênese” que é como um embrião se desenvolve, com “genética”, o estudo dos genes e da hereditariedade. O objetivo de Waddington era incentivar a união da genética e do desenvolvimento. Entretanto, seu uso do termo antecedeu nossa moderna compreensão do DNA e da estrutura do cromossomo e atualmente a epigenética tem um significado mais restrito.

A raiz grega *e*pi significa *sobre* ou *acima*; a epigenética veio para representar a herança de variação acima e além das diferenças na sequência de DNA. Atualmente, a epigenética se refere, de modo geral, aos fenótipos e processos que são transmitidos para outras células e às vezes, a futuras gerações, mas não são o resultado das diferenças na sequência de bases do DNA. Os efeitos epigenéticos são causados por mudanças na expressão gênica resultantes de alterações à estrutura de cromatina ou outros aspectos da estrutura do DNA, como a metilação do DNA. Uma definição de um traço epigenético é: um fenótipo herdado com estabilidade resultante de mudanças na cromatina sem alterações na sequência de DNA. Alguns pesquisadores ampliaram a definição de epigenética de modo a incluir qualquer alteração da estrutura da cromatina ou do DNA que afete a expressão gênica. Aqui, usaremos a epigenética para se referir às mudanças na expressão gênica e/ou em um fenótipo que são potencialmente herdados sem alteração da sequência de bases de DNA envolvida.

Muitas mudanças epigenéticas são estáveis, persistindo por divisões celulares ou até gerações. Entretanto, as alterações epigenéticas também são potencialmente influenciadas por fatores ambientais. Por exemplo, foi demonstrado que o estresse ambiental altera a metilação do gene *Bdnf* do rato, que codifica um fator de crescimento importante no desenvolvimento do cérebro. A metilação do DNA foi correlacionada com a expressão de genes e os fenótipos produzidos. Como veremos, a metilação do DNA alterada consegue ser replicada durante a divisão celular, resultando em descendentes com o novo fenótipo, embora não exista diferença correspondente na sequência de bases de DNA dos indivíduos que “herdam” o novo fenótipo. O fato de que os traços epigenéticos podem ser induzidos por fatores ambientais e transmitidos a futuras gerações foi interpretado por alguns para significar que os genes têm memória por meio da epigenética, que os fatores ambientais que atuam sobre os indivíduos podem ter efeitos que são transmitidos para futuras gerações, como foi observado com o efeito da dieta na expectativa de vida na introdução deste capítulo. A epigenética tem sido chamada de “herança, mas não como a conhecemos”.

A epigenética está fornecendo uma explicação para como alterações fora da sequência de DNA conseguem influenciar o fenótipo e como essas mudanças são herdadas. Também está fazendo contribuições importantes para o estudo do comportamento, ciência ambiental, câncer, neurobiologia e farmacologia. ➤ **Resolva o Problema 2**

### Conceitos

Os efeitos epigenéticos são fenótipos e processos transmitidos para outras células e, às vezes, a futuras gerações, mas não são o resultado das diferenças na sequência de bases do DNA. O estudo da epigenética está fazendo importantes contribuições para muitas áreas da Biologia.

## 21.2 Vários processos moleculares levam a mudanças epigenéticas

A epigenética altera a expressão dos genes; essas alterações são estáveis o suficiente para serem transmitidas por mitose (e, às vezes, por meiose), mas também podem ser alteradas. A maioria das evidências sugere que os efeitos genéticos são produzidos

por mudanças físicas na estrutura da cromatina. No Capítulo 11, analisamos várias mudanças químicas no DNA e nas proteínas histona que afetam a estrutura da cromatina, incluindo metilação do DNA, modificação das proteínas histona e reposicionamento de nucleossomos. No Capítulo 17, discutimos o papel dessas alterações na expressão dos genes. Acredita-se que essas mudanças na estrutura da cromatina sejam importantes nos traços epigenéticos. O Capítulo 14 discutiu as pequenas moléculas de RNA, importantes para produzir os efeitos epigenéticos.

Vamos analisar três tipos de mecanismos moleculares que alteram a estrutura da cromatina e sustentam muitos fenótipos epigenéticos: (1) mudanças nos padrões de metilação do DNA; (2) modificações químicas das proteínas histona e (3) moléculas RNA que afetam a estrutura da cromatina e a expressão gênica.

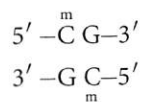
### Conceitos

Muitos fenótipos epigenéticos são o resultado de alterações na estrutura da cromatina, mediadas por três processos principais: metilação do DNA, modificação da histona e moléculas de RNA.

## Metilação do DNA

O mecanismo mais bem compreendido da mudança epigenética é a metilação do DNA. A metilação do DNA refere-se ao acréscimo de grupos metila às bases de nucleotídeos. Nos eucariotos, o tipo predominante de metilação de DNA é a metilação da citosina para produzir 5-metilcitosina (Figura 21.1 A). Como foi discutida no Capítulo 17, a metilação do DNA está associada à repressão da transcrição.

Ela ocorre, com frequência, nas bases citosina que estão imediatamente adjacentes aos nucleotídeos guanina, chamados de dinucleotídeos CpG (em que p representa o grupo fosfato que conecta os nucleotídeos C e G). Nos dinucleotídeos CpG, os nucleotídeos citosina nas duas fitas de DNA estão em diagonal um em relação ao outro. Em geral, ambas as bases citosina estão metiladas, então os grupos metila surgem em ambas as fitas de DNA, como apresentado a seguir e na Figura 21.1 B.



Nas plantas, a metilação do DNA também ocorre em trinucleotídeos CpNpG, em que N representa um nucleotídeo com qualquer base.

Algumas regiões do DNA têm mais dinucleotídeos CpG e são chamados de ilhas de CpG. Nas células de mamíferos, as ilhas de CpG estão localizadas nos promotores de genes ou próximas a estes. Essas ilhas de CpG não estão metiladas quando os genes são transcritos de forma ativa. Entretanto, a metilação das ilhas de CPG próximas de um gene leva a repressão da transcrição.

As células reprimem e ativam os genes ao metilar e desmetilar as bases citosina. Enzimas chamadas DNA metiltransferases metilam DNA ao adicionar grupos metila a bases de citosina para criar 5-metilcitosina. Outras enzimas chamadas de desmetilases removem os grupos metila, convertendo 5-metilcitosina de volta para citosina (ver Capítulo 17).

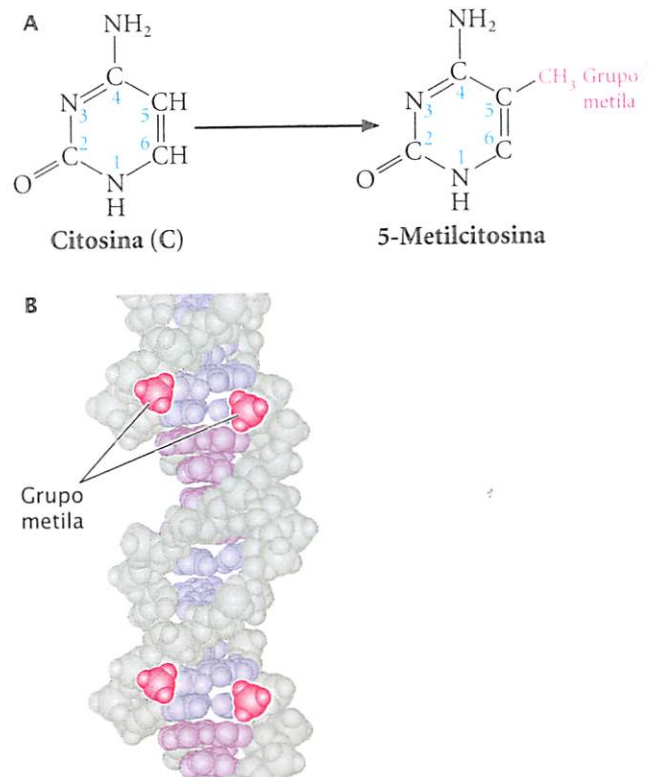


Figura 21.1 A metilação do DNA é uma modificação epigenética comum da cromatina. A. As bases citosina são modificadas para formar 5-metilcitosina. B. Estrutura tridimensional de DNA mostrando a metilação dos dinucleotídeos CpG.

**Manutenção da metilação.** O fato de que as mudanças epigenéticas são transmitidas para outras células e (às vezes) para gerações futuras significa que as mudanças na estrutura da cromatina associadas aos fenótipos epigenéticos têm de ser fielmente mantidas quando os cromossomos se replicarem. Como as mudanças epigenéticas são mantidas e replicadas durante o processo de divisão celular?

A metilação de sequências CpG significa que duas bases citosina metiladas estão em diagonal uma da outra em fitas opostas. Antes da replicação, as bases citosina em ambas as fitas são metiladas (Figura 21.2). Imediatamente após a replicação semiconservativa, a base citosina na fita molde estará metilada, mas a base citosina na fita recém-replicada, não. Enzimas metiltransferases especiais reconhecem o estado hemimetilado dos dinucleotídeos CpG e adicionam grupos metila a bases citosina não metiladas, criando duas novas moléculas de DNA totalmente metiladas. Dessa forma, o padrão de metilação do DNA é mantido durante a divisão celular. **Resolva o Problema 26**

**Metilação de DNA nas abelhas.** Um exemplo incrível de epigenética é observado nas abelhas. As abelhas-rainhas e as abelhas-operárias são fêmeas, mas a semelhança termina aqui. A rainha é maior e desenvolve ovários funcionais, enquanto as operárias são pequenas e estéreis (Figura 21.3). A rainha faz o voo do acasalamento e gasta sua vida inteira se reproduzindo, enquanto as operárias passam a vida toda coletando néctar e pólen, supervisionando a rainha e criando seus descendentes. Apesar dessas significativas diferenças na anatomia, na fisiologia e no comportamento, as rainhas e operárias são geneticamente idênticas, evoluindo a partir de óvulos comuns. Sua

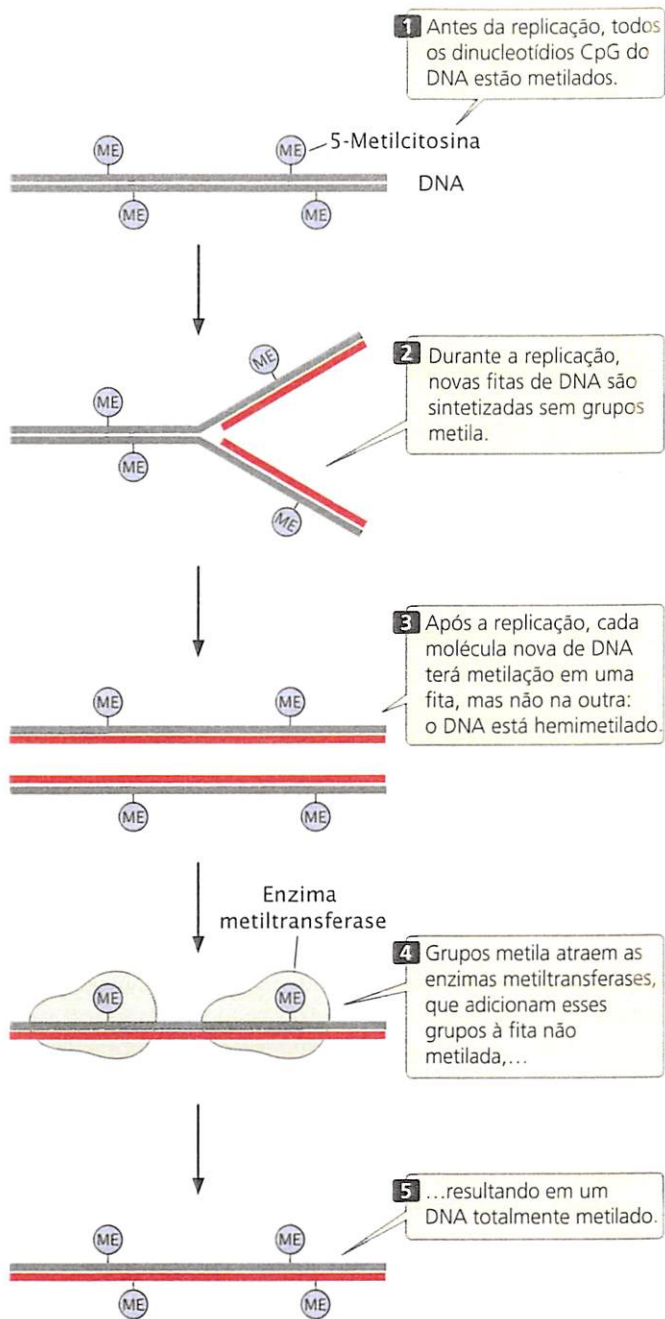


Figura 21.2 A metilação do DNA é mantida estável durante a replicação do DNA.



Figura 21.3 As mudanças epigenéticas são responsáveis por diferenças nos fenótipos das abelhas (*Apis mellifera*) rainha (esquerda) e operárias (direita). (WILDLIFE GmbH/Alamy.)

diferença está na dieta: as abelhas-operárias produzem e alimentam algumas larvas fêmeas com uma substância especial chamada geleia real, que faz com que essas larvas se desenvolvam em rainhas. Outras larvas recebem nutrientes básicos e se tornam operárias. Essa simples diferença na dieta afeta muito a expressão gênica, fazendo com que diferentes genes sejam ativados nas abelhas e resultem em um conjunto muito diferente de traços fenotípicos.

Como a geleia real afeta a expressão gênica é um mistério, mas a pesquisa atualmente sugere que ela muda um marcador epigenético. Em 2008, Ryszard Kucharski e seus colaboradores demonstraram que a geleia real silencia a expressão de um gene-chave chamado *Dnmt3*, cujo produto adiciona grupos metila ao DNA. Com o *Dnmt3* desligado, o DNA da abelha é menos metilado e muitos genes que normalmente estão silenciados nas operárias são expressos, levando ao desenvolvimento das características da rainha. Kucharski e seus colaboradores demonstraram a importância da metilação do DNA no desenvolvimento da rainha ao injetar pequenas moléculas de RNA nas larvas de abelhas (pequenos RNA de interferência, ou siRNAs, ver Capítulo 14) que inibem especificamente a expressão de *Dnmt3*. Essas larvas tinham níveis menores de metilação do DNA e muitas se desenvolveram como rainhas com ovários funcionais. Esse experimento demonstrou que a geleia real produz mudanças epigenéticas (menos a metilação do DNA), que são transmitidas pela divisão celular e modificam as vias do desenvolvimento, consequentemente produzindo uma abelha-rainha. **Resolva o Problema 25**

**Repressão da transcrição pela metilação do DNA.** Como a metilação do DNA suprime a expressão gênica? O grupo metila da 5-metilcitosina se localiza no sulco principal do DNA, que é reconhecido por muitas proteínas ligadoras de DNA. A localização do grupo metila no sulco principal inibe a ligação de fatores de transcrição e outras proteínas necessárias para que ocorra a transcrição. A 5-metilcitosina também atrai algumas proteínas que reprimem diretamente a transcrição. Além disso, a metilação do DNA atrai as enzimas histona desacetilase, que removem os grupos acetila das caudas das proteínas histona, alterando a estrutura da cromatina de forma que reprime a transcrição (ver Capítulo 17).

**Conceitos**

As bases citosina são metiladas para formar a 5-metilcitosina, que está associada à repressão da transcrição. A metilação do DNA é mantida estável durante a replicação pelas enzimas metiltransferases que reconhecem o estado hemimetilado dos nucleotídios CpG e adicionam grupos metila para as bases citosina não metiladas.

**✓ Checagem dos conceitos 1**

- Qual das seguintes afirmativas é verdadeira sobre as ilhas de CpG?
- Elas estão metiladas próximas dos promotores de genes ativamente transcritos.
  - Elas não estão metiladas próximas dos promotores de genes ativamente transcritos.
  - A acetilação das ilhas de CpG leva à repressão da transcrição.
  - As ilhas de CpG codificam moléculas de RNA que ativam a transcrição.

## Modificações da histona

As mudanças epigenéticas também podem ocorrer pela modificação das proteínas histona. Nas células eucarióticas, o DNA é complexado a proteínas histona na forma de nucleossomos, que são as unidades repetidas básicas da estrutura da cromatina (ver *Capítulo 11*). Já foram detectadas mais de 100 diferentes modificações pós-tradução das proteínas histona. Muitas dessas modificações ocorrem nas caudas com carga elétrica positiva das proteínas histona, que interagem com o DNA e afetam a estrutura da cromatina. As modificações nas histonas incluem o acréscimo de fosfatos, grupos metila, grupos acetila e ubiquitina a suas caudas. Essas modificações alteram a estrutura da cromatina e afetam a transcrição dos genes (ver *Capítulo 17*). As modificações também servem como sítios de ligação para proteínas como fatores de transcrição necessários para esse processo.

A adição de grupos acetila a aminoácidos nas caudas da histona (acetilação da histona) em geral desestabiliza a estrutura da cromatina, fazendo com que ela assuma uma configuração mais aberta e esteja associada a mais transcrição (ver Figura 17.2, no *Capítulo 17*). O acréscimo de grupos metila às histonas (metilação da histona) também modifica a estrutura da cromatina, mas o efeito varia dependendo do aminoácido específico que é metilado, alguns tipos de metilação de histona estão associados a mais transcrição e outros tipos estão associados a menos transcrição. Por exemplo, a adição de três grupos metila à lisina 4 na histona H3 (H3K4me3, K representa lisina) é encontrada próxima de genes ativos na transcrição. A metilação da lisina 36 na histona H3 (H3K36me3) também está associada a mais transcrição. Por outro lado, a adição de três grupos metila à lisina 9 na H3 (H3K9me3) e à lisina 20 na histona 4 (H4K20me3) está associada à repressão da transcrição. Foi demonstrado que muitas marcas adicionais das histonas estão associadas ao nível de transcrição. Esses tipos de modificações são chamados de **marcadores epigenéticos**.

As modificações de histona são adicionadas e removidas por proteínas especiais. As proteínas do grupo polycomb (PcG) são um grande grupo de proteínas que reprimem a transcrição ao modificar as histonas. Essas modificações alteram a estrutura da cromatina de modo que o DNA não fica acessível para os fatores de transcrição, a RNA polimerase e outras proteínas necessárias para transcrição. Por exemplo, o complexo polycomb 2 repressivo (PRC2) adiciona dois ou três grupos metila à lisina 27 da histona H3, criando o marcador epigenético H3K27me3 que reprime a transcrição.

Muitas das enzimas e proteínas que produzem marcadores epigenéticos não podem se ligar a sequências específicas de DNA por si sós. Assim, precisam ser recrutadas para alvos específicos no cromossomo. Os fatores de transcrição específicos de sequência, modificações de histona preexistente e moléculas de RNA servem para recrutar enzimas modificadoras de histona para sítios específicos.

Pesquisa indica que as modificações de histona única, como as mencionadas aqui, não determinam individualmente a atividade de transcrição de um gene. Pelo contrário, é a presença combinada de múltiplos marcadores epigenéticos que determina o nível de atividade. Também existem consideráveis eventos de interferência (*crosstalk*) entre os marcadores epigenéticos, um marcador de histona pode afetar se marcadores adicionais

ocorrem próximo e como eles funcionam. *Crosstalk* pode ocorrer porque as modificações de histona atraem enzimas e proteínas que modificam outras histonas. As modificações de histona não afetam apenas a transcrição, mas também podem influenciar outros processos moleculares como o reparo do DNA e a sinalização do ponto de verificação do ciclo celular (ver *Capítulo 23*). Por exemplo, a ubiquitinação da histona H2B é necessária para o reparo de quebras de fita dupla no DNA. Essa modificação leva a outras modificações de histona, como a metilação da lisina 79 de H3 (H3K79me3); essas modificações alteram a estrutura da cromatina e permitem acessar proteínas que reparam quebras de fita dupla.

**Manutenção das modificações da histona.** O processo pelo qual as modificações da histona são mantidas durante a divisão celular ainda não está bem compreendido como a metilação do DNA. Não existe mecanismo universal para manter as modificações da histona; diferentes tipos de modificações são indubitavelmente mantidos por mecanismos diferentes.

Foram propostos vários modelos para explicar como as modificações da histona são fielmente transmitidas para as células-filhas. Durante o processo de replicação do DNA, os nucleossomos são rompidos e as proteínas histona originais são distribuídas aleatoriamente entre as duas novas moléculas de DNA. As histonas recém-sintetizadas são adicionadas para completar a formação de novos nucleossomos (ver *Capítulo 12*). A maioria dos modelos assume que após a replicação os marcadores epigenéticos permanecem nas histonas originais e estas marcas recrutam enzimas que fazem mudanças semelhantes nas novas histonas. Por exemplo, PRC2 adiciona o marcador epigenético H3K27me3 nas histonas. PRC2 tem preferencialmente como alvo histonas na cromatina que já tenha um marcador H3K27me3, garantindo que qualquer novo nucleossomo que seja adicionado após a replicação também seja metilado. Dessa forma, as modificações da histona podem ser mantidas durante a divisão celular.

### Conceitos

A modificação das proteínas histona, incluindo a adição de grupos metila, grupos acetila, fosfatos e a ubiquitinação alteram a estrutura da cromatina. Algumas dessas modificações são transmitidas para as células-filhas durante a divisão celular e para gerações futuras.

## Efeitos epigenéticos produzidos pelas moléculas de RNA

Novos indícios demonstram que as moléculas de RNA são importantes para produzir os efeitos epigenéticos. O primeiro descoberto e ainda mais bem compreendido exemplo de mudança epigenética mediada por RNA é a inativação do X, na qual um longo RNA não codificado chamado *Xist* suprime a transcrição de um dos cromossomos X nas fêmeas dos mamíferos. Outro exemplo envolve a paramutação no milho, no qual um alelo epigeneticamente alterado induz uma mudança em outro alelo que então é transmitido para gerações futuras. A paramutação no milho é produzida por siRNAs (ver *Capítulo 14*). Ambos os exemplos serão discutidos posteriormente neste capítulo.

Diferentes mecanismos estão envolvidos nas mudanças epigenéticas pelas moléculas de RNA. No caso da inativação do X, o RNA *Xist* recobre um cromossomo X e então atrai a PRC2, que deposita grupos metila na lisina 27 da histona H3, criando o marcador epigenético H3K27me3 que altera a estrutura da cromatina e reprime a transcrição.

Ocorrem outros exemplos de fenótipos epigenéticos associados a RNA pelas moléculas siRNAs que silenciam genes e elementos de transposição (ver *Capítulo 18*) ao direcionar a metilação do DNA ou modificações da histona em sequências específicas de DNA. Além disso, a pesquisa demonstrou que os processos epigenéticos como metilação e modificação de histona influenciam a expressão dos microRNAs (ver *Capítulo 14*) que, por sua vez, são importantes para regular outros genes. MicroRNAs também controlam a expressão de genes que produzem efeitos epigenéticos, como as enzimas que metilam DNA e modificam as proteínas histona. Não está claro como as mudanças epigenéticas baseadas em RNA são mantidas pelas divisões celulares, embora aparentemente algumas envolvam pequenos RNAs que são transmitidos pelo citoplasma.

### Conceitos

As moléculas de RNA produzem modificação da cromatina por meio de vários processos.

#### ✓ Checagem dos conceitos 2

Qual das opções não é um mecanismo principal da mudança epigenética?

- Metilação do DNA.
- A alteração de uma sequência de base de DNA em um promotor.
- Acetilação de histona.
- Ação das moléculas de RNA.

## 21.3 Os processos epigenéticos produzem um conjunto variado de efeitos

Inicialmente, acreditava-se que os mecanismos epigenéticos fossem importantes em um pequeno número de fenótipos comuns. Entretanto, a pesquisa nos últimos 15 anos revelou que a epigenética sustenta um arranjo impressionante e até crescente de fenômenos biológicos. Vamos examinar alguns exemplos desses efeitos epigenéticos nesta seção.

### Paramutação

Um dos primeiros exemplos de epigenética foi um fenótipo curioso que Alexander Brink descreveu no milho nos anos 1950. Brink estava estudando o *locus r1*, que ajuda a determinar a pigmentação nas sementes do milho. O alelo  $R^r$  nesse *locus* produz grãos púrpura, enquanto o alelo  $R^{st}$  codifica grãos manchados. Brink observou que quando  $R^{st}$  estava presente em um genótipo com o alelo  $R^r$ , o alelo  $R^{st}$  alterava de forma permanente a expressão do alelo  $R^r$ , de modo que agora ele também produzia sementes manchadas. Esse efeito reduzido do alelo  $R^r$  alterado sobre a pigmentação persistiu por várias gerações, mesmo na ausência do alelo  $R^{st}$ . Brink chamou esse fenômeno de paramutação. A paramutação viola o princípio de segregação de Mendel, que afirma que quando os gametas são formados, cada alelo se separa e é transmitido de forma independente para a próxima geração.

Atualmente, a **paramutação** é definida como uma interação de dois alelos que leva a uma mudança que pode ser herdada na expressão de um dos alelos. É surpreendente que a paramutação produza essas diferenças no fenótipo sem qualquer alteração na sequência de bases do DNA do alelo convertido. O fenômeno da paramutação tem várias características importantes. Primeiro, o padrão de expressão recém-estabelecido do alelo convertido é transmitido para as gerações futuras, mesmo que o alelo que produza a alteração não esteja mais presente. Segundo, o alelo alterado agora é capaz de converter outros alelos para o novo fenótipo. E terceiro, não existem diferenças associadas de sequência de DNA nos alelos alterados. Foram descobertos vários exemplos de paramutação em diferentes organismos, e os geneticistas começaram a solucionar o mecanismo molecular desse curioso fenômeno.

**Paramutação no milho.** Alguns anos após Brink relatar a paramutação no *locus r1* do milho, outro exemplo relacionado foi descoberto por Ed Coe Jr. Esse caso envolveu a interação de alelos no *locus b1* do milho, que também ajuda a determinar a pigmentação. A paramutação no *locus b1* é mais direta do que no *locus r1*, então usaremos o *b1* para examinar o processo e o mecanismo da paramutação.

O *locus b1* ajuda a determinar a quantidade de antocianina púrpura que o milho produz. O *locus* codifica um fator de transcrição que regula os genes envolvidos na produção do pigmento. As plantas homocigotas para o alelo *B-I* (*B-I B-I*) mostram elevada expressão do *locus b1* e são púrpura-escuras (**Figura 21.4**). As plantas homocigotas para o alelo  $B'$  ( $B'B'$ ) têm uma expressão menor de *b1* e são levemente pigmentadas. Entretanto, as sequências de DNA dos alelos *B-I* e  $B'$  são idênticas. Os alelos geneticamente idênticos como estes, que produzem diferenças hereditárias nos fenótipos pelos processos epigenéticos, são chamados de **epialelos**.

Nas plantas heterocigotas *B-I B'*, o alelo *B-I* é convertido em  $B'$ , com o resultado de que as plantas heterocigotas são levemente pigmentadas (ver **Figura 21.4**), como as homocigotas  $B'B'$ . O alelo recém-convertido é indicado como  $B'^*$ . E importante, não existe diferença funcional entre  $B'$  e  $B'^*$ ; o alelo  $B'^*$  agora é totalmente capaz de converter outros alelos *B-I* em alelos  $B'^*$  nas gerações seguintes.

Pesquisa demonstrou que uma das características necessárias para a paramutação no *locus b1* é a presença de uma série de sete sequências repetidas em *tandem* que estão aproximadamente 100.000 pares de bases *upstream* da sequência codificadora para o *locus b1* (**Figura 21.5**). Cada repetição tem 853 pb e não codifica nenhuma proteína. Ambos os alelos *B-I* e  $B'$  têm essas repetições em *tandem*, mas a estrutura da cromatina dos dois alelos é diferente: o alelo *B-I* tem a cromatina mais aberta. As repetições em *tandem* são necessárias para alta expressão do alelo *B-I* e a produção de pigmento. Foi sugerido que as repetições atuam como um acentuador (ver *Capítulo 17*), estimulando a transcrição no *locus b1*, mas apenas quando a cromatina que circunda as repetições está em uma configuração aberta, como está no alelo *B-I*. A configuração mais fechada do alelo  $B'$  pode evitar as repetições de interagir com o promotor de *b1* e estimular a transcrição. Não se sabe como as repetições podem interagir com o alelo  $B'$ .

Os diferentes estados da cromatina de *B-I* e  $B'$  podem explicar seus diferentes níveis de expressão, mas como o alelo *B* converte o alelo *B-I* em  $B'^*$ ? Embora o mecanismo não esteja

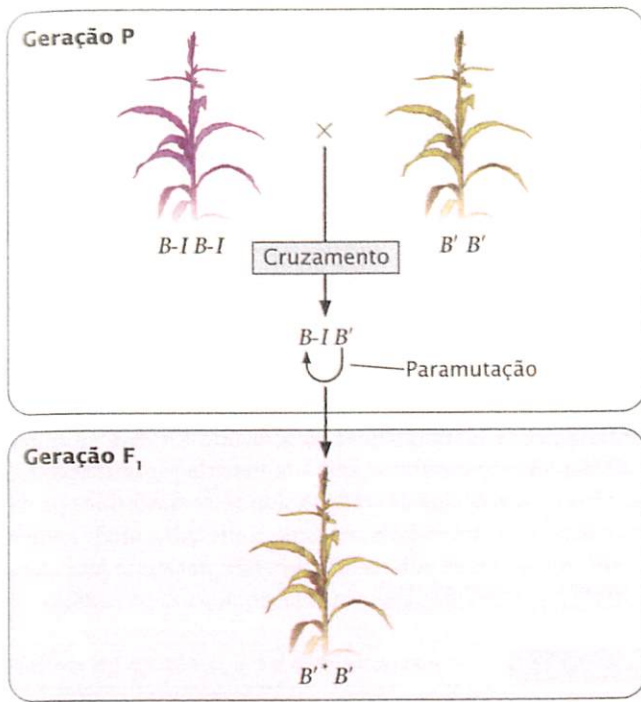


Figura 21.4 Na paramutação no locus *b1* do milho, uma cópia do alelo *B'* converte o alelo *B-I* em *B'\**, que tem o mesmo fenótipo que *B'*. O genótipo *B-I B-I* produz uma planta pigmentada, enquanto as plantas com os genótipos *B'B'* e *B'B'\** são levemente pigmentadas.

totalmente compreendido, pesquisa recente demonstra que é provável que a comunicação entre *B'* e *B-I* ocorra pela ação de pequenas moléculas de RNA.

As repetições em *tandem* necessárias para a paramutação codificam siRNAs com 25 nucleotídeos (ver Capítulo 14). Alguns siRNAs são conhecidos por modificar a estrutura da cromatina ao direcionar a metilação do DNA a sequências específicas de DNA. Os geneticistas isolaram vários genes no milho necessários para a que ocorra a paramutação; inativar esses genes elimina o fenômeno. Um desses genes é *mop1*, que codifica uma RNA polimerase direcionada para o RNA (uma enzima que sintetiza RNA a partir de um molde de RNA). Esse gene é necessário para gerar os siRNAs codificados pelas repetições em *tandem*, embora não pareça que essa enzima transcreva de fato as cópias de DNA das repetições em *tandem*. Outro gene necessário para a paramutação, chamado *rmr1*, codifica uma proteína remodeladora de cromatina.

Dessa forma, evidências atuais sugerem que as moléculas de siRNA convertem *B-I* em *B'\**, e é provável que essa conversão envolva uma mudança nos estados de cromatina dos alelos. Existem outros exemplos de plantas em que os siRNAs influenciam a metilação do DNA e a estrutura da cromatina. Entretanto, não se sabe exatamente como as moléculas de siRNAs produzem essa mudança na cromatina durante a paramutação. É provável que o estado alterado da cromatina das repetições no alelo *B'* reduza a transcrição do locus *b1*, talvez ao interferir com a interação das repetições em *tandem* e o promotor de *b1*. Supõe-se que a altera-

ção na cromatina do alelo *B'* seja estável e transmitida para gerações futuras. A pesquisa mostra que a transcrição das repetições em *tandem* e a geração de siRNAs a partir destas são necessárias, mas não suficientes para a paramutação, então fatores adicionais devem estar envolvidos. Também não está claro como a produção de siRNAs é transmitida entre as gerações.

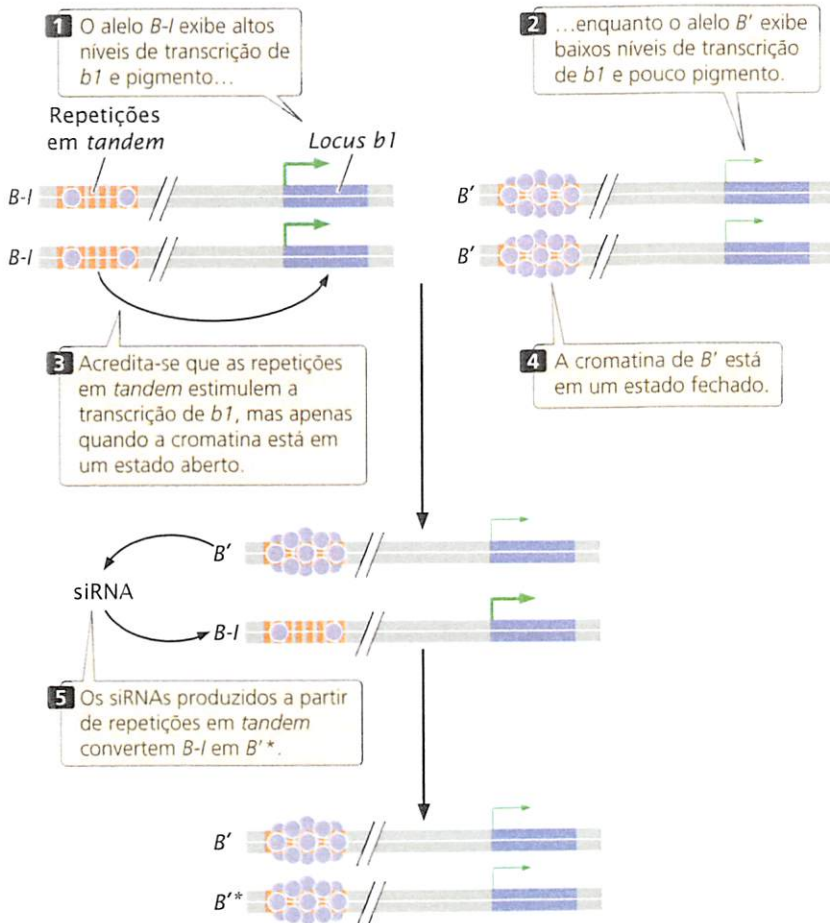


Figura 21.5 A paramutação no locus *b1* no milho requer a presença de 7 repetições em *tandem* upstream deste locus.

**Paramutação nos camundongos.** Também foram observados vários exemplos de paramutação nos camundongos. Uma envolve o locus *Kit*, que codifica um receptor da tirosina quinase e atua na produção de pigmento, desenvolvimento de célula germinativa e produção de células vermelhas. Os geneticistas criaram, por engenharia genética, um alelo *Kit* mutante (chamado aqui de *Kit'*), que carrega uma porção de 3.000 pb do gene *lacZ* (ver Capítulo 16) inserido no locus *Kit*. Os camundongos que são homocigotos para o alelo do tipo selvagem (*Kit<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup>*) têm pigmento normal. Os camundongos que são homocigotos para os alelos *Kit* mutantes (*Kit' Kit'*) morrem logo após nascer. Os camundongos heterocigotos para os alelos do tipo selvagem e mutante (*Kit<sup>+</sup> Kit'*) têm pontas de cauda e patas brancas (Figura 21.6). Quando um camundongo heterocigoto é cruzado com um camundongo homocigoto do tipo selvagem, metade dos descendentes é homocigota (*Kit<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup>*) e metade é heterocigota (*Kit<sup>+</sup> Kit'*), como seria esperado. Entretanto, muitos dos camundongos *Kit<sup>+</sup> Kit'* desenvolvem patas e caudas

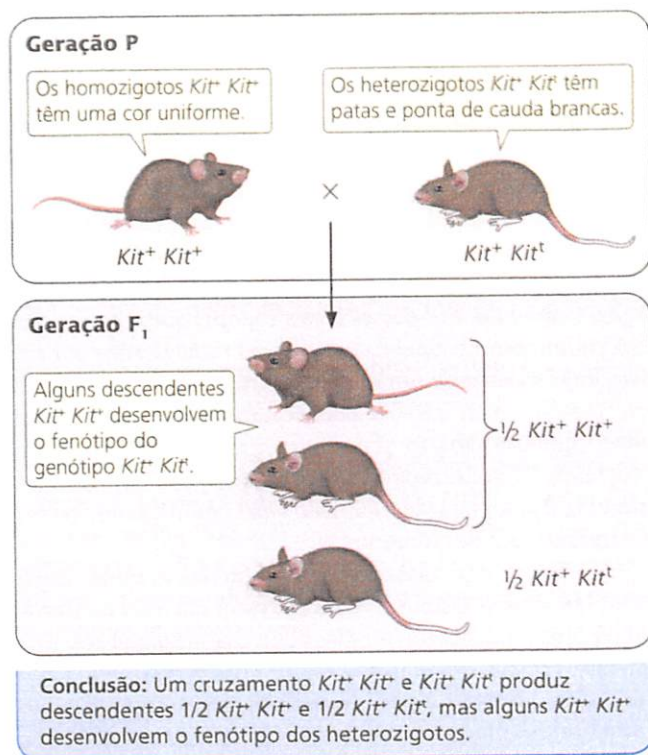


Figura 21.6 A paramutação no locus *Kit* dos camundongos.

brancas, o fenótipo esperado dos heterocigotos. Na presença do alelo  $Kit^t$  no heterocigoto, o alelo  $Kit^+$  é alterado de forma que ele tem o mesmo fenótipo de  $Kit^t$ . Os camundongos com esses alelos alterados são indicados como  $Kit^*$ . O alelo  $Kit^*$  alterado é transmitido de forma estável para as gerações futuras, nas quais continua a produzir caudas e patas brancas. Alguns humanos com uma mancha branca na testa e áreas de pigmento reduzido (chamado de traço de cavalo malhado) têm mutações no locus *Kit*; outras mutações no *Kit* resultam em predisposição para alguns cânceres.

Pesquisadores demonstraram que esse exemplo de paramutação também é mediado por molécula de RNA, embora seja provável que o mecanismo seja diferente do observado na paramutação no milho. Nos camundongos, as patas e caudas brancas do alelo  $Kit^t$  parece ser causado por microRNAs (miRNAs) que degradam o mRNA *Kit* e esses miRNAs são transmitidos para as gerações futuras pelos gametas. Pesquisadores observaram uma redução pela metade no mRNA *Kit* nos camundongos heterocigotos e camundongos  $Kit^*$ , sugerindo que as caudas e patas brancas dos heterocigotos sejam o resultado da redução na quantidade de mRNA *Kit*. Para determinar se o RNA era responsável pela paramutação, eles injetaram em alguns embriões do tipo selvagem o RNA de homocigotos  $Kit^+ Kit^+$  e injetaram em outros embriões do tipo selvagem o RNA de heterocigotos  $Kit^+ Kit^t$ . Entre os camundongos que tiveram o desenvolvimento completo, eles observaram que as caudas e patas brancas eram mais frequentes nos que receberam a injeção de RNAs dos heterocigotos, sugerindo que o RNA dos heterocigotos é capaz de alterar o alelo  $Kit^+$  dos camundongos do tipo selvagem (Quadro 21.1). Os pesquisadores injetaram miRNAs que degradam o mRNA *Kit* em embriões do tipo selvagem. Esse experimento produziu mais camundongos com patas e caudas brancas do que quando injetaram miRNAs inespecíficos em

**Quadro 21.1** Efeitos da injeção de diferentes tipos de RNA em camundongos do tipo selvagem.\*

Tipo de RNA injetado	Presença de pontas de cauda e patas brancas
mRNA $Kit^+ Kit^+$	Incomum
mRNA $Kit^+ Kit^t$	Mais comum
miRNA para mRNA <i>Kit</i>	Mais comum
miRNA inespecífico	Incomum

\* $Kit^+ Kit^+$

embriões (ver Quadro 21.1). A capacidade de produzir caudas e patas brancas características do genótipo  $Kit^+ Kit^t$  ao injetar miRNA em embriões sugere que esse caso de paramutação está associado a moléculas de miRNA que são transferidas para o embrião pelo óvulo e espermatozoide. Entretanto, ainda existem muitos aspectos desconhecidos da paramutação no locus *Kit*.

### Conceitos

A paramutação ocorre quando um alelo cria uma alteração hereditária em outro alelo sem qualquer mudança na sequência de DNA. Pesquisa sugere que a paramutação no milho e camundongos é mediada por pequenas moléculas de RNA.

#### ✓ Checagem dos conceitos 3

Qual dos itens a seguir é uma característica da paramutação?

- Um alelo é capaz de alterar outro alelo quando ambos estão presentes em um heterocigoto.
- Os alelos alterados podem ser transmitidos para as gerações futuras.
- Os alelos alterados devem ser capazes de alterar outros alelos em futuras gerações.
- Todas as opções anteriores.

## Epigenética comportamental

A pesquisa mostrou que as experiências de vida, especialmente as obtidas no início da vida, podem ter efeitos duradouros no comportamento e, em alguns casos, nas gerações futuras. Os pesquisadores estão descobrindo que esses efeitos duradouros são mediados por processos epigenéticos. O número de estudos que demonstram de forma convincente que a experiência de vida altera a estrutura da cromatina é pequeno no momento (e alguns ainda são controversos), mas vários pesquisadores estão procurando por efeitos epigenéticos de experiência e seus efeitos duradouros na estrutura da cromatina e no comportamento.

**Mudanças epigenéticas induzidas pelo comportamento materno.** Um exemplo fascinante de epigenética comportamental é observado nos efeitos duradouros do comportamento materno nos ratos. Uma fêmea lambe e cuida de seus descendentes, enquanto ela se curva e os amamenta. Os descendentes das fêmeas que apresentam um comportamento mais evidente de lambar e cuidar têm menos medo quando adultos e mostram respostas hormonais reduzidas ao estresse comparados com os descendentes de fêmeas que lambem e cuidam menos. Essas diferenças duradouras nos descendentes não são devido a diferenças genéticas herdadas de suas genitoras, pelo menos não as diferenças genéticas nas sequências de bases do DNA.



Os descendentes expostos a mais lambidas e cuidados desenvolvem um padrão diferente de metilação do DNA em comparação com os descendentes com menos lambidas e cuidados. Essas diferenças na metilação do DNA afetam a acetilação das proteínas histona que persistem na fase adulta e alteram a expressão do gene do receptor de glicocorticoide, que é importante nas respostas hormonais ao estresse. A expressão de outros genes de resposta ao estresse também é afetada.

Para demonstrar o efeito da estrutura da cromatina alterada à resposta de estresse dos descendentes, os pesquisadores introduziram um inibidor de desacetilase nos cérebros dos ratos jovens, que evita a remoção dos grupos acetila das proteínas histona. Após a infusão desse inibidor, as diferenças na metilação do DNA e acetilação da histona associadas ao comportamento de cuidados desapareceram, assim como a diferença nas respostas a medo e estresse nos adultos. Isto demonstra que o comportamento de lamber e cuidar do camundongo fêmea produz mudanças epigenéticas na cromatina dos descendentes, que provoca diferenças duradouras no seu comportamento. **Resolva o Problema 28**

### Efeitos epigenéticos do estresse precoce nos humanos.

Numerosos estudos demonstraram que o estresse durante a infância e a adolescência provoca vários efeitos adversos que perduram na vida adulta. Por exemplo, abuso na infância aumenta a probabilidade de que a criança experimentará depressão, ansiedade e suicídio quando for um adulto. Em um estudo, os pesquisadores examinaram os cérebros de 24 pessoas que cometeram suicídio, metade das quais haviam sofrido maus-tratos na infância. Eles descobriram que as que sofreram maus-tratos na infância tinham um grau maior de metilação do gene do receptor do glicocorticoide, um gene envolvido na resposta ao estresse, do que as que não sofreram maus-tratos. Embora o número de cérebros estudados fosse pequeno, o estudo sugere que o estresse na primeira infância pode de fato provocar modificações epigenéticas na estrutura da cromatina nos humanos.

Outros estudos demonstraram que a expressão gênica é afetada por experiência de vida precoce. Por exemplo, pesquisadores descobriram que crescer em um ambiente socioeconômico inferior antes dos 5 anos alterou a expressão de mais de 100 genes relacionados com a função imunológica dos adultos. A introdução do Capítulo 11 discute a observação de que o estresse na primeira infância, como crescer em um orfanato, altera o comprimento do telômero, um tipo de mudança epigenética.

**Epigenética na cognição.** Vários estudos de pesquisa demonstraram que anormalidades na metilação do DNA estão associadas a distúrbios de desenvolvimento e capacidade intelectual nos humanos. Esses achados levaram os pesquisadores a procurar por efeitos da estrutura da cromatina sobre o aprendizado, a memória e a capacidade cognitiva nos camundongos e ratos. Um estudo descobriu que treinar o camundongo a evitar estímulo adverso em uma localização específica reduzia metilação do DNA do gene *Bdnf*, que codifica um fator de crescimento que estimula o crescimento de conexões entre os neurônios. Quando desmetilado, o gene *Bdnf* era mais ativo. Quando os pesquisadores injetaram nos cérebros dos camundongos um fármaco que inibia a desmetilação, a atividade do gene *Bdnf* era reduzida, e a memória dos camundongos sobre onde o estímulo adverso ocorria também reduziu.

Outro estudo descobriu que um fármaco que promovia a acetilação das proteínas histona melhorou o aprendizado e memória nos camundongos que tinham um distúrbio semelhante à doença de Alzheimer. A acetilação das histonas altera a estrutura da cromatina ao afrouxar a associação do DNA com as proteínas histona e estimular a transcrição de vários genes. Outros estudos descobriram que a acetilação da histona reduz com a idade nos camundongos, com expressão diminuída de genes relacionados com o aprendizado e a memória. Quando os pesquisadores injetaram em camundongos um fármaco inibidor da atividade da desacetilase, a acetilação das histonas aumentou, a transcrição dos genes envolvidos com a memória aumentou e a memória dos camundongos melhorou. Esses estudos sugerem que mudanças na estrutura da cromatina podem estar envolvidas com a memória e o aprendizado.

### Conceitos

Alguns estudos estão fornecendo indícios de que as experiências no início da vida podem produzir mudanças epigenéticas que têm efeitos duradouros sobre o comportamento.

## Efeitos epigenéticos das substâncias químicas do ambiente

Como algumas substâncias químicas são capazes de modificar a estrutura da cromatina, os pesquisadores procuram por efeitos duradouros das substâncias tóxicas do ambiente sobre a estrutura da cromatina e os traços epigenéticos.

Existe muito interesse recente em substâncias químicas, chamadas desreguladores endócrinos, que mimetizam ou interferem com os hormônios naturais. Os desreguladores endócrinos são capazes de interferir com processos regulados por hormônios naturais, como o desenvolvimento sexual e reprodução. Um desregulador endócrino é a vinclozolina, um fungicida comum usado no controle de fungos nas uvas, frutas e vegetais e para tratar a grama de campos de golfe. A vinclozolina atua como um antagonista no receptor de andrógeno – essa substância e seus metabólitos mimetizam a testosterona e se ligam ao receptor de andrógeno, evitando que a testosterona se ligue. Mas a vinclozolina e seus metabólitos não ativam adequadamente o receptor e dessa forma, ela inibe a ação dos andrógenos e impede a produção de espermatozoides.

Em um estudo, os pesquisadores descobriram que a exposição de ratos embrionários à vinclozolina levou a produção reduzida de espermatozoides não apenas nos animais tratados (quando eles alcançavam a puberdade), mas também em várias gerações subsequentes. Foi observada metilação aumentada do DNA nos espermatozoides dos machos expostos à vinclozolina e esses padrões de metilação foram herdados. Esse estudo e outros levantaram questões que, por meio das mudanças epigenéticas, a exposição ambiental a algumas substâncias químicas poderia ter efeitos na saúde das gerações futuras. **Resolva o Problema 29**

### Conceitos

Por meio das mudanças epigenéticas, as substâncias químicas ambientais podem ter influências que se estendem para gerações posteriores.

## Efeitos epigenéticos transgeração sobre o metabolismo

Na introdução deste capítulo, discutimos como a dieta durante a infância pode ter efeitos na saúde que podem transmitidos para as futuras gerações. Esses tipos de estudos epidemiológicos nos humanos são apoiados por estudos laboratoriais de camundongos e ratos. Em um estudo, os pesquisadores alimentaram camundongos machos *inbred* (isogênicos, consanguíneos) com dieta normal (controle) ou hipoproteica. Eles cruzaram os machos de ambos os grupos com fêmeas do controle alimentadas com dieta normal. Os machos foram então separados das fêmeas e nunca mais tiveram contato com seus descendentes; sua única contribuição para os descendentes foi um conjunto de genes transferidos pelos espermatozoides.

Os descendentes foram criados e seus níveis sanguíneos de lipídios e colesterol foram examinados. Os descendentes dos machos que receberam dieta hipoproteica exibiam expressão aumentada de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e colesterol e correspondente redução dos níveis de colesterol, comparados com os descendentes dos machos que receberam dieta normal. Eles também observaram numerosas diferenças na metilação do DNA nos descendentes dos dois tipos de genitores, embora não pudessem ser encontradas diferenças nos padrões de metilação dos espermatozoides dos dois grupos de genitores. Esses resultados sugerem que as mudanças epigenéticas alteraram o metabolismo de colesterol dos descendentes, embora não esteja claro como as diferenças na metilação foram transmitidas dos genitores para os descendentes.

Em outro estudo, os pesquisadores alimentaram ratos machos com uma dieta hiperlipídica e, obviamente, eles ganharam peso. Esses machos foram cruzados com fêmeas que receberam dieta normal. Os descendentes também receberam dieta normal. Os descendentes dos ratos machos que receberam dieta hiperlipídica tinham peso normal, mas na vida adulta desenvolveram intolerância à glicose e comprometimento da secreção de insulina (semelhante ao diabetes melito). Os pesquisadores observaram que nas células das ilhotas pancreáticas secretoras de insulina das descendentes, a expressão dos 642 genes envolvidos na secreção de insulina e tolerância à glicose foi alterada, demonstrando que a dieta do genitor afetou a expressão gênica em suas descendentes.

## Efeitos epigenéticos em gêmeos monozigóticos

Os gêmeos monozigóticos (idênticos) se desenvolvem a partir de um único óvulo fertilizado por um espermatozoide que se divide e dá origem a dois zigotos (ver *Capítulo 6*). Os gêmeos monozigóticos são geneticamente idênticos, no sentido de que têm sequências de DNA idênticas, mas eles apresentam diferenças na aparência, na saúde e no comportamento. A natureza dessas diferenças nos fenótipos dos gêmeos idênticos ainda não está bem compreendida, mas evidências recentes sugerem que pelo menos algumas dessas diferenças são consequentes a alterações epigenéticas. Em um estudo, Mario Fraga, no Spanish National Cancer Center, e seus colaboradores examinaram 80 gêmeos idênticos e compararam o grau e a localização de metilação do seu DNA e acetilação de histona. Eles descobriram que a metilação de DNA e a acetilação de histona nos gêmeos idênticos

eram semelhantes no início da vida, mas os gêmeos mais velhos tinham diferenças marcantes no conteúdo total e na distribuição de metilação de DNA e acetilação de histona. Além disso, essas diferenças afetavam a expressão gênica nos gêmeos. Essa pesquisa sugere que os gêmeos idênticos são epigeneticamente diferentes e que as diferenças fenotípicas entre eles podem ser causadas por expressão gênica diferenciada.

### Conceitos

As diferenças fenotípicas entre gêmeos monozigóticos geneticamente idênticos resultam de efeitos epigenéticos.

#### ✓ Checagem dos conceitos 4

Que grau de diferença você esperaria observar nas sequências de bases de DNA e nos marcadores epigenéticos dos gêmeos monozigóticos?

- Diferenças semelhantes na sequência de bases de DNA e nos marcadores epigenéticos.
- Diferenças maiores na sequência de bases de DNA do que nos marcadores epigenéticos.
- Diferenças maiores nos marcadores epigenéticos do que na sequência de bases de DNA.
- Nenhuma diferença na sequência de bases de DNA ou nos marcadores epigenéticos.

## Inativação do X

Nas fêmeas dos mamíferos, um cromossomo X em cada célula é aleatoriamente inativado para fornecer uma expressão igual dos genes ligados ao X nos machos e fêmeas (ver *Capítulo 4*). Por esse processo, chamado de inativação do X, muitos genes no cromossomo X inativado são silenciados de forma permanente e não são transcritos. Depois que um cromossomo X é inativado em uma célula, ele permanece inativado quando o DNA é replicado, e a marca da inativação é transmitida para as células-filhas durante a mitose. Esse fenômeno é responsável pela distribuição desigual de pigmento preto e laranja observada nos gatos com pelagem tricolor ou casco de tartaruga (ver *Capítulo 4*). A inativação do X é um tipo de efeito epigenético porque ele resulta em uma mudança estável na expressão gênica que é transmitida para as outras células.

Grande parte da pesquisa demonstrou que qual cromossomo X é inativado dentro de uma célula é controlado por um segmento específico do cromossomo X chamado de **centro de inativação do X**, que tem 100.000 a 500.000 pb de comprimento. A inativação é iniciada nesse centro e então se espalha pelo restante do cromossomo X inativado. O exame do centro de inativação do X levou à descoberta de vários genes importantes para inativar um cromossomo X em cada célula da fêmea e manter o outro cromossomo X ativo (**Figura 21.7**).

O ator principal na inativação do X é um gene chamado *Xist* (transcrito específico de inativação do X) que codifica um longo RNA não codificador (lncRNA) com 17.000 pb de comprimento (**Figura 21.8**). Como seu nome sugere, essa molécula de RNA não codifica proteína. Pelo contrário, o lncRNA do *Xist* recobre o cromossomo X de onde ele foi transcrito. O lncRNA *Xist* então atrai o complexo repressor polycomb 2 (PRC2) e, conseqüentemente, o complexo repressor polycomb 1 (PRC1). Essas proteínas produzem marcadores epigenéticos, como a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3), e outras modificações

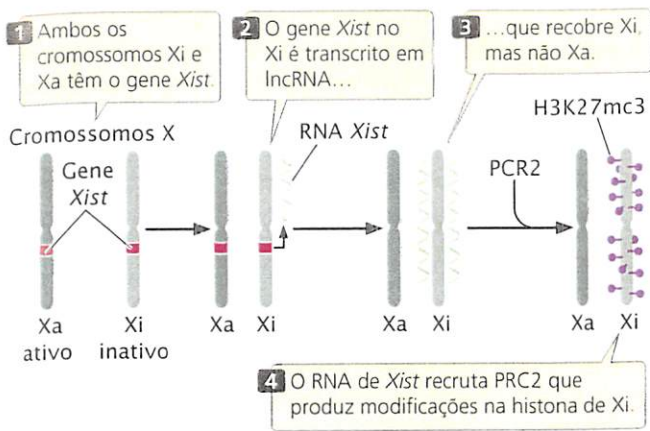


Figura 21.7 Na inativação do X, o gene *Xist* no X inativo produz um longo RNA não codificado que recobre o cromossomo X inativo e suprime a transcrição.

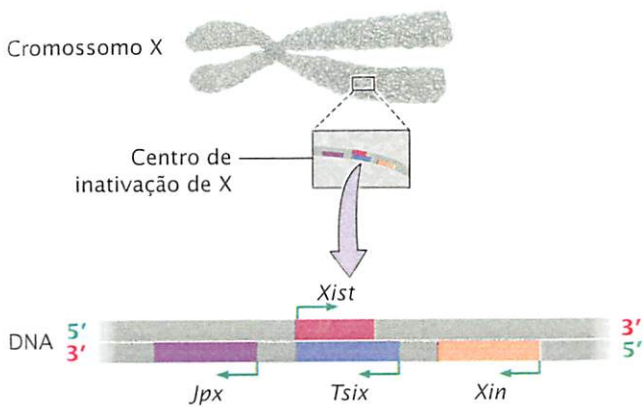


Figura 21.8 Vários genes no centro de inativação de X interagem para produzir a inativação de um cromossomo X enquanto mantém o outro cromossomo X ativo.

de histona que reprimem a transcrição. Consequentemente, muitos dinucleotídeos CpG são metilados, levando ao permanente silenciamento do cromossomo X inativado.

Nos camundongos, eles são dois eventos de inativação separados. Logo após a fertilização, quando o embrião chega ao estágio de 8 células, o cromossomo X do genitor masculino é inativado, enquanto o cromossomo X materno permanece ativo. No embrião em desenvolvimento, o cromossomo X paterno é reativado durante a maturação do blastocisto. A inativação ocorre novamente no desenvolvimento inicial, mas agora qual X é inativado é aleatório – o X da genitora e o X do genitor têm a mesma probabilidade de serem inativados. A partir desse ponto, qualquer X inativado permanece silenciado durante as divisões celulares subsequentes. Entretanto, alguns genes do cromossomo X inativado escapam da inativação e continuam a ser transcritos. Como esses genes escapam da inativação do X é desconhecido. O mais interessante, nos mamíferos marsupiais, o cromossomo X paterno é a cópia que permanece silenciada de forma permanente em todas as células.

Como foi mencionado, a inativação do X é feita pela transcrição do gene *Xist* do cromossomo X inativo para produzir o lncRNA *Xist*, que recobre o cromossomo X inativo e permite as mudanças na estrutura da cromatina que silenciam a transcrição. Mas o que acontece no cromossomo X ativo? Por que ele não é recoberto pelo RNA do *Xist* e silenciado? Embora todos os detalhes dess processo

ainda não estejam bem compreendidos, pesquisa recente demonstrou que existem vários genes adicionais no centro de inativação de X que codificam outros lncRNAs. Esses lncRNAs ajudam a produzir a inativação do X do X inativo, enquanto não silenciam o X ativo (ver Figura 21.7). Um destes é o gene *Tsix*, que é transcrito no cromossomo X ativo. *Tsix* é o antisseno de *Xist*, o que significa que ele se sobrepõe ao gene *Xist* e é transcrito a partir da fita oposta (ver Figura 21.8), produzindo o lncRNA *Tsix* que é complementar ao lncRNA *Xist*. Por meio de vários mecanismos, o *Tsix* reprime a expressão do *Xist* no cromossomo X ativo. Outro ator importante é um gene chamado *Jpx*, que codifica um lncRNA que estimula a transcrição de *Xist* no cromossomo X inativo. Assim, *Xist* é controlado por duas chaves paralelas com efeitos opostos: (1) *Jpx* estimula a expressão de *Xist* no cromossomo X inativo, fazendo com que *Xist* seja transcrito e leve à inativação de X e (2) *Tsix* reprime *Xist* no cromossomo X ativo, fazendo com que *Xist* não seja transcrito naquele cromossomo e evitando a inativação. Vários outros genes também estão envolvidos. Um gene chamado *Xite* codifica um lncRNA que mantém a expressão de *Tsix* no cromossomo X ativo. O **Quadro 21.2** resume os principais genes envolvidos no processo de inativação de X.

Esse processo complexo garante que um cromossomo X esteja inativo e um permaneça ativo em cada célula da fêmea. Os cientistas já reconhecem que a inativação do X também envolve algum tipo de mecanismo capaz de contar os cromossomos X, porque todos, exceto um cromossomo X em cada célula, estão inativados. Assim, o único X nas células de um macho XY permanece ativo (sem ocorrer ativação de X) e dois cromossomos são inativados nas fêmeas XXX (ver a discussão sobre corpúsculos de Barr no Capítulo 4). A natureza desse mecanismo de contagem ainda não está bem compreendida. **Resolva o Problema 31**

**Conceitos**

As mudanças epigenéticas sustentam a inativação de X, no qual um cromossomo X nas células das fêmeas é silenciado de forma permanente. A inativação de X ocorre pela ação de vários genes no centro de inativação de X que codificam longos RNAs não codificados. Os produtos desses genes interagem para garantir que um cromossomo X esteja inativado e um permaneça ativo em cada célula da fêmea.

**✓ Checagem dos conceitos 5**

Qual seria o efeito de introduzir siRNAs que degradam o RNA *Xist* em uma célula de fêmea?

**Quadro 21.2 Principais genes envolvidos na inativação de X.**

Gene	Codifica	Ação do gene
<i>Xist</i>	lncRNA	Reveste o cromossomo X inativo e leva ao silenciamento da transcrição de vários genes no X inativo
<i>Tsix</i>	lncRNA	Inibe a transcrição de <i>Xist</i> no cromossomo X ativo
<i>Jpx</i>	lncRNA	Estimula a transcrição de <i>Xist</i> no cromossomo X inativo
<i>Xite</i>	lncRNA	Mantém a expressão de <i>Tsix</i> no X ativo, que inibe <i>Xist</i> e mantém a transcrição dos genes no cromossomo X ativo

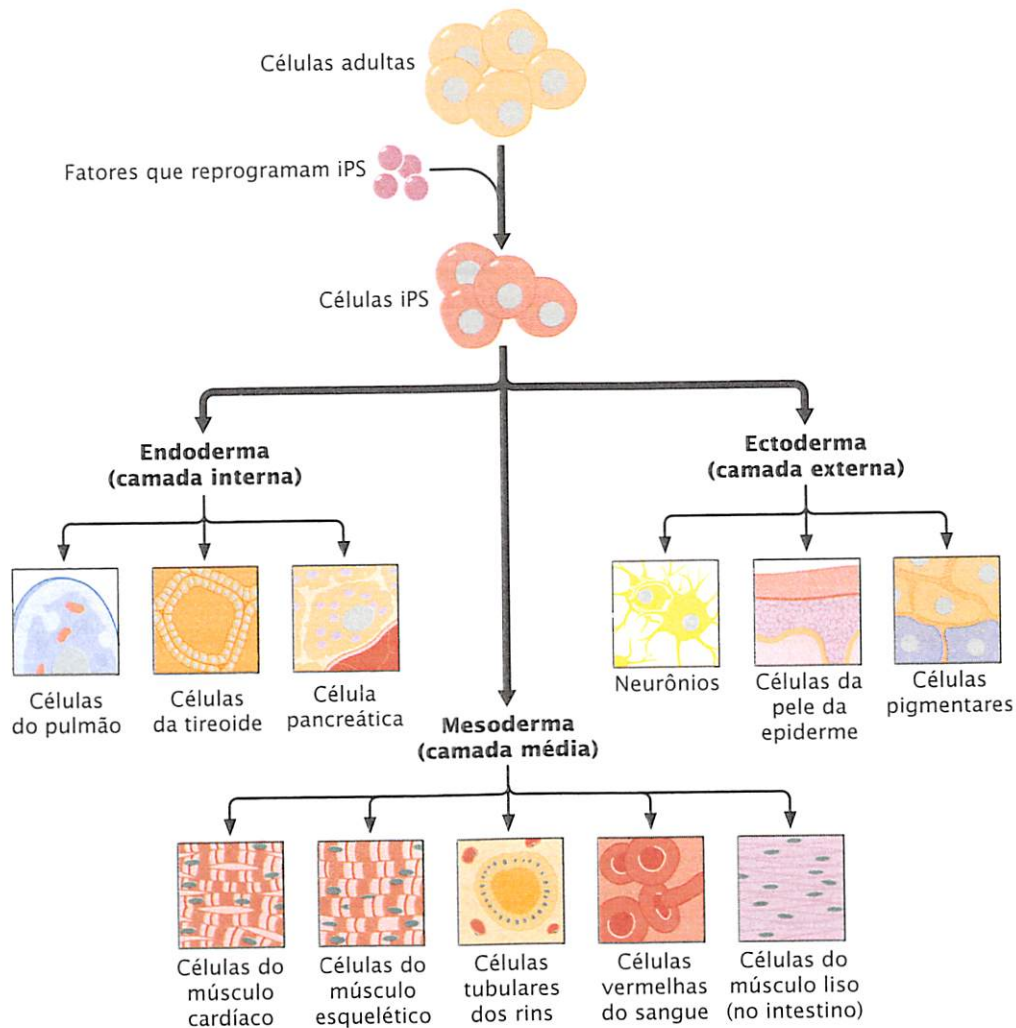
## Alterações epigenéticas associadas à diferenciação celular

Todas as células do corpo humano são geneticamente idênticas, ainda assim, diferentes tipos de células exibem incríveis fenótipos diferentes; uma célula nervosa é bem diferente em tamanho, formato e função de uma célula intestinal. Essas diferenças nos fenótipos são estáveis e transmitidas de uma célula para outra, apesar do fato de que as sequências de DNA de todas as células são as mesmas.

As **células-tronco** são células não diferenciadas capazes de formar todo tipo de célula em um organismo, uma propriedade chamada de **pluripotência**. À medida que as células-tronco se dividem e dão origem a um tipo de célula mais especializado, o programa de expressão gênica da célula se torna progressivamente fixo, de modo que cada tipo celular expressa apenas os genes necessários para fazer as funções daquele tipo de célula. Embora o controle desses programas de expressão específicos das células ainda não esteja bem compreendido, as mudanças na metilação do DNA e na estrutura de cromatina são importantes para silenciar alguns genes e ativar outros.

As células-tronco fornecem uma fonte potencial de células para regeneração de tecidos, tratamento médico e pesquisa. No passado, a única fonte de células-tronco com a capacidade de

diferenciação nos tecidos adultos eram células de embriões, mas por causa de questões éticas sobre a criação e o uso de embriões humanos para cultivar células-tronco, os pesquisadores estão procurando há muito tempo a capacidade de induzir as células somáticas adultas em se desdiferenciar e reverter em células-tronco. Tais células são chamadas de **células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)**. Atualmente os pesquisadores conseguiram criar iPSCs graças ao tratamento de fibroblastos (células do tecido conjuntivo humano totalmente diferenciadas) em cultura com um coquetel de fatores de transcrição (**Figura 21.9**), embora menos de 1% das células tratadas reverta para iPSCs. Os fatores de transcrição que induzem a pluripotência provocam substancial reprogramação epigenética, alterando os padrões de metilação de DNA e modificações de histona que se acumulam com a diferenciação celular. Todavia, a pesquisa recente mostrou que as iPSCs retêm memória de seu passado e não são completamente equivalentes às células-tronco embrionárias (aquelas coletadas de embriões). Um estudo descobriu que, embora os padrões de metilação do DNA de iPSCs sejam muito diferentes dos padrões das células somáticas, as iPSCs conservam algumas marcas de metilação das células somáticas e que a metilação das iPSCs não era idêntica à metilação das células-tronco embrionárias. Outro estudo comparou as modificações de histona dos fibroblastos, iPSCs e células-tronco embrionárias. As iPSCs e células-tronco



**Figura 21.9** As células adultas diferenciadas podem ser reprogramadas para formar células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), que conseguem se diferenciar em vários tipos de células.

embrionárias tinham menos marcas H3K27me3 e H3K9me3 que os fibroblastos, mas os pesquisadores também descobriram mais dessas marcas importantes nas iPSCs do que nas células-tronco embrionárias.

### Imprinting genômico

Os organismos diploides em geral têm dois alelos em cada *locus* autossômico, um alelo herdado da mãe e um alelo herdado do pai. Para a maioria dos genes, ambos os alelos são expressos, e o efeito de um alelo específico no fenótipo é independente de qual genitor transmitiu o alelo para os descendentes. Entretanto, para alguns genes, o sexo do genitor que contribuiu com o alelo influencia como este é expresso; alelos herdados da mãe e do pai não são equivalentes (Figura 21.10). Esse fenômeno, no qual o sexo do genitor que transmite o alelo determina sua expressão, é chamado de *imprinting* genômico (ver Capítulo 5). Para alguns genes imprintados (*imprinted*), o alelo herdado do genitor é expresso e o alelo herdado da genitora é silenciado; para outros genes, o alelo herdado da genitora é expresso e o alelo herdado do genitor é silenciado. Como foi discutido no Capítulo 5, acredita-se que o *imprinting* genômico seja responsável por diferentes graus de metilação dos genes herdados dos genitores.

A pesquisa mais antiga sugeria que o número de genes imprintados era limitado, mas estudos mais recentes sugerem que o número é muito maior. Um estudo conduzido por Christopher Gregg e seus colaboradores na Harvard University descobriu que mais de 1.300 genes no cérebro do camundongo exibiam indícios de *imprinting* genômico. Muitos desses genes imprintados

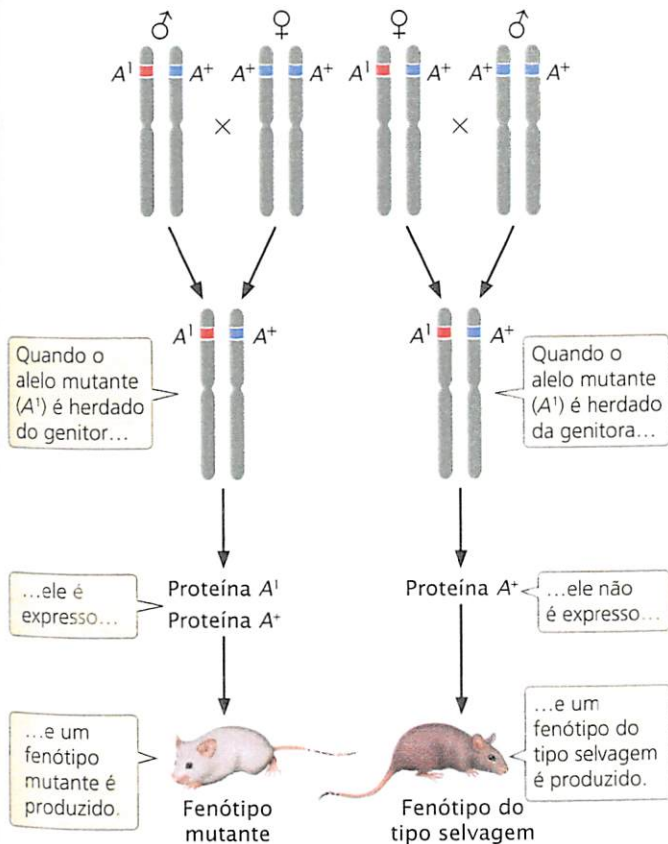


Figura 21.10 No *imprinting* genômico, a expressão de um alelo depende de ele ser herdado do genitor ou da genitora. Nesse caso, o alelo A<sup>1</sup> é expresso apenas quando herdado do genitor, mas, em outros casos, um alelo é expresso apenas quando herdado da genitora.

não foram completamente silenciados: existe uma expressão tendenciosa, com um sexo transmitindo um alelo que era muito mais expresso do que o alelo transmitido pelo outro sexo. Gregg e seus colaboradores também descobriram que o *imprinting* variava muito; alguns genes eram imprintados apenas em alguns tecidos ou em alguns momentos do desenvolvimento.

O *imprinting* genômico tem vários paralelos interessantes com a inativação do X. A maioria dos genes imprintados está localizada nos *clusters* de 3 a 12 genes que surgem em uma região bem definida de um cromossomo específico. Cada *cluster* tem genes codificadores de proteínas, assim como genes que produzem RNA não codificado. Em cada um dos exemplos mais bem estudados, existe uma região de controle de *imprinting* que determina o *imprinting*; a deleção dessa região destrói a capacidade de “imprimir”. Além disso, a região de controle de *imprinting* exibe diferentes modificações de cromatina entre os alelos herdados do genitor e da genitora. Cada *cluster* de *imprinting* tem genes para um ou mais lncRNAs importantes no *imprinting* e eles próprios estão imprintados. Por exemplo, o gene para o fator de crescimento 2 semelhante à insulina (*Igf2*) nos humanos exibe *imprinting* genômico, o alelo *Igf2* transmitido pelo genitor é expresso enquanto o alelo *Igf2* transmitido pela genitora é silenciado (ver Figura 5.18, no Capítulo 5). São necessários vários lncRNAs produzidos por outros genes na região de controle de *imprinting* para silenciar o gene de *Igf2* nas fêmeas, embora não esteja claro como eles produzem a repressão da transcrição.

Muitos dos *clusters* bem estudados de genes imprintados estão associados a distúrbios resultantes de *imprinting* defeituoso. A síndrome de Beckwith-Wiedemann é um destes distúrbios. As crianças com essa síndrome exibem crescimento excessivo durante o desenvolvimento fetal e a primeira infância. Eles também têm tumores malignos embrionários incomuns. A síndrome de Beckwith-Wiedemann está associada ao *imprinting* de um *cluster* de genes no cromossomo 11, incluindo o gene *Igf2*. Os indivíduos com essa síndrome têm pequenas deleções no cromossomo 11 que interferem no processo normal de *imprinting*. Por exemplo, *Igf2* é normalmente expresso apenas quando herdado do pai, mas em algumas crianças com a síndrome de Beckwith-Wiedemann, as deleções dentro do centro de *imprinting* podem levar à expressão de alelos de ambos os genitores. O resultado é a produção em grande quantidade de *Igf2*, levando ao crescimento excessivo e câncer. A síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Angelman são distúrbios causados por defeitos no *imprinting* no cromossomo 15 (ver Capítulo 15).

**Imprinting e conflito genético.** Muitos genes que são genômica-mente imprintados afetam o crescimento fetal e embrionário inicial. Uma possível explicação para o *imprinting* genômico é a **hipótese de conflito genético**, que sugere que existem pressões evolutivas diferentes e conflitantes agindo sobre os alelos maternos e paternos para genes (como o *Igf2*) que afetam o crescimento fetal. A partir do ponto de vista evolutivo, os alelos paternos que maximizam o tamanho dos descendentes são favorecidos, porque o peso ao nascer está fortemente associado à mortalidade infantil e à saúde do adulto. Assim, é vantajoso que o genitor transmita os alelos que promovem o crescimento fetal máximo dos seus descendentes. Em contrapartida, os alelos maternos que causam crescimento fetal mais limitado são favorecidos: entregar uma quantidade muito excessiva de nutrientes

para qualquer feto pode limitar a capacidade da genitora em se reproduzir no futuro e dar à luz fetos macrossômicos também é difícil e arriscado. A hipótese de conflito genético prevê que o *imprinting* genômico se desenvolverá: as cópias paternas dos genes que afetam o crescimento fetal serão expressas ao máximo, enquanto as cópias maternas dos mesmos genes serão expressas de forma menos ativa ou até silenciadas. De fato, o *Igf2* segue este padrão: o alelo paterno está ativo e promove o crescimento, o alelo materno é silenciado e não contribui com o crescimento. Achados recentes demonstram que a cópia paterna de *Igf2* promove o crescimento fetal ao direcionar mais nutrientes maternos para o feto através da placenta.

### Conceitos

O *imprinting* genômico é causado por diferenças epigenéticas nos alelos herdados dos genitores. A hipótese de conflito genético sugere que o *imprinting* se desenvolve por causa das pressões evolutivas conflitantes que agem sobre os alelos maternos e paternos.

#### ✓ Checagem dos conceitos 6

O que é verdade sobre o *imprinting* genômico?

- O sexo do genitor que transmite um alelo afeta a expressão do alelo nos descendentes.
- O sexo dos descendentes afeta a expressão de um alelo herdado de um dos genitores.
- O sexo do genitor afeta como um alelo é transmitido para os descendentes.
- O sexo dos descendentes afeta qual alelo é herdado do genitor.

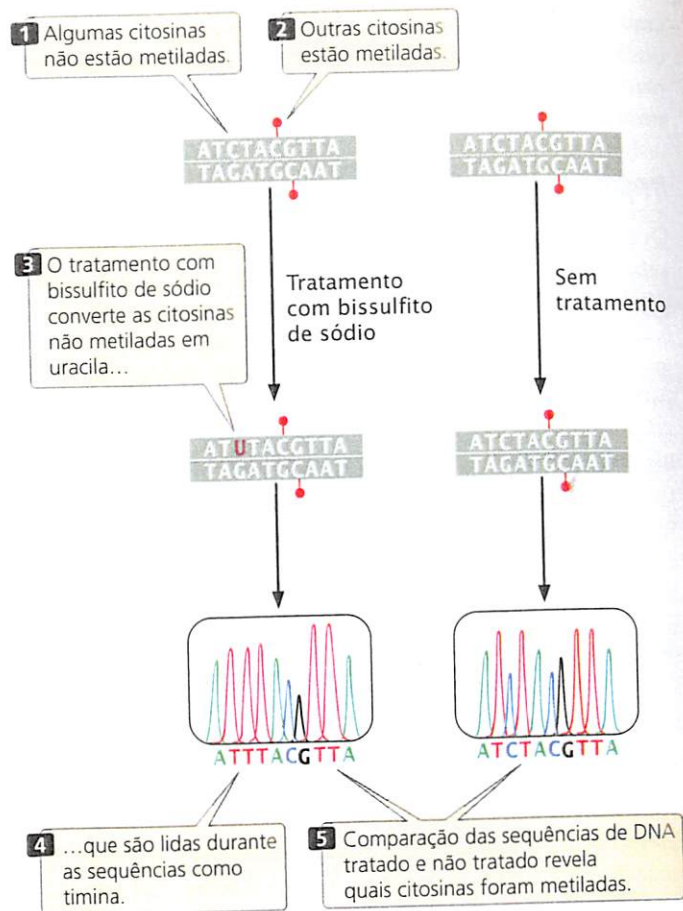


Figura 21.11 O sequenciamento por bissulfito pode ser usado para determinar as localizações das 5-metilcitosinas.

## 21.4 Epigenoma

Em 2003, pesquisadores declararam que praticamente o genoma humano inteiro tinha sido sequenciado. Esse feito monumental foi extremamente valioso no esclarecimento de como as informações genéticas são codificadas no genoma. Todavia, a sequência de bases do DNA é apenas um registro parcial das informações hereditárias. Como já discutimos, a estrutura da cromatina tem informações epigenéticas adicionais: informações que são herdadas e afetam como a sequência de bases é expressa. O padrão geral das modificações da cromatina de cada organismo é chamado de **epigenoma**. Nos últimos anos, foram disponibilizadas técnicas para detectar e descrever modificações epigenéticas pelo genoma.

**Deteção da metilação do DNA.** Foram desenvolvidas várias técnicas para examinar os níveis de metilação de DNA. Algumas dessas dependem de endonucleases de restrição, enzimas que fazem cortes de fita dupla no DNA em sequências de bases específicas (ver *Capítulo 19*). Algumas enzimas de restrição são sensíveis à metilação e não cortarão uma sequência que tenha 5-metilcitosina, enquanto outras enzimas de restrição são insensíveis à metilação. Pode-se determinar os padrões gerais de metilação ao cortar o DNA com enzimas que são sensíveis à metilação e com enzimas que não são e então analisar os fragmentos resultantes.

Uma técnica muito usada e mais precisa para analisar a metilação do DNA é o sequenciamento pelo bissulfito (**Figura 21.11**). Nessa técnica, o DNA genômico é tratado primeiro com bissulfito de sódio, que converte quimicamente a citosina não

metilada em uracila. As uracilas são então detectadas como timina durante o sequenciamento. Entretanto, a 5-metilcitosina não é quimicamente alterada pelo tratamento com bissulfito e é detectada como citosina durante o sequenciamento (ver *Capítulo 19* para uma discussão sobre o sequenciamento do DNA). Ao sequenciar o DNA genômico com e sem o tratamento com bissulfito, os pesquisadores podem determinar as localizações de todas as cópias de 5-metilcitosina no DNA.

**Deteção das modificações de histona.** As modificações de histona podem ser detectadas por fragmentação da cromatina e aplicação de um anticorpo específico para uma modificação específica da histona, um processo chamado imunoprecipitação da cromatina (abreviado como ChIP, ver *Capítulo 17*). O anticorpo provoca a precipitação da cromatina com a modificação da histona e consequente separação dos fragmentos de cromatina sem modificação. A proteína é então removida por digestão com uma enzima que a degrada, mas não o DNA, e o fragmento de DNA com o qual a histona estava associada é sequenciado. Esse processo fornece informações sobre onde ocorrem as modificações de histona no genoma.

**Marcadores epigenéticos de genoma inteiro.** Usando essas técnicas, os geneticistas compararam os epigenomas de diferentes tipos de células. Por exemplo, os pesquisadores determinaram a distribuição de 5-metilcitosina pelo genoma inteiro em dois tipos de células: (1) uma célula-tronco humana

não diferenciada e (2) um fibroblasto. Os pesquisadores descobriram diferenças comuns nos padrões de metilação dessas células. O achado que os padrões de metilação de DNA varia entre os tipos de células apoia a ideia de que a metilação da citosina fornece um meio pelo qual os tipos celulares mantêm suas diferenças durante o desenvolvimento. Outros pesquisadores compararam os epigenomas de células de câncer e células normais e observaram marcadores epigenéticos distintos associadas ao câncer.

Da mesma forma, os pesquisadores mapearam as localizações genômicas de modificações de histona em diferentes tipos celulares. Estes estudos detectaram modificações de histona específicas associadas a promotores e acentuadores de genes ativos. Em um estudo, os pesquisadores mapearam nove marcadores

epigenéticos diferentes em nove tipos diferentes de células humanas. Eles conseguiram determinar como as marcas de cromatina variavam entre os tipos celulares e compararam os marcadores epigenéticos associados aos genes ativos e reprimidos. Como os marcadores epigenéticos específicos estão associados a elementos reguladores como promotores e acentuadores, os pesquisadores usaram esses marcadores para mapear as localizações desses elementos reguladores por todo o genoma.

### Resumo dos conceitos

- O termo epigenética, criado por Conrad Waddington, atualmente refere-se aos efeitos pelos quais os fenótipos são transferidos para outras células ou gerações futuras sem diferenças nas sequências de bases do DNA
- Muitos fenótipos epigenéticos resultam de alterações na estrutura da cromatina. Os efeitos epigenéticos ocorrem por meio da metilação do DNA, modificação da histona e moléculas de RNA
- As mudanças epigenéticas são estáveis, mas são potencialmente afetadas por fatores ambientais
- Três mecanismos moleculares sustentam muitos fenótipos epigenéticos: (1) mudanças nos padrões de metilação do DNA; (2) modificações químicas das proteínas histona e (3) moléculas de RNA que afetam a estrutura da cromatina e a expressão gênica
- Alguns efeitos epigenéticos surgem a partir da metilação do DNA, na qual as bases citosina são metiladas para formar a 5-metilcitosina. A metilação ocorre em dinucleotídeos CpG. A presença de 5-metilcitosina está associada à repressão da transcrição
- Algumas regiões do DNA com muitos dinucleotídeos CpG são chamadas de ilhas de CpG. A metilação das ilhas de CPG próximas de um gene leva à repressão da transcrição
- A metilação do DNA inibe a transcrição ao inibir a ligação dos fatores de transcrição e outras proteínas necessárias para que ocorra a transcrição. A metilação do DNA também atrai proteínas que reprimem a transcrição e enzimas desacetilases de histona que alteram a estrutura da cromatina
- A metilação do DNA é mantida durante a divisão celular pelas enzimas metiltransferases que reconhecem a metilação dos dinucleotídeos CpG em uma fita de DNA e adicionam grupos metila a bases citosina não metiladas na outra fita
- As modificações das proteínas histona alteram a estrutura da cromatina. As modificações da histona podem ser transmitidas pela divisão celular
- As moléculas de RNA modificam a cromatina por meio de vários processos
- A paramutação é uma alteração hereditária de um alelo por outro alelo, sem qualquer mudança na sequência de DNA. A paramutação no milho e nos camundongos é mediada por pequenas moléculas de RNA
- As experiências no início da vida podem produzir mudanças epigenéticas que têm efeitos duradouros sobre o comportamento
- As substâncias químicas do ambiente podem produzir efeitos epigenéticos que são transmitidos para as gerações posteriores
- As modificações epigenéticas têm efeitos sobre o metabolismo que se estendem pelas gerações
- As diferenças fenotípicas entre os gêmeos monozigotos geneticamente idênticos podem surgir a partir dos efeitos epigenéticos
- A inativação de X ocorre quando um cromossomo X nas células das fêmeas é silenciado de forma permanente. As mudanças epigenéticas produzem a inativação do X e requerem a ação de vários genes que codificam longos RNAs não codificados
- O *imprinting* genômico ocorre quando a expressão de um gene depende de qual genitor transmite o gene. Ele é causado por mudanças epigenéticas na estrutura de cromatina que são transmitidas para os descendentes. A hipótese de conflito genético sugere que o *imprinting* se desenvolve por causa das pressões evolutivas conflitantes que agem sobre os alelos maternos e paternos
- O epigenoma é o conjunto completo de modificações da cromatina de um organismo.

### Conceitos

O epigenoma é o conjunto completo de modificações da cromatina de um organismo.

### Termos importantes

Células-tronco (p. 562)

Células-tronco pluripotentes induzidas (p. 562)

Centro de inativação do X (p. 560)

Epialelos (p. 556)

Epigenoma (p. 564)

Hipótese de conflito genético (p. 563)

Marcadores

epigenéticos (p. 555)

Paramutação (p. 556)

Pluripotência (p. 562)

## Respostas da Checagem dos conceitos

1. b.
2. b.
3. d.
4. c.
5. Não haveria RNA *Xist* para recobrir o cromossomo X e a inativação não ocorreria. Ambos os cromossomos X permaneceriam ativos.
6. a.

## Problema desenvolvido

## Problema

O alelo *b1* codifica um fator de transcrição que estimula a produção de antocianina, um pigmento púrpura nas plantas. Qual seria o efeito de eliminar sete repetições em *tandem* localizadas 100.000 pb *upstream* do locus *b1* no milho?

## Estratégias para a solução

De qual informação você precisa para solucionar o problema?

Os efeitos da deleção das repetições.

Quais informações são fornecidas para solucionar o problema?

- O locus *b1* codifica um fator de transcrição que estimula a produção de antocianina nas plantas
- As sete repetições em *tandem* estão *upstream* do locus *b1*.

Para a solução deste problema, revise:

Paramutação no milho, na Seção 21.3.

## Etapas para a solução

As informações fornecidas no texto indicam que a planta *B-I B-I* normalmente tem alta expressão do locus *b1*, produz antocianina e tem cor púrpura. As repetições em *tandem*

são necessárias para a elevada transcrição do locus *b1*, que codifica um fator de transcrição, responsável pela produção de antocianina, um pigmento púrpura. As repetições em *tandem* atuam como um acentuador, estimulando a transcrição do locus *b1* no genótipo *B-I B-I*. Sem a ação semelhante de acentuador das repetições, *b1* será transcrito em níveis mínimos e pouca antocianina será produzida. Esse fenômeno resultará em plantas *B-I B-I* com poucos pigmentos, o mesmo fenótipo observado nas plantas com genótipo *B' B'*.

As repetições em *tandem* também codificam 25 siRNAs com 25 nucleotídeos de comprimento, necessários para a paramutação (conversão do alelo *B-I* em alelos *B' \**). Assim sendo, a deleção das repetições em *tandem* eliminaria a capacidade dos alelos *B'* em fazer paramutação.

**Lembrete:** Os acentuadores estimulam a transcrição em genes distantes deles (ver Capítulo 17).

## Questões de compreensão

## Introdução

1. O que é a hipótese do fenótipo poupador? Como ela ajuda a explicar os efeitos a longo prazo da dieta observados nos residentes de Överkalix?

## Seção 21.1

- \*2. Quais são as características importantes de um traço epigenético?

## Seção 21.2

3. Quais são os três mecanismos moleculares que alteram a estrutura da cromatina e responsáveis por muitos fenótipos epigenéticos?
4. Qual é a principal forma de metilação de DNA observada nos eucariotos? Em qual tipo de sequência de DNA é comum encontrar a metilação do DNA?
5. Como a metilação do DNA reprime a transcrição?
6. Explique resumidamente como os padrões de metilação do DNA são transmitidos pela divisão celular.

7. Quais são os tipos de modificações de histona responsáveis pelos fenótipos epigenéticos?

## Seção 21.3

8. O que é paramutação? Quais são as características fundamentais deste fenômeno?
9. Descreva resumidamente a paramutação no locus *Kit* de camundongos. Que evidências sugerem que pequenas moléculas de RNA são importantes para esse fenômeno?
10. Que evidências sugerem que a cognição nos camundongos é influenciada por mudanças epigenéticas?
11. Explique como a vinclozolina atua como desregulador endócrino.
12. Dê um exemplo de efeito epigenético transgeração da dieta sobre o metabolismo.
13. Que evidências sugerem que as diferenças nos gêmeos monozigóticos podem ser causadas por efeitos epigenéticos?
14. Como a inativação do X é um fenótipo epigenético?



15. Descreva resumidamente os processos moleculares que fazem um cromossomo X em cada célula de fêmea ser ativado e o outro cromossomo X ser inativado.
16. O que são células-tronco pluripotentes induzidas? Como elas são derivadas das células somáticas adultas?
17. Defina *imprinting* genômico.

18. O que é hipótese de conflito genômico para a origem do *imprinting* genômico.

**Seção 21.4**

19. O que é epigenoma?

**Questões e problemas aplicados**

**Introdução**

20. A introdução deste capítulo descreve os efeitos duradouros da dieta sobre os residentes de Överkalix, Suécia.
  - a. Que evidências sugerem que esses efeitos são causados por efeitos epigenéticos?
  - b. Que evidência adicional ajudaria a demonstrar que essas mudanças são causadas por mudanças epigenéticas?

**Seção 21.1**

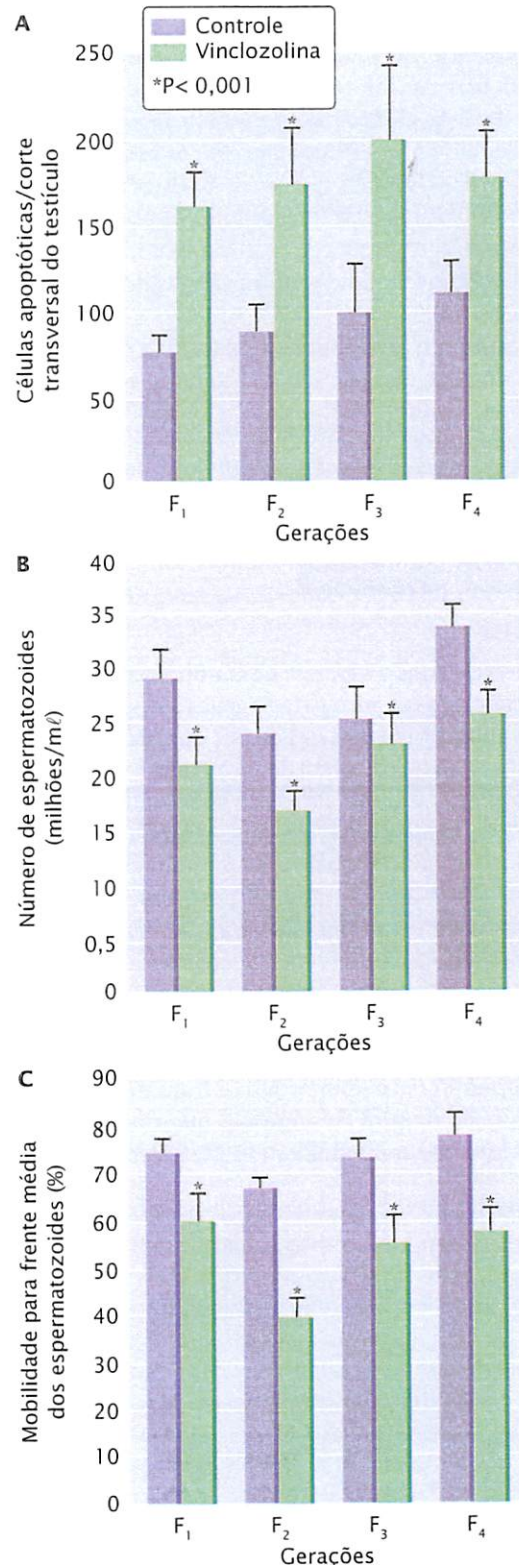
21. Qual é a diferença dos traços epigenéticos dos traços genéticos tradicionais, como as diferenças na cor e no formato das ervilhas que Mendel estudou?
22. A epigenética é descrita como “herança, mas não como a conhecemos”. Você acha essa definição adequada? Por que sim ou por que não?

**Seção 21.2**

23. O que seria necessário para provar que um fenótipo é causado por uma mudança epigenética?
24. Qual abelha da Figura 21.3 (a operária ou a rainha) terá mais cópias de 5-metilcitosina no seu DNA? Explique sua resposta.
- \*25. Qual seria o efeito de eliminar o gene *Dnmt3* nas abelhas?
- \*26. Parte da metilação do DNA nos eucariotos ocorre nos dinucleotídeos CpG, mas alguns nucleotídeos individuais de citosina também são metilados para formar a 5-metilcitosina. Considerando o que você sabe sobre o processo pelo qual a metilação do DNA nos dinucleotídeos CpG é mantida durante a divisão celular, você acha que a metilação dos nucleotídeos C também seria mantida pelo mesmo processo? Explique sua justificativa.

**Seção 21.3**

27. Um cruzamento entre o indivíduo F<sub>1</sub> na Figura 21.4 e uma planta com genótipo *B-I B-I* produzirá descendentes com qual fenótipo?
- \*28. Uma cientista faz um experimento no qual remove os descendentes dos ratos da mãe ao nascer e pede a seus estudantes de genética que alimentem e criem os filhotes. Considerando que os estudantes não lambem nem cuidam desses filhotes como as mães normalmente o fazem, quais seriam os efeitos comportamentais e epigenéticos a longo prazo esperados nesses ratos quando eles crescerem?
- \*29. Ratas prenhes foram expostas a uma dose diária de 100 ou 200 mg/kg de vinclozolina, um fungicida muito usado na indústria de vinho (M. D. Anway *et al.* 2005. *Science* 308:1466-1469). Os descendentes F<sub>1</sub> das fêmeas expostas foram inter cruzados, produzindo os ratos F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>. Observe que nenhum dos ratos F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub> foi exposto à vinclozolina. Os testículos dos ratos machos F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub> foram



(Gráficos de M. D. Anway *et al.* 2005. *Science* 308:1466-1469.)

examinados e comparados com os dos ratos de fêmeas do controle que não foram expostas à vinclozolina (ver os gráficos anteriores). Esses efeitos foram observados em mais de 90% dos descendentes machos de  $F_1$ - $F_4$ . Além disso, 8% dos machos  $F_1$ - $F_4$  das fêmeas expostas à vinclozolina desenvolveram infertilidade completa, comparados com 0% dos machos  $F_1$ - $F_4$  das fêmeas do controle. A análise molecular dos testículos demonstrou que os padrões de metilação do DNA eram diferentes entre os descendentes das fêmeas expostas à vinclozolina dos descendentes das fêmeas do controle. Forneça uma explicação para os efeitos transgeração da vinclozolina sobre a fertilidade dos machos.

30. Com base nas informações de estudos de efeitos duradouros da dieta sobre o metabolismo nos camundongos, quais poderiam ser os efeitos epigenéticos nos filhos e netos das pessoas de Överkalix que foram expostas a períodos de fome extrema na infância? Inclua na sua resposta os tipos de mudanças epigenéticas à cromatina que você pode esperar ver e os efeitos fenotípicos no metabolismo dos lipídios e do colesterol.

\*31. Qual seria o efeito sobre a inativação do X ao adicionar siRNAs que eliminariam os produtos de cada um dos seguintes genes?

- Xist*.
- Jpx*.

### Questões desafiadoras

#### Seção 21.3

34. É provável que a hipótese de conflito genômico explique o *imprinting* genômico para os genes envolvidos na memória dos adultos? Por que sim ou por que não?

35. Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas para clonar mamíferos por um processo chamado de transferência nuclear, na qual o núcleo de uma célula somática é transferido para um óvulo do qual foi removido o material nuclear (ver *Capítulo 22*). A pesquisa demonstrou que quando um núcleo de uma célula somática diferenciada é transferido para um óvulo, apenas uma pequena porcentagem dos embriões resultantes completa o desenvolvimento e muito deles morrem pouco depois de nascer. Em contrapartida, quando um núcleo de uma célula-tronco embrionária não diferenciada é transferido para um óvulo, a porcentagem de embriões que completam o desenvolvimento é muito maior (W. M. Rideout, K. Eggan, and

#### Seção 21.4

32. Um fragmento de DNA com a seguinte sequência de bases tem algumas bases citosina que são metiladas (indicadas por C\*) e outras que são não metiladas. Para determinar a localização de citosinas metiladas e não metiladas, os pesquisadores sequenciaram esse fragmento com e sem o tratamento com bissulfato de sódio. Indique a sequência de bases que será lida com e sem o tratamento com bissulfato.

— ATCGC\*GTTAC \*ATTGC \*ATCA —

33. Uma geneticista está interessada em determinar as localizações das citosinas metiladas em um fragmento de DNA. Ela trata algumas cópias do fragmento com bissulfato de sódio e deixa algumas cópias sem tratamento. Depois sequencia as cópias tratadas e não tratadas do fragmento e obtém os seguintes resultados. Indique a sequência original do fragmento de DNA e indique a presença das citosinas metiladas.

Sequência

sem tratamento: — AATTGCCCGATCGATTAAGCCA —

Sequência

com tratamento: — AATTGTTTGATCGATTAAGCTA —

R. Jaenisch. 2001. *Science* 293:1095-1098). Proponha uma possível explicação para o desenvolvimento bem-sucedido de embriões clonados ser maior quando o núcleo transferido provém de uma célula-tronco embrionária não diferenciada.

#### Seção 21.4

36. Foi proposto o uso de células-tronco embrionárias para substituir células destruídas por doença ou lesão. Por causa de questões éticas sobre a criação e a destruição de embriões para produzir células-tronco embrionárias, os pesquisadores tentaram criar células pluripotentes induzidas (iPSCs). Neste capítulo, discutimos estudos que mostram que iPSCs conservam alguns marcadores epigenéticos das células adultas diferenciadas de onde derivaram. Quais implicações essa pesquisa poderia ter para as tentativas de usar iPSCs para cultivo de células e tecidos?