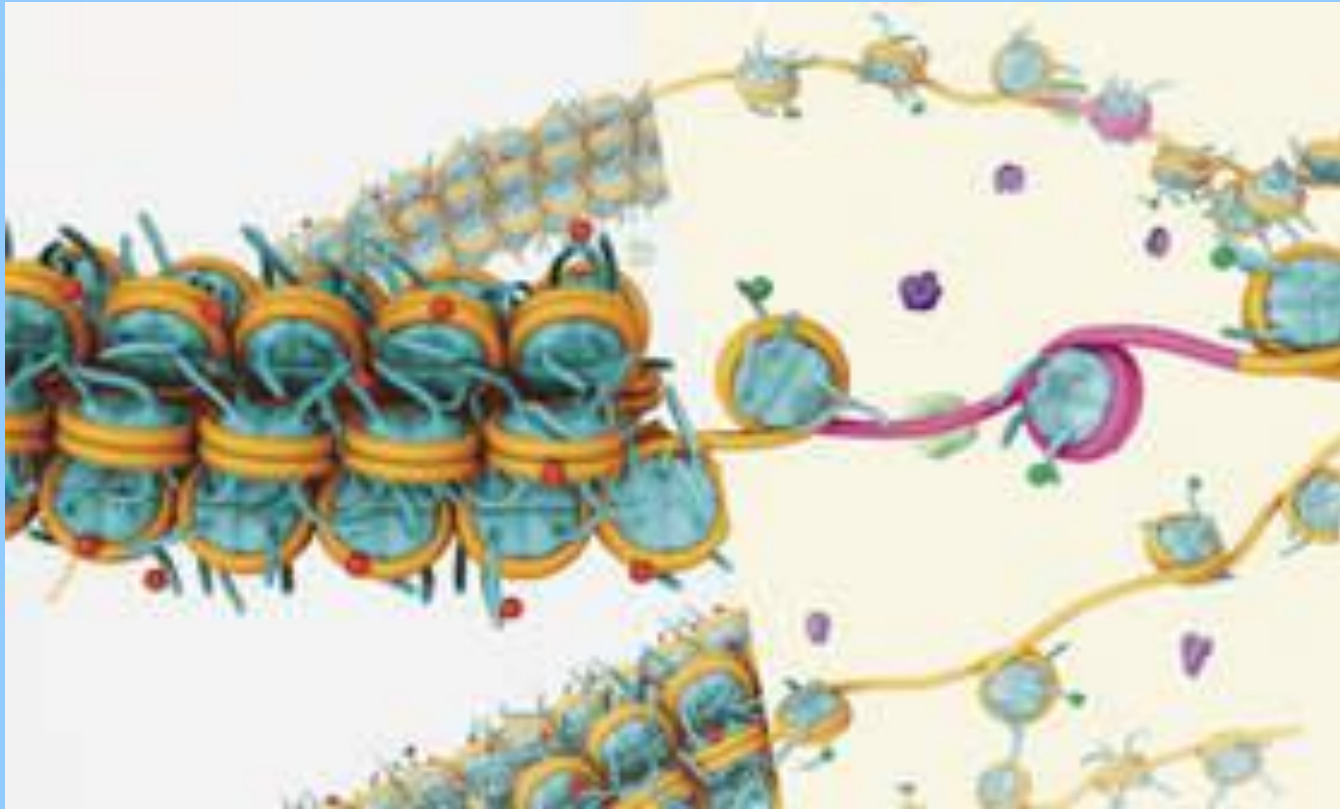


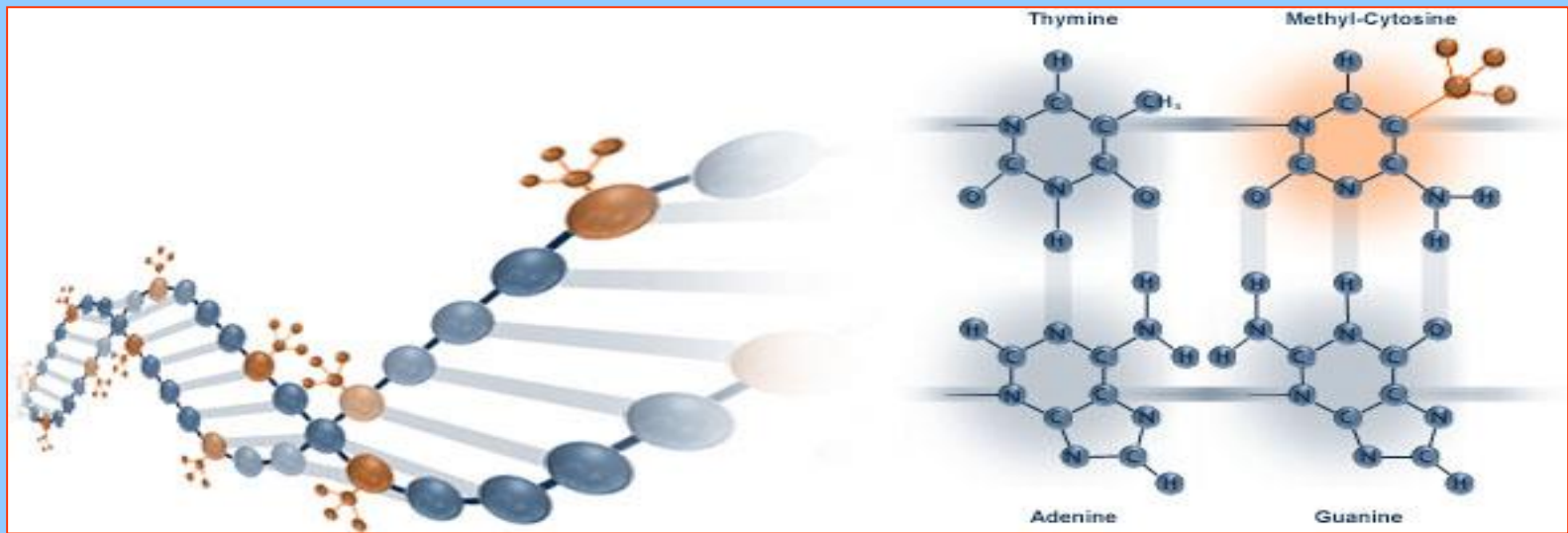
EPIGENÉTICA IMPRINTING GENÔMICO



Genética Humana Molecular
Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

EPIGENÉTICA

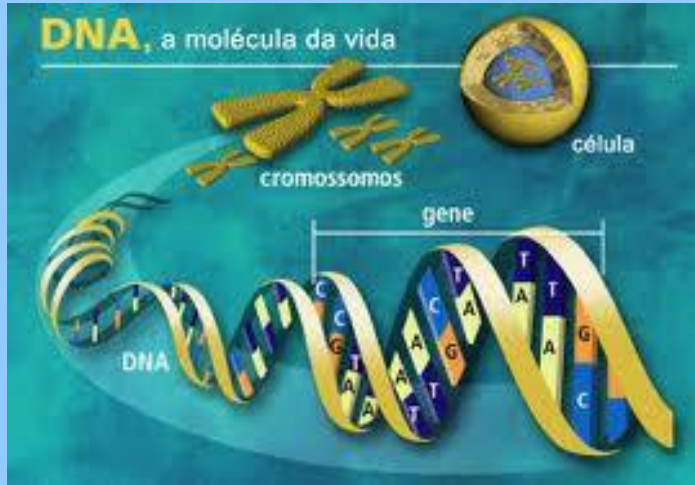
- Epigenética: Conrad H Waddington (1950)
- São alterações herdáveis na expressão gênica e organização da cromatina, sem modificações na seqüência de bases do DNA - **Reversíveis**



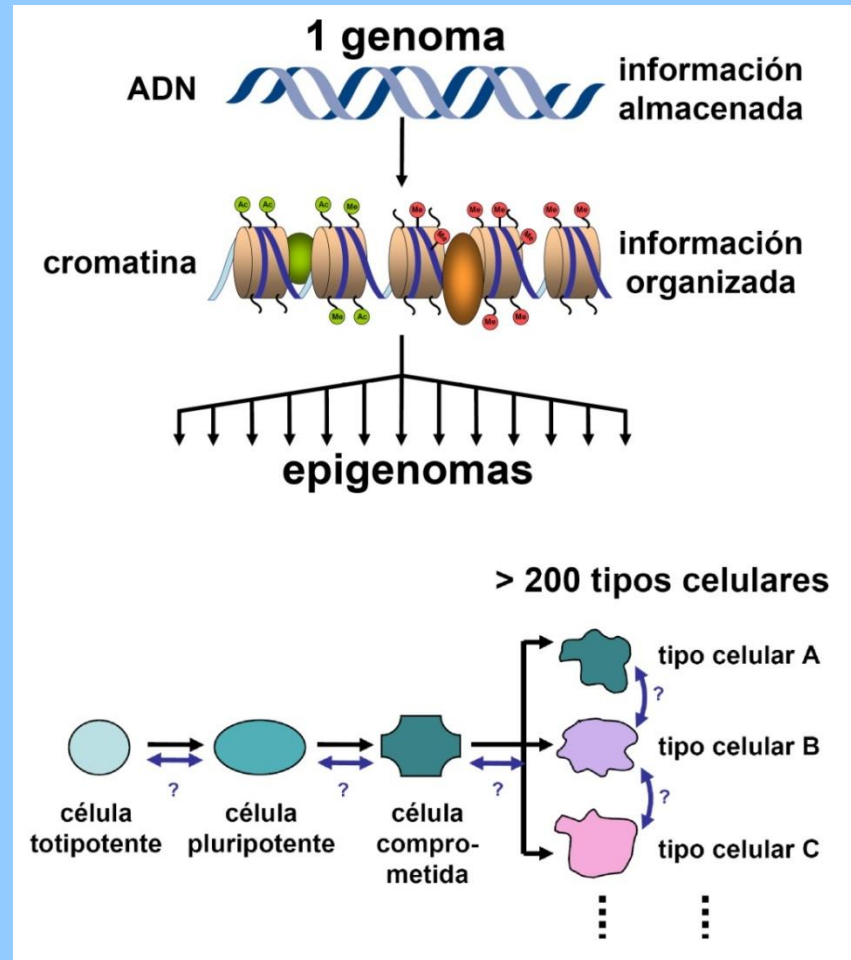
Pujadas & Feinberg (2012): modificações do DNA ou fatores associados que tem conteúdo de informação além da seqüência de DNA, as quais são mantidas durante a divisão celular, são influenciadas pelo ambiente, e causam mudanças estáveis na expressão gênica.

EPIGENOMA

GENOMA



Informação genética total nas células humanas (conteúdo de DNA):



Constitui a cromatina com suas modificações e associações de proteínas que fornece regulação epigenética

ONDE OS PROCESSOS EPIGENÉTICOS OCORREM?

▣ DNA → METILAÇÃO → Promotor
↓
Silenciamento

▣ HISTONAS

- ACETILAÇÃO
- METILAÇÃO
- BIOTINILAÇÃO
- FOSFORILAÇÃO
- UBIQUITINAÇÃO
- SUMOilação

“Código de histonas”

Compactação da cromatina

▣ ncRNA

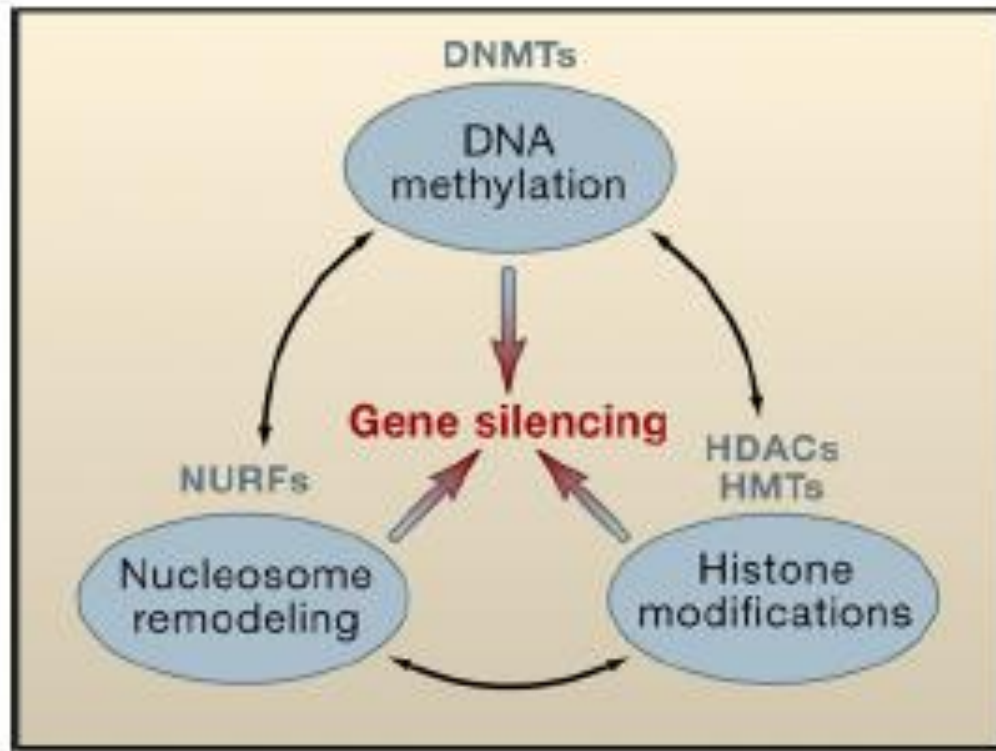


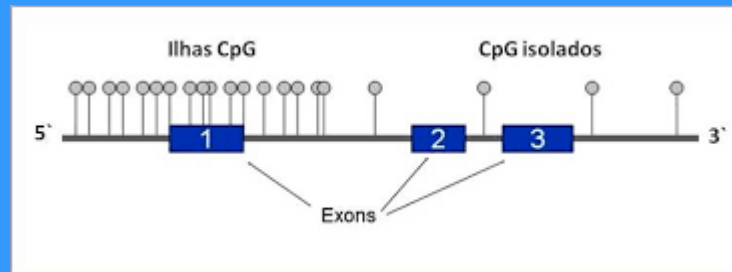
Figure 1. Gene Silencing in Normal Cells

Interação metilação do DNA, modificação das histonas e remodelamento dos nucleossomos → estão intimamente ligados → alterações nesses processos resultam no silenciamento de genes relevantes à doenças e câncer

METILAÇÃO DO DNA

Onde ocorre?

- ▣ **Dinucleotídeos 5'-CpG-3'**: união de uma citosina a uma guanina por uma ligação fosfodiéster na mesma fita de DNA → ilhas CpG → regiões promotoras dos genes
- ▣ **Ilhas CpG**: seq. DNA >200pb e conteúdo GC >50%

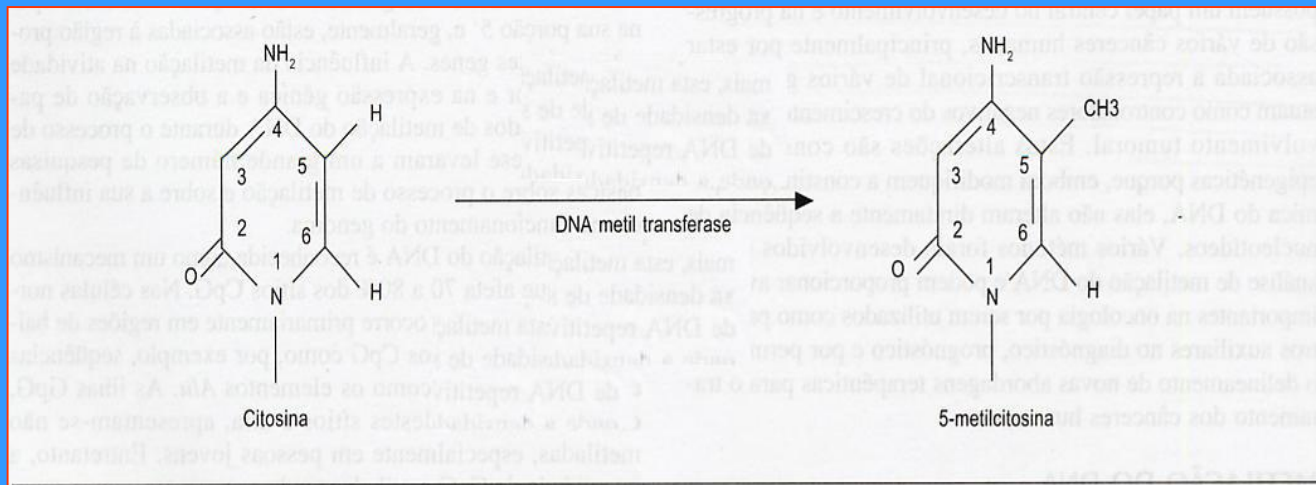


- ▣ **Metilação do DNA**: ocorre normalmente em cerca de 70 a 80% dos sítios CpG, sendo que essa porcentagem aumenta com o envelhecimento.

METILAÇÃO DO DNA

Como ocorre:

- Adição covalente de um grupo metil no carbono 5' da citosina na molécula de DNA → 5-metilcitosina



- Doador: S-adenosilmetionina (SAM)

- Catalisador: DNA-metiltransferases → DNMTs (vários tipos e isoformas)

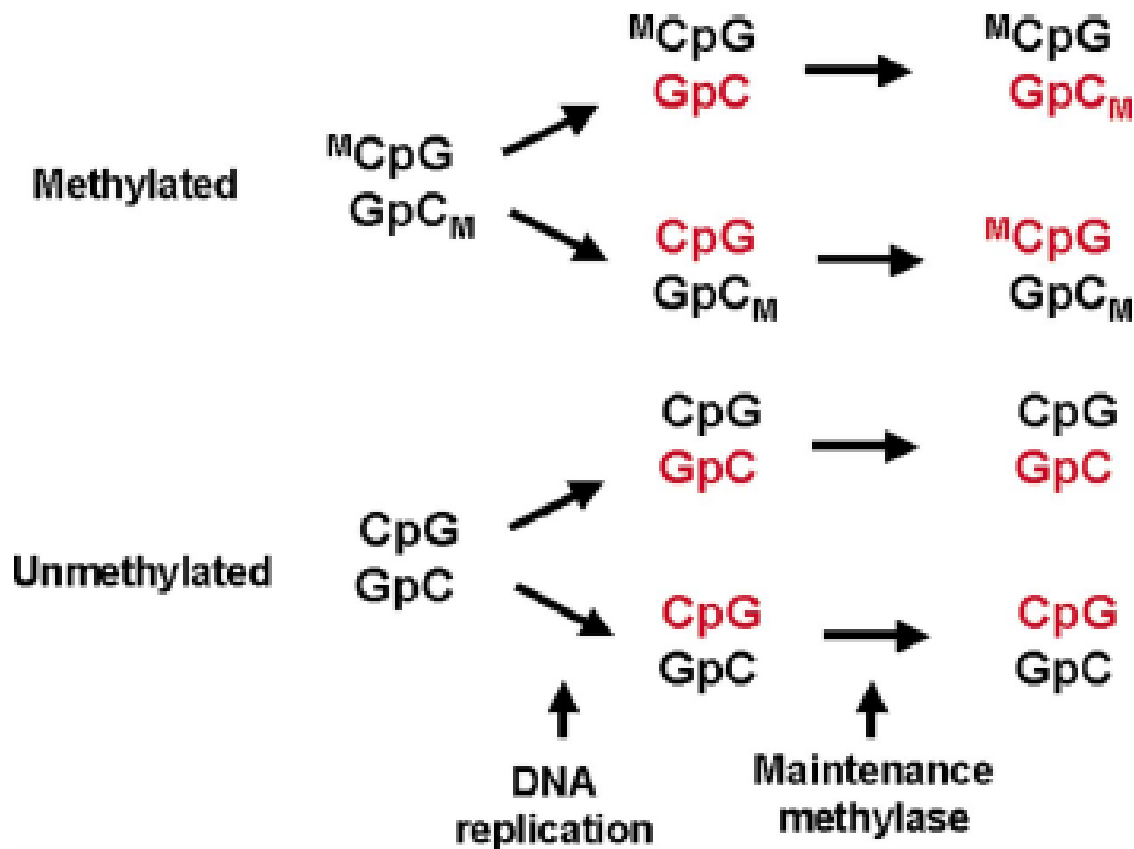


Figure 3 The maintenance methylase system preserves methylation status of CpG dinucleotides through mitosis. The parental strand of DNA is in black with the daughter strand in red. M = methyl group on C nucleotide.

DNMT1: atua no DNA hemimetilado durante a replicação → mantêm o padrão normal de metilação durante as divisões celulares

DNMT3A e DNMT3B : metilação *de novo* → envolvida no *imprinting* parental

METILAÇÃO DO DNA

A metilação pode ocorrer em 2 regiões ricas em dinucleotídeos CpG distintas:

- **Ilhas CpG:** região promotora (**HIPOMETILADAS**)

- **Regiões intergênicas** (regiões não codificadoras): DNA satélite, LINE e SINE (**HIPERMETILADAS**)

- heterocromatina pericentromérica – condensada e inativa

- retrotransposons; retrovirus endógenos ou sequências repetitivas

→ metilação pode estar envolvida como mecanismo de defesa do hospedeiro para prevenir a mobilização desses elementos e reduzir a ocorrência de rearranjos cromossômicos.

Função:

- É essencial para o desenvolvimento normal

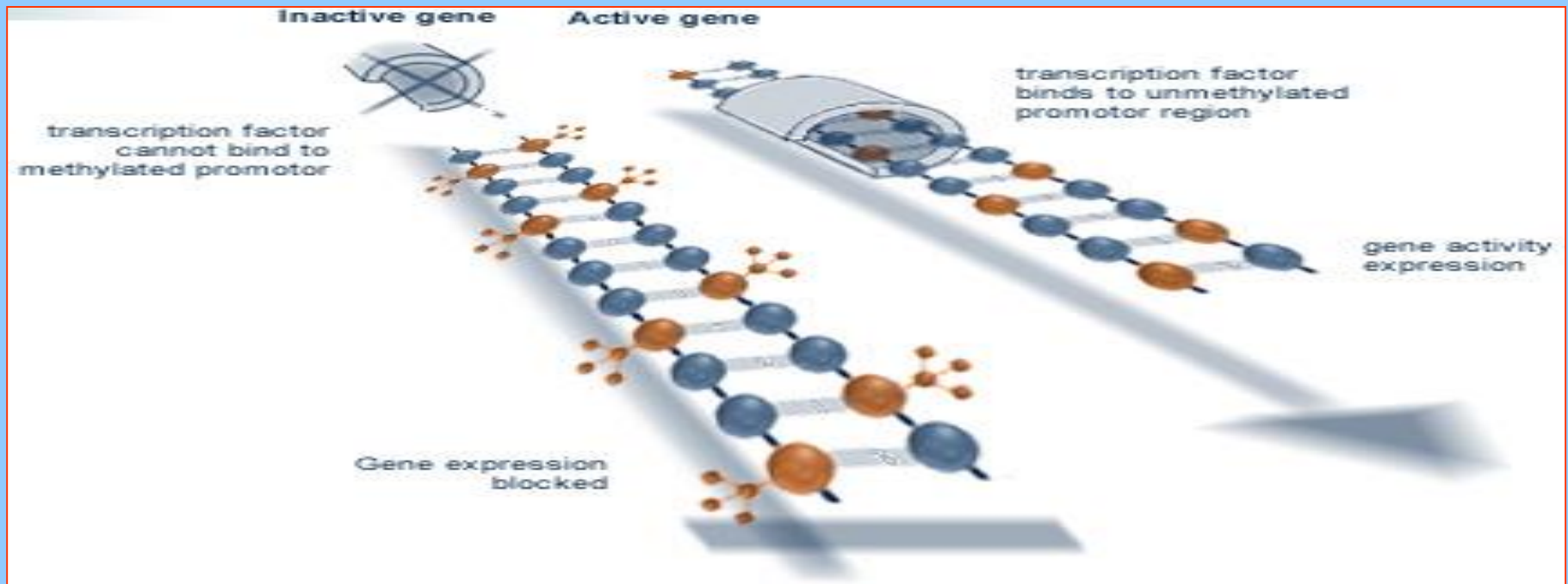
1. Ação no controle da expressão gênica

2. na integridade cromossômica

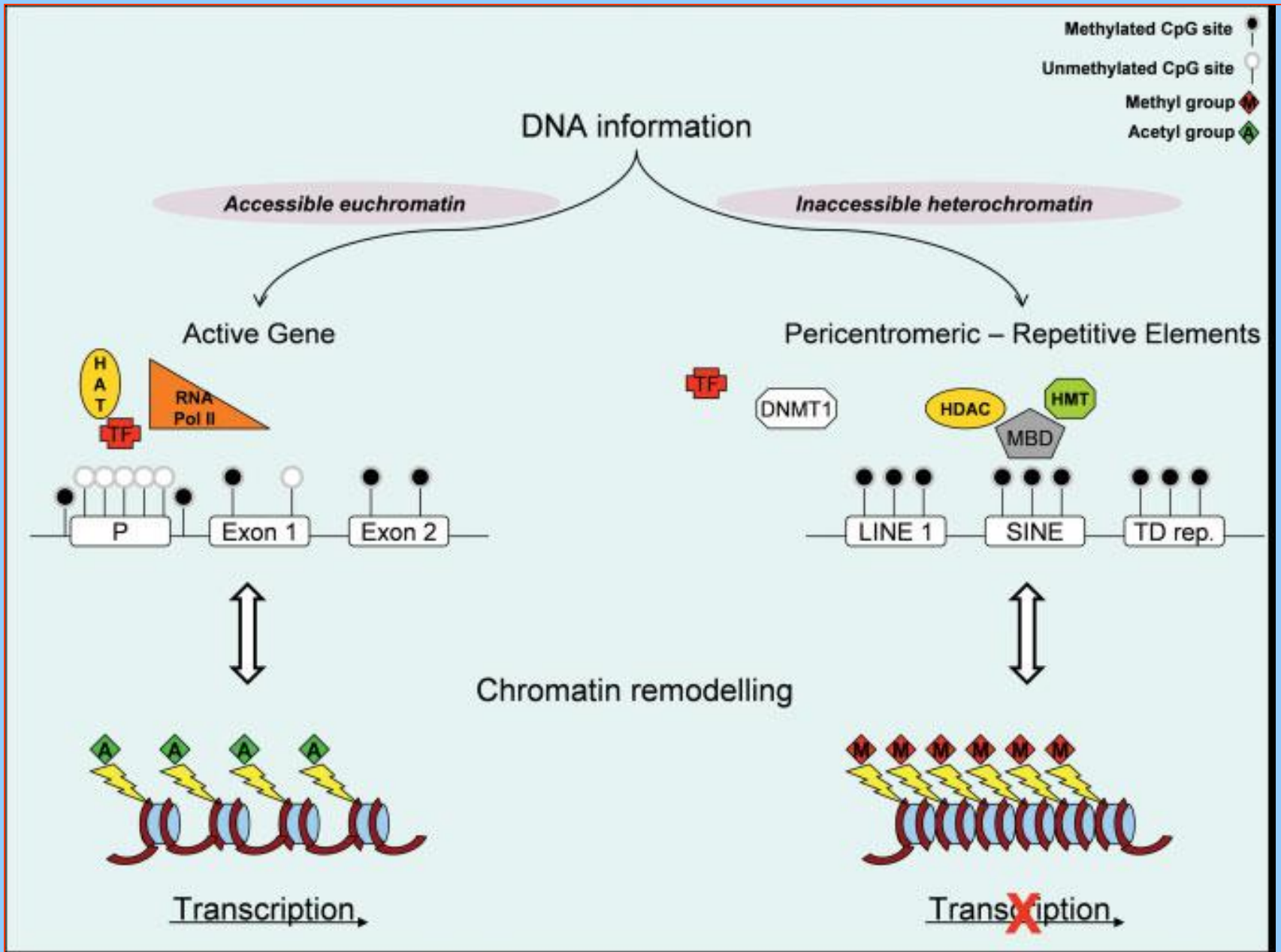
3. nos eventos de recombinação.

METILAÇÃO DO DNA

O resultado da metilação do DNA: silenciamento dos genes através da inibição direta ou indireta da ligação dos fatores de transcrição devido ao processo de metilação



REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO



HISTONAS

- Determinam grau de condensação da cromatina → reprime a transcrição
- Eventos epigenéticos: modificações na extremidade N-terminal

-Acetilação (lisina)

-Metilação (lisina ou arginina)

-Fosforilação (serina)

-Ubiquitinação (lisina)

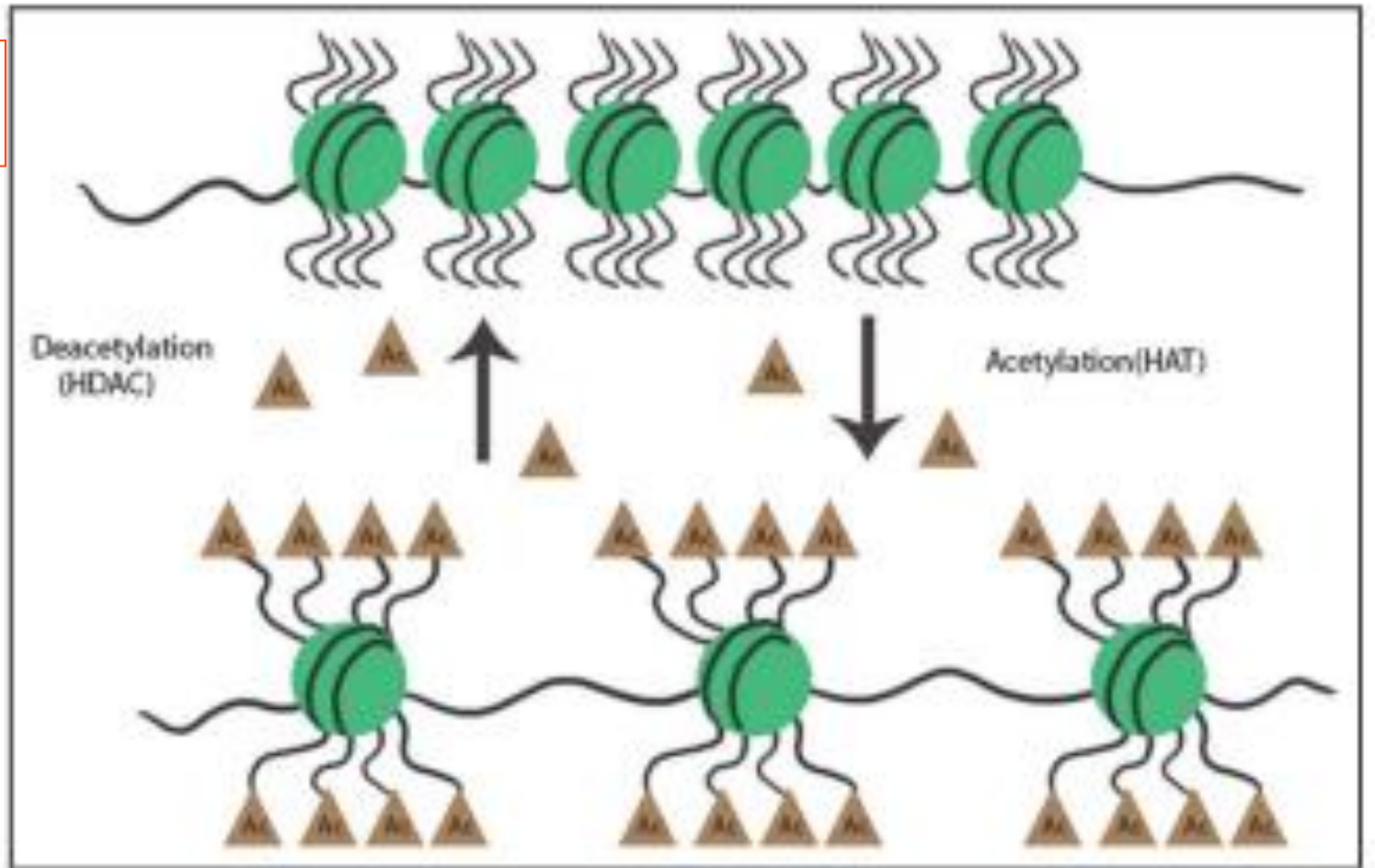
-Ribosilação

METILAÇÃO E ACETILAÇÃO DAS HISTONAS

- **Metilação:** metiltransferases de histonas (HMT) – adição de grupo metil em resíduos de lisina/arginina
 - **Desmetilação:** desmetilases de histonas (HDM)
 - **Acetilação:** acetiltransferases de histonas (HAT) – adição de grupos acetil nos resíduos de lisina das histonas H3 e H4 → abre a cromatina, ativa a transcrição. Ativação de vários genes inibitórios do crescimento tumoral
 - **Desacetilação:** desacetilases de histonas (HDACs) - removem grupos acetil das histonas - condensa a cromatina, impede a transcrição
- DNMTs:** recrutam HDACs e outras proteínas de ligação a cromatina no sítio promotor do gene para a desacetilação das histonas

Regulação da expressão gênica pela acetilação das histonas

Silenciamento
gênico



Expressão
gênica

CÓDIGO DE HISTONAS

METILAÇÃO HISTONAS

**TRANSCRIÇÃO
ATIVA** cromatina
aberta



Metilação da lisina

H3K4

H3K36

H3K79

HMT

(metiltransferases
de histonas)

**SILENCIAMENTO
GÊNICO**



Metilação da lisina

H3K9

H4K20

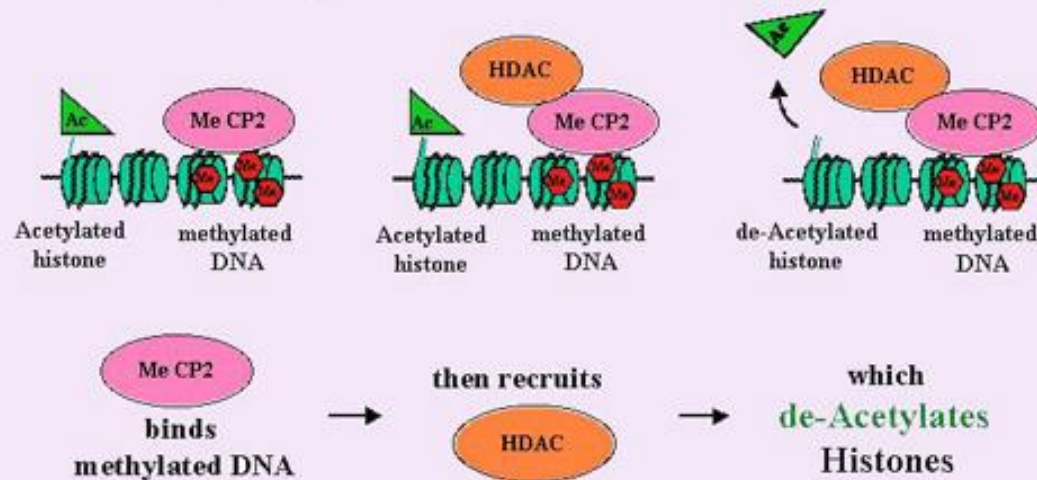
H1K26

H3K27

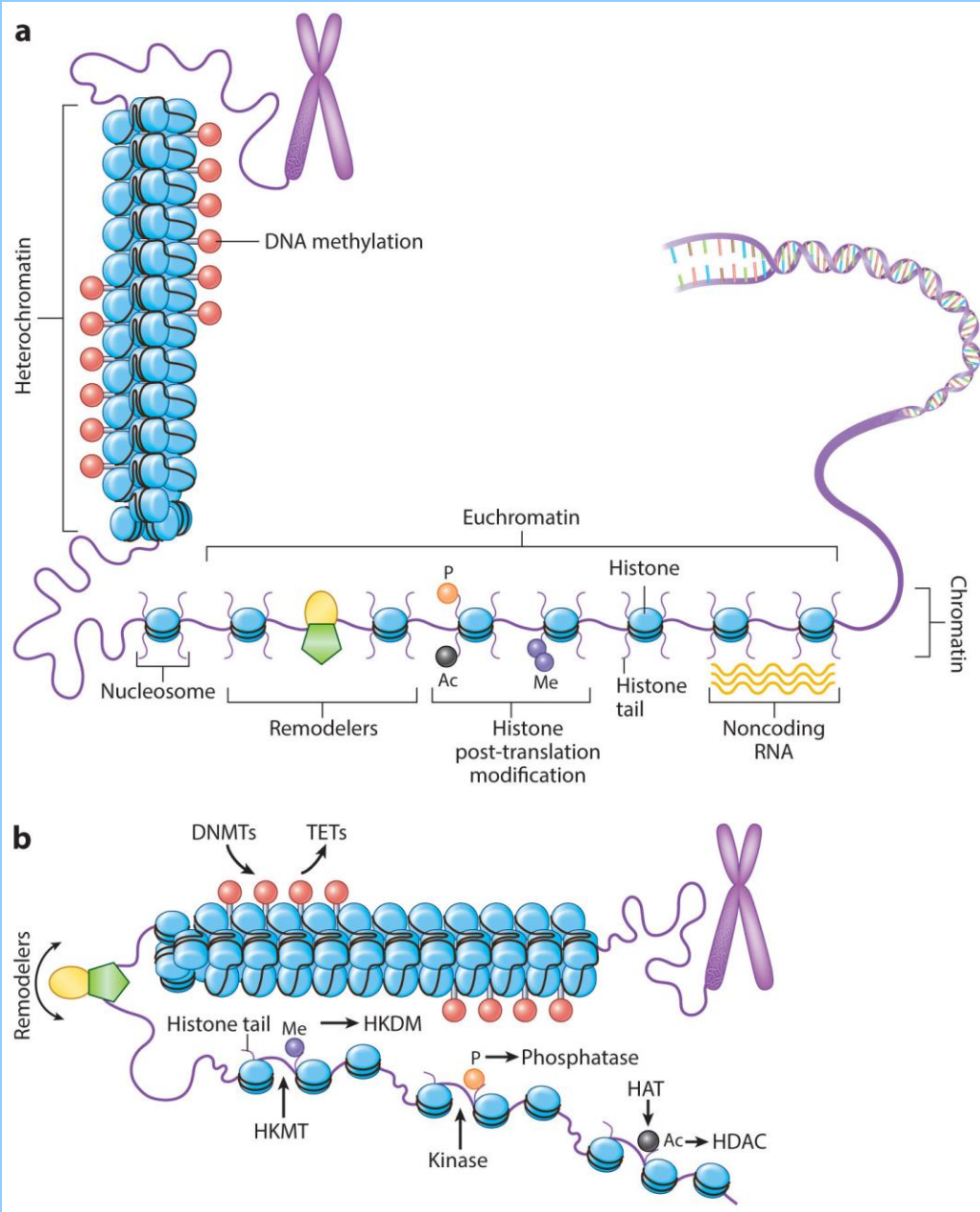
Table 1. Epigenetic changes and their function.

Epigenetic Change	Effect on Gene Expression	Enzyme Involved	Enzyme Removing Bond
Histone acetylation	Increase	Histone acetyl transferase (HAT)	Histone deacetylase (HDAC I-IV)
Histone phosphorylation	Increase	Kinase	Phosphorylase
Histone-3 Methylation			
4. Residue lysine methylation (H3-K4)	Increase	Histone methyl transferase (HMT)	Histone demethylase (HDM)
9. Residue lysine methylation (H3-K9)	Decrease		
27. Residue lysine methylation (H3-K27)	Decrease		
Histone Ubiquitination	Increase	Ubiquitin ligase	Ubiquitin protease
Histone Sumoylation	Decrease	SUMO E2/E3	SUMO protease
DNA Methylation	Decrease	DNA methyl transferase (DNMT)	DNA demethylase

DNA methylation induces Histone de-acetylation



MUDANÇAS DO EPIGENOMA



(a) **Estado Da Cromatina:** determina ativação ou silenciamento gênico conforme o posicionamento dos nucleosomos:

-**Heterocromatina:** conformação fechada – metilação do DNA e histonas desacetiladas

-**Eucromatina:** conformação aberta – sítios de início de transcrição dos nucleosomos livres e modificações das caudas de histonas: metilação e acetilação da lisina, fosforilação da serina, complexos remodeladores e ncRNAs

(b) **Controle das modificações das histonas e modificações do DNA:**

Metilação do DNA (DNMTs), metilação e acetilação de histonas (HKMT, HAT) TETs: proteínas de translocação (para metilação do DNA)

HKMT: metiltransferase da histona lisina

HAT: acetilase de histonas

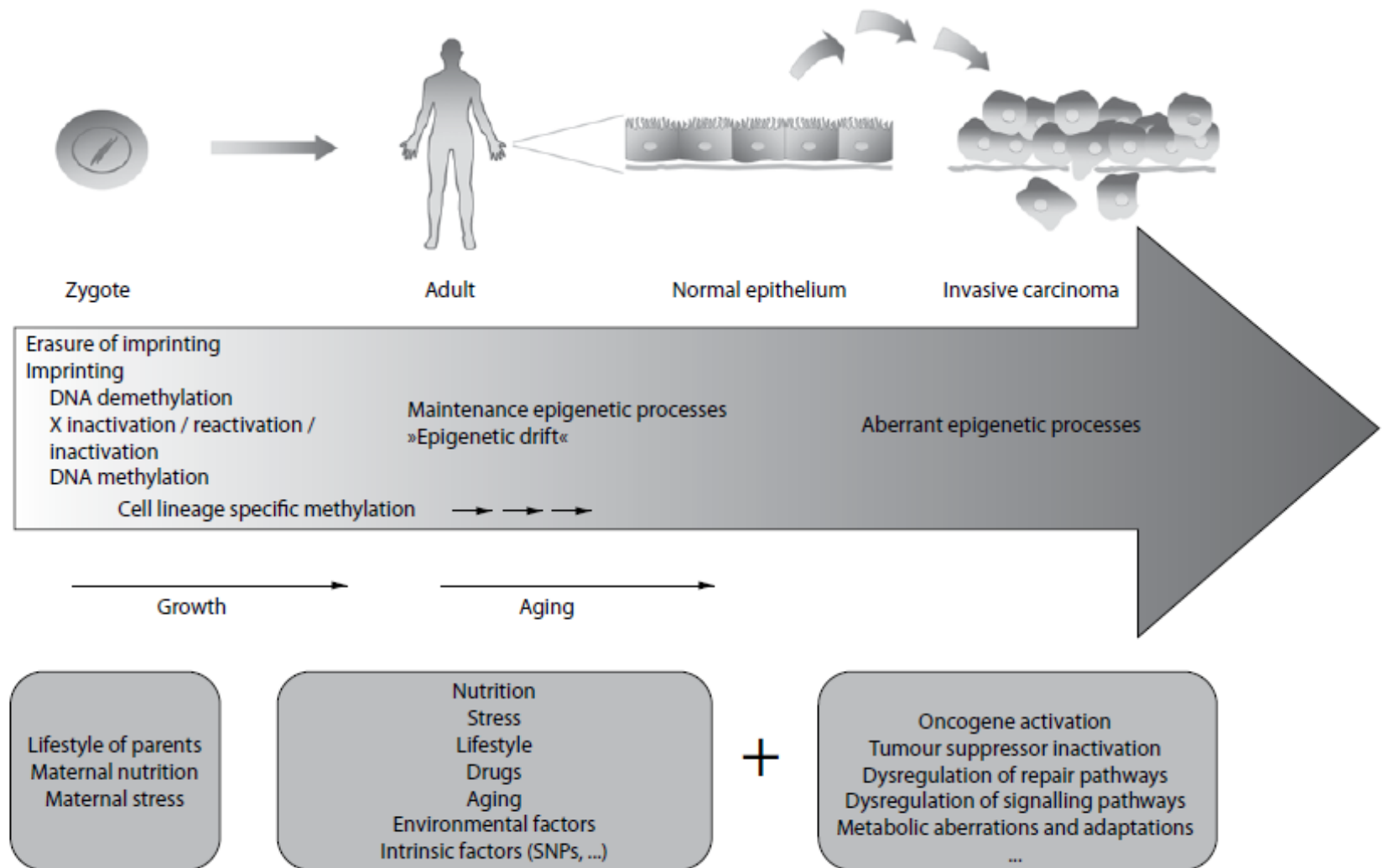
HKDM: desmetilase da histona lisina

HDAC: desacetilases de histonas

METILAÇÃO DO DNA: ENVELHECIMENTO E CÂNCER

Videtic Paska A, Hudler P.

Aberrant methylation patterns in cancer



METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

METILAÇÃO ANORMAL DNA

HIPOMETILAÇÃO GLOBAL

HIPERMETILAÇÃO DE ILHAS CpG

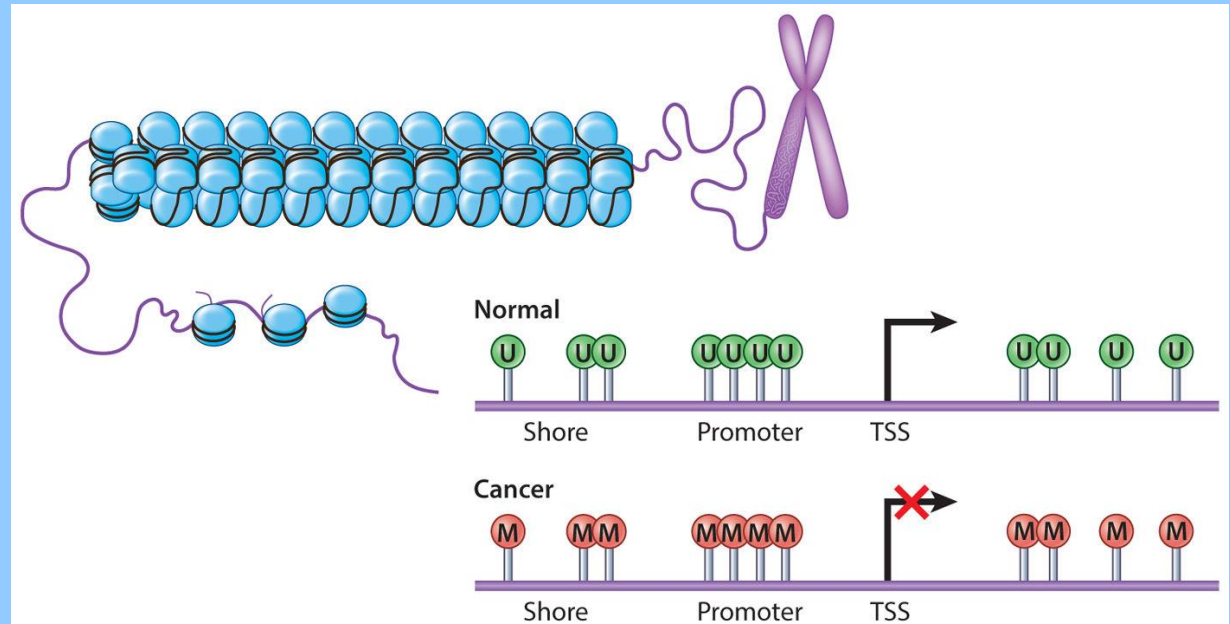
INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

ATIVAÇÃO DE ONCOGENES

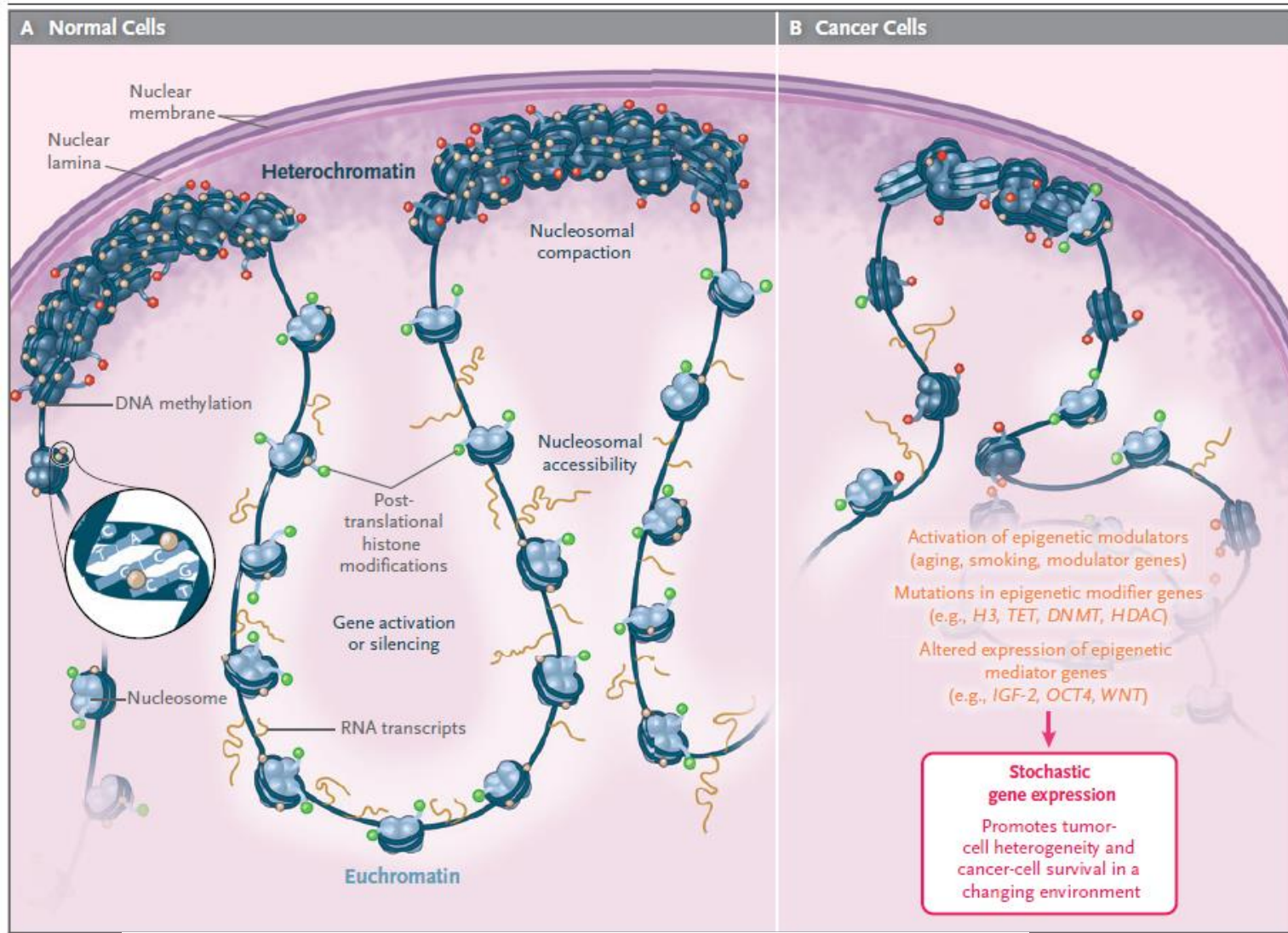
INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES TUMORAIS

INATIVAÇÃO DE GENES DE REPARO

reativação de genes silenciados: oncogenes



MUDANÇAS EPIGENÉTICAS NO CÂNCER



Ativação: marcas verdes; Silenciamento: marcas vermelhas

Câncer: os domínios de heterocromatina tornam-se eucromáticos

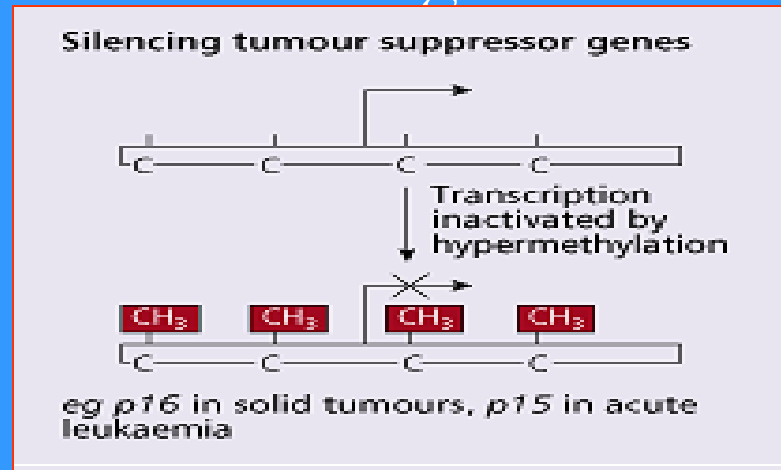
-ativação de moduladores epigenéticos

-mutações em genes modificadores epigenéticos

-Expressão alterada de genes mediadores epigenéticos

METILAÇÃO DO DNA E CARCINOGÊNESE

Hipermetilação de ilhas CpG: silenciamento de genes supressores tumorais e genes de reparo



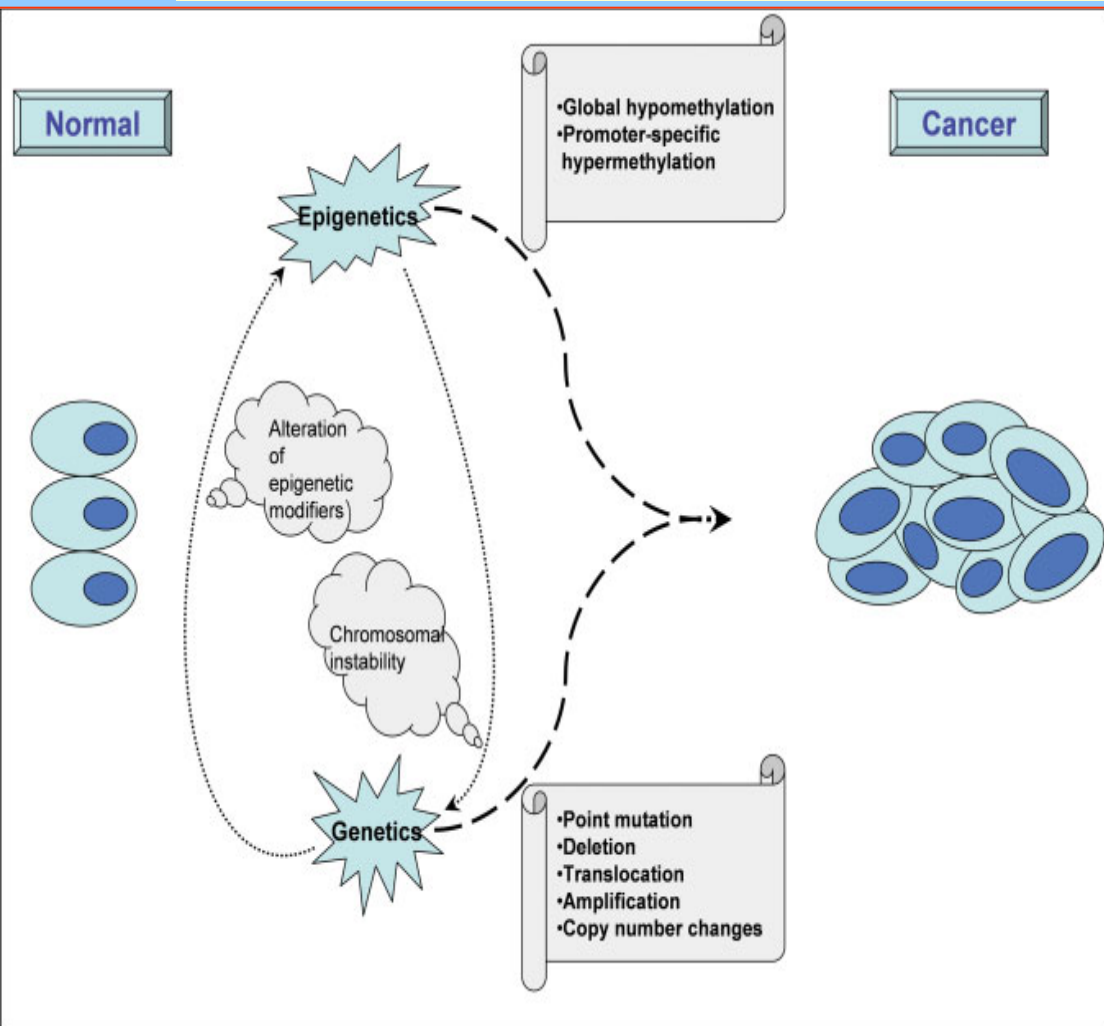
• **Hipótese de Dois Eventos Mutacionais:**

-1o. Mutação herdada ou somática

-2o. Deleção ou perda de heterozigosidade

ou **Inativação epigenética do gene (hipermetilação)**
no 1o. ou 2o. Evento

- **Inativação gênica epigenética: tão comum quanto a mutação no desenvolvimento do câncer**
- **Alterações epigenéticas: envolvidas na iniciação, progressão do câncer e metástase (alta frequência de mutações em genes que codificam proteínas que mantem o epigenoma normal)**



Alterações epigenéticas podem participar nas etapas precoces da iniciação do câncer

Silenciamento anormal de genes podem levar a uma expansão clonal de células aberrantes → fornecendo substrato para outras alterações genéticas ou epigenéticas subsequentes → **Progressão tumoral**

Principais cânceres associados com hipermetilação DNA: pulmão, gástrico, colorretal, leucemia, cérebro, fígado, mama e próstata

TABLE 1. Examples of Clinically Relevant Epigenetic Biomarkers

EPIGENETIC BIOMARKER	CLINICAL RELEVANCE	SUPPORTING LITERATURE	SENSITIVITY/SPECIFICITY/OR/HR
Hypermethylation of <i>GSTP1</i>	Diagnosis/early detection of prostate cancer	Calms 2001, ¹⁰⁶ Lee 1994, ¹⁰⁷ Eilers 2007 ¹²²	Sensitivity/specificity: 92%/86%
Hypermethylation of <i>DAPK</i>	Association with early recurrence and pathological stage in bladder cancer	Jainmalatte 2008, ¹⁰⁸ Catto 2005 ¹⁰⁹	OR, 2.2 (95% CI, 1.04-4.5)
Hypermethylation of <i>MGMT</i>	Predictor of response to carmustine and temozolomide in gliomas	Hegi 2005, ¹¹⁰ Esteller 2000 ¹¹¹	HR for death associated with nonmethylation, 9.5 (95% CI, 3.0-42.7) HR for progression of disease associated with nonmethylation, 10.8 (95% CI, 4.4-30.8)
CIMP	Subtype classification, risk stratification, and prognostic relevance in colorectal cancer, leukemias, MDS, etc.	Issa 2008, ⁶² Shen 2007, ⁵⁷ Issa 2005, ¹¹² Issa 2004, ¹¹³ Shen 2002, ¹¹⁴ Shen 2010 ¹²³	HR for overall survival in MDS patients, 1.68 (95% CI, 1.0-2.81) HR for progression-free survival in MDS patients, 1.95 (95% CI, 1.18-3.21)
CIMP	Correlation with favorable prognosis in gliomas	Noushmehr 2010 ¹¹⁵	G-CIMP status as an independent predictor of survival ($P < .01$)
CIMP	Determinant of poor prognosis in neuroblastomas	Abe 2005 ¹¹⁶	HR, 22.1 (95% CI, 5.3-93.4)
Promoter methylation of <i>p16</i> , <i>CDH13</i> , <i>RASSF1A</i> , and <i>APC</i>	Association with early recurrence in stage I NSCLC	Brock 2008 ¹¹⁷	OR of recurrent cancer, 25.25
Promoter methylation of <i>p16</i> and of <i>MGMT-RASSF1A-DAPK-PAX5</i> in plasma and sputum, respectively	Association with smoking and lung cancer risk	Belinsky 2005, ¹¹⁸ Belinsky 2006 ¹²⁰	OR for cancer development, 6.5 Sensitivity/specificity: 65%/65%
Quantitation of promoter methylation of <i>p16</i> , <i>p14^{del}</i> , <i>MGMT</i> , and <i>GSTP1</i>	Detection of bladder cancer in urine sediment DNA	Hoque 2006 ¹¹⁹	Sensitivity/specificity: 82%/96%
Global histone modification profiling in primary prostatectomy tissue samples	Correlation with prognosis and risk of recurrence in low-grade prostate cancer	Seligson 2005 ¹²⁰	HR, 9.2 (95% CI, 1.02-82.2)
microRNA signature	Association with clinical outcome (event-free survival) in cytogenetically normal AML patients with high-risk molecular features	Marcucci 2008 ¹²¹	HR for an event, 1.8 (95% CI, 1.0-3.0)

Padrões aberrantes de metilação e câncer:

• São específicos ao tecido e tumor → biomarcador do câncer

• tumores derivados de diferentes tecidos mostram padrão único de alterações de metilação do DNA

• Amostras de DNA derivadas do tumor → obtidas de biópsias, plasma, saliva, semen, fluidos gastrintestinal e broncoalveolar, urina e fezes

ESTRATÉGIAS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

- **Genes candidatos:** seleção de genes supressores de tumor associados ao câncer
- **Triagem do genoma-global** → sequenciamento de fragmentos de DNA com padrão alterado e microarrays

Câncer de pulmão:

hipermetilação dos genes: *MGMT*, *P16*, *RASSF1A*, *DAPK*, *RARβ* (soro dos pacientes) → marcador de câncer com sensibilidade de 51%

Câncer endometrial: secreção vaginal → hipermetilação *CDH12*, *HSPA2*, *MLH1*, *RASSF1A*, *SOCS2*

Câncer de próstata:

hipermetilação nos genes:

GSTP1 → distingue lesão benigna de maligna

RARβ → estágio mais avançado

Câncer de bexiga: urina

Hipermetilação de *RB*, *P16*, *P14*, *APC*, *RASSF1A*

Perfil de metilação do DNA:

Triagem populacional p/detecção precoce de câncer específico → testes não invasivos

HIPERMETILAÇÃO DAS ILHAS CpG

Causas da metilação aumentada (durante envelhecimento e carcinogênese):

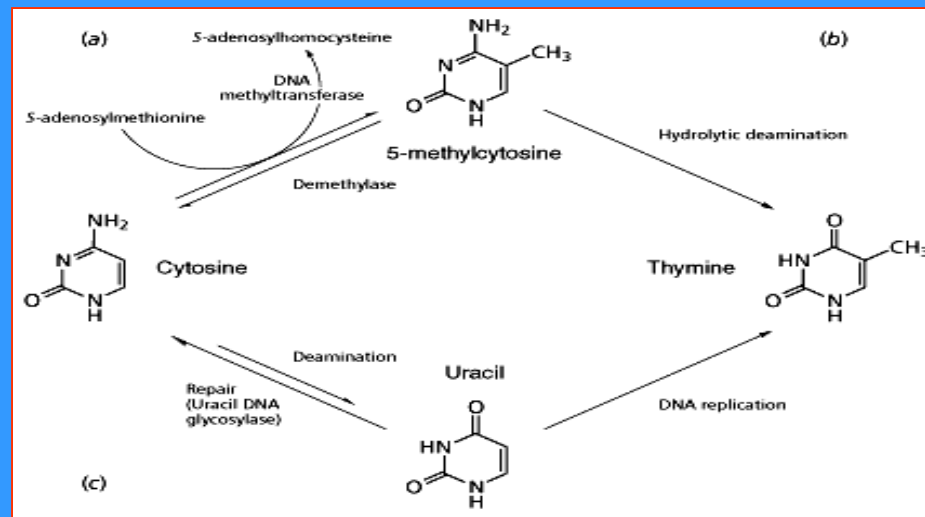
- Processo casual que resulta de erros durante a duplicação do DNA.

- Erros de pareamento, reconhecidos pelas DNA metiltransferases que provêm a hipermetilação.

- Exposição a agentes como: radiação, fumo, níquel e outros agentes químicos diversos.

PONTOS QUENTES DE MUTAÇÃO

Desaminação espontânea da 5-Metilcitosina em Timina → mutação de ponto (C-G para T-A), podendo alterar a função dos oncogenes e dos genes supressores tumorais.



Podem ocorrer devido aos padrões de metilações alterados que afetam indiretamente a atividade gênica.

Métodos de Análise dos Processos Epigenéticos

Mapeamento do Metiloma

- Enzimas de restrição sensíveis à metilação + PCR
- PCR-metilação específica (MS-PCR)
- Sequenciamento
- Microarray
- HRM (High Resolution Melting)

TABLE 1. Commonly used techniques for locus specific DNA methylation determination based on bisulfite sequencing with potential for translation into clinical practice.

Method	Advantages	Disadvantages
Methylation specific PCR (MSP-PCR)	Very sensitive. Cost-effective.	Need for two different pairs of primers, one for methylated DNA and one for non-methylated. Risk for false positive results if primer design is not appropriate. Only qualitative.
SMART-MSP	Low rate of false positive results. High sensitivity. Closed tube technique – low risk for sample contamination.	Determination of methylated DNA only. Not suitable for detection of heterogeneous methylation.
MethyLight	Very high analytical sensitivity. Low false positive rates. Closed tube technique – low risk for sample contamination.	Only for detection of methylated DNA. When samples with heterogeneous DNA methylation are analysed it is only semi-quantitative.
Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM)	Useful for screening purposes – high throughput, inexpensive, fast. Real - time tracking of methylation status. Applicable also for small amounts of DNA. Closed tube technique – low risk for sample contamination.	Information on methylation degree based on standard curve analysis – semi-quantitative. No information on specific sites of methylation – patterns are hard to recognize.
Sanger sequencing of bisulfite treated DNA	Data on complete sequence composition. Relatively long sequence reads possible.	Only semi - quantitative. Low quality results at the beginning of the reads.
Pyrosequencing	Quantitative analysis of individual CpG islands with real - time monitoring. Appropriate for degraded formalin-fixed, paraffin - embedded (FFPE) samples.	Relatively short sequences (~ 50 nucleotides) can be reliably analysed.
Next generation sequencing	High throughput. Data on complete sequence reads – genetic and epigenetic data. Quantitative.	Need for high-quality DNA. Relatively labour demanding. Still associated with high costs. Currently used / applicable for research use only. Purchase of an expensive instrument is required.
MassARRAY EpiTYPER	Quantitative analysis, high throughput, applicable for heterogeneous DNA methylation patterns.	Investment into expensive instruments is required.

Métodos de análise dos Processos Epigenéticos

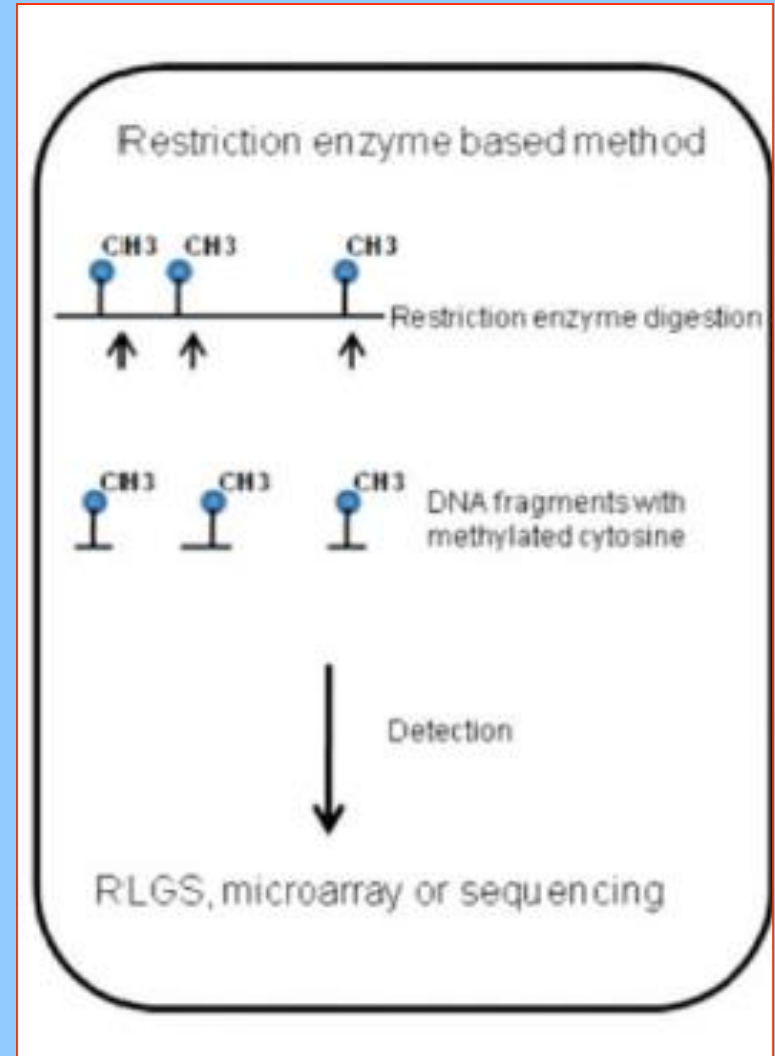
- Materias utilizados: urina, saliva, sangue, escovados, fragmentos de biópsias



Enzimas de restrição sensíveis à metilação

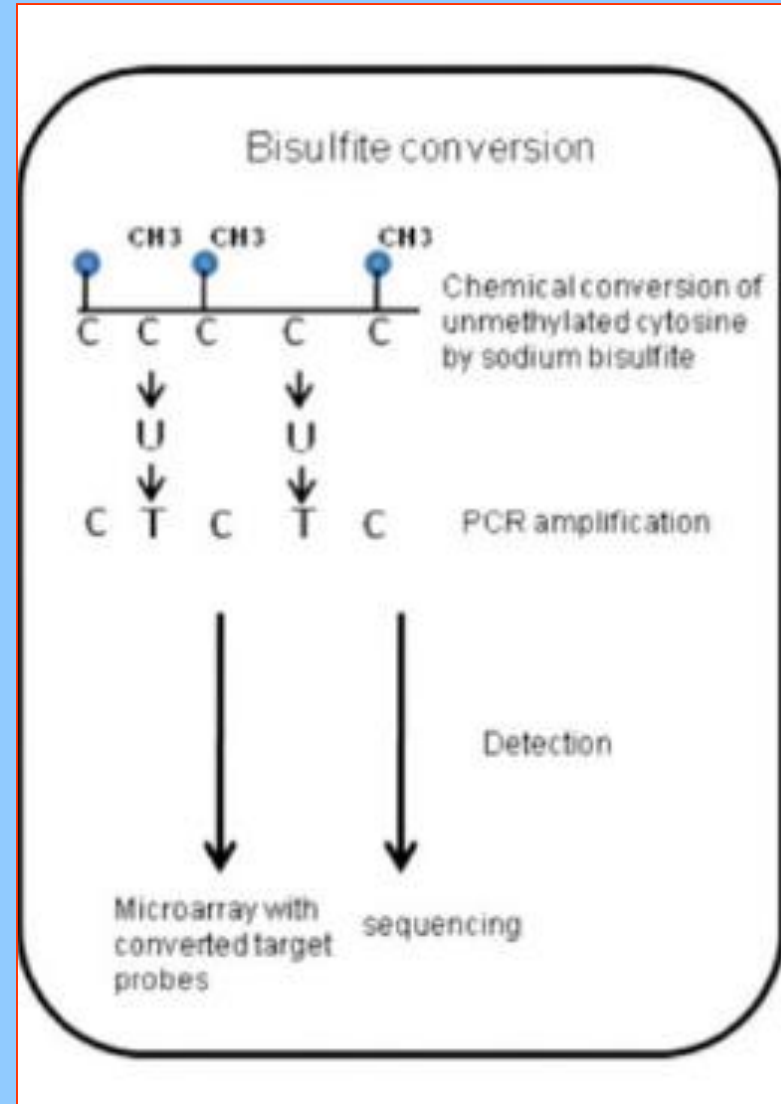
Metilação Diferencial

- Endonuclease *HpaII*- cliva o DNA no sítio CCGG quando a citosina interna não está metilada
- Endonuclease *MspI*- cliva o DNA no sítio CCGG na presença ou ausência de metilação
- PCR: amplificação de uma banda específica no DNA digerido com *HpaII* e ausência de amplificação no DNA digerido com *MspI*.



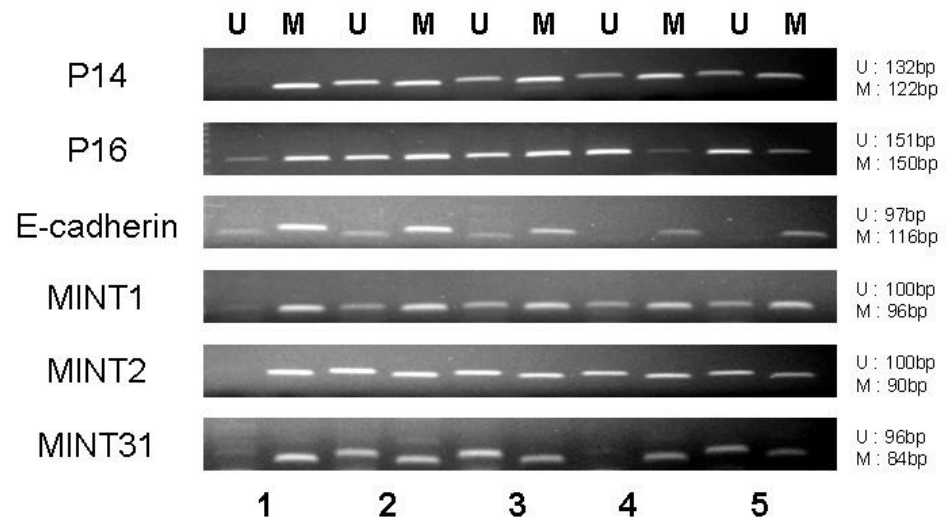
MS - PCR

- Tratamento do DNA com bissulfito de sódio
- Conversão de citosinas não metiladas em uracila
- PCR: 2 reações separadas (2 pares *primers*: seq. metilada e não metilada)
- Eletroforese: gel poliacrilamida



MS - PCR

- DNA isolado de carcinoma prostático (C) e hiperplasia benigna prostática (B)
- Gene *GSTP1*: hipermetilação em mais de 90% dos CA prostáticos
- Ausência de metilação em tumores benignos



U : unmethylated band M : methylated band

1 : RKO control

2,3 : 24hrs after treatment with 8, 16uM of 5-aza-2'-deoxycytidine

4,5 : 48hrs after treatment with 8, 16uM of 5-aza-2'-deoxycytidine

SEQUENCIAMENTO

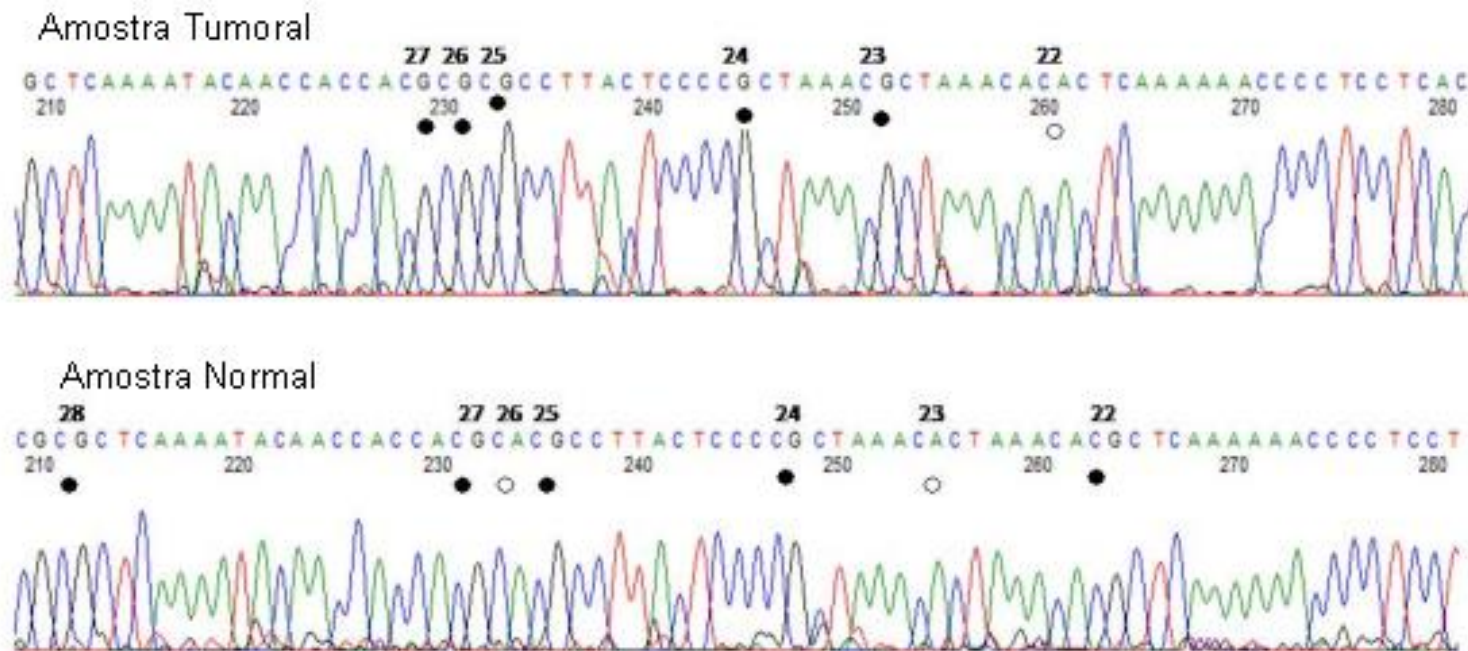
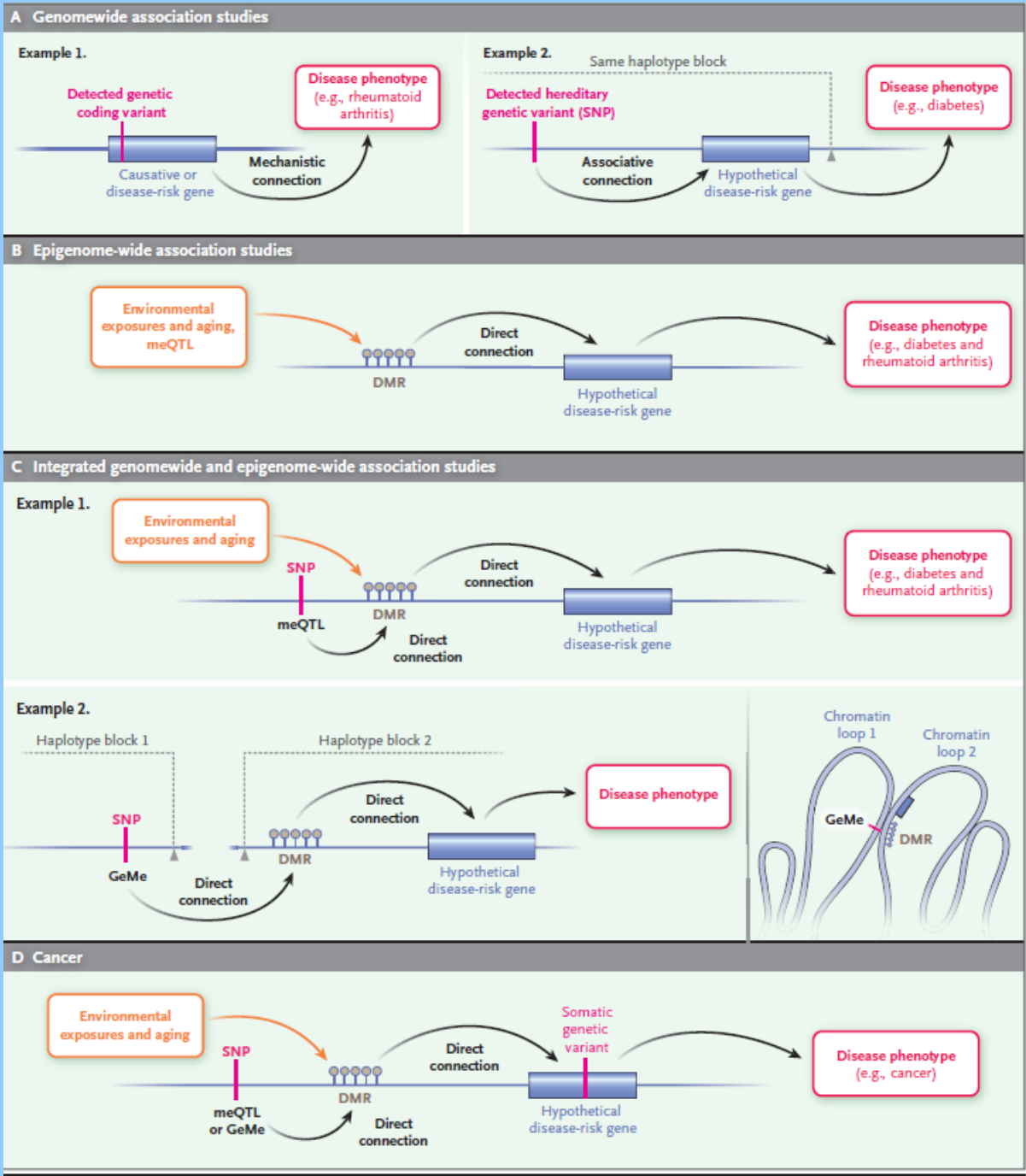


Figura 21: Seqüência do gene GPC3 fragmento F2 com os dinucleotídeos CpG metilados na amostra tumoral e na amostra de tecido normal. ● = dinucleotídeo CpG metilado, ○ = dinucleotídeo CpG não-metilado.



Epigenética para estudos epidemiológicos:

Doenças comuns: Câncer, diabetes, etc, podem ser melhor entendidos pela combinação de estudos de associação do genoma convencional (GWAS) e estudos de associação do epigenoma

A: GWAS Convencional: liga uma seq. de DNA variante ou SNP para um gene, para uma doença conhecida

B: Epigenome-wide association studies: liga uma exposição ambiental e envelhecimento para uma mudança de metilação do DNA e subsequentemente para uma doença

C: Estudo Integrado de associação genomewide e epigenomewide: considera ambas exposição genética e ambiental relacionando variantes genéticas à mudanças epigenéticas (methylation quantitative trait locus [meQTL]) em doenças como diabetes e artrite reumatóide. Esta combinação pode identificar variants genéticas que regulam marcas epigenéticas (clusters of DNA methylation under genetic control [GeMes]) através de blocos de desequilíbrio de ligação.

D: Epigenética do câncer: enriquece a genética do câncer convencional por incluir exposição ambiental e mudanças epigenéticas juntas com variants genéticas hereditárias e risco para doenças.

DMR: regiões diferencialmente metiladas

TERAPIA EPIGENÉTICA

- Todo processo epigenético tem potencial de ser revertido → a sequência de DNA do gene metilado permanece inalterada
- Marcador molecular para diagnóstico precoce do câncer
- **Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos:**
 - **inibidor de metilação (análogos de nucleosídeos): 1970-1990**
 - síndrome mielodisplásica e leucemias
 - 5-azacitidina (Vidaza) e 2'-desoxi-5azacitidina (Decitabine ou Dacogen) → aprovado para uso clínico - efeito citotóxico e mutagênico
 - após conversão é incorporada no DNA no lugar da citosina → DNMTs inativadas → inibição da metilação



Podem desreprimir genes supressores de tumor silenciados e restaurar sua função normal

Ligação covalente irreversível com DNMT após sua incorporação no DNA

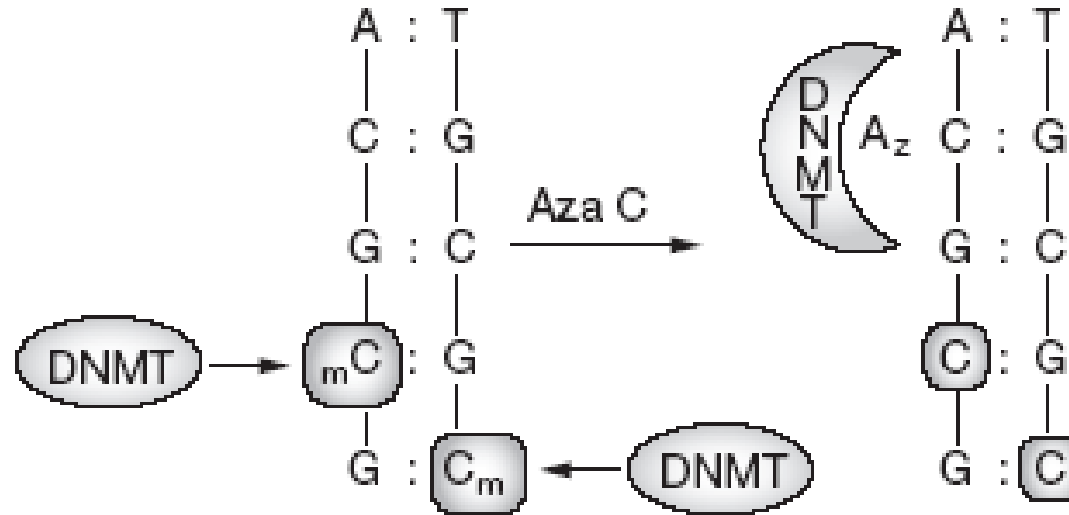
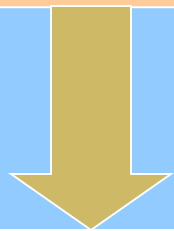
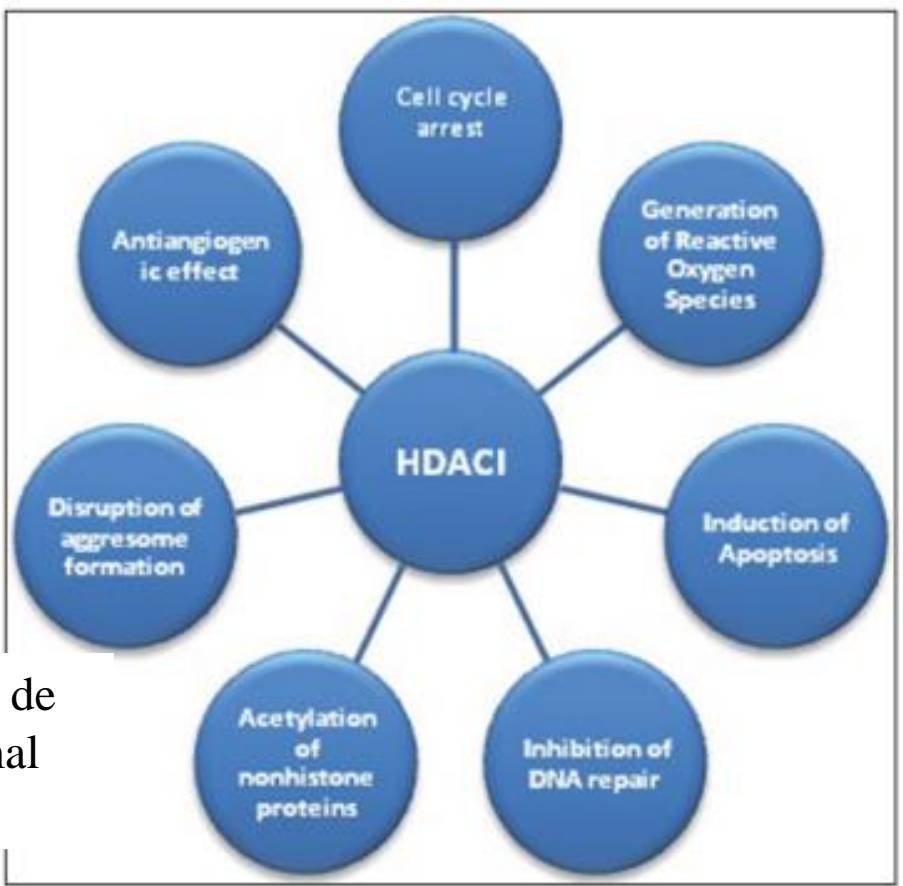


Figure 4 Hypomethylation and gene reactivation by azacitidine. Treatment with azacitidine results in its incorporation into DNA in place of cytosine residues.

•O efeito do tratamento não é estável → o estado de hipermetilação e silenciamento gênico recorre após cessação de tratamento → manutenção da terapia

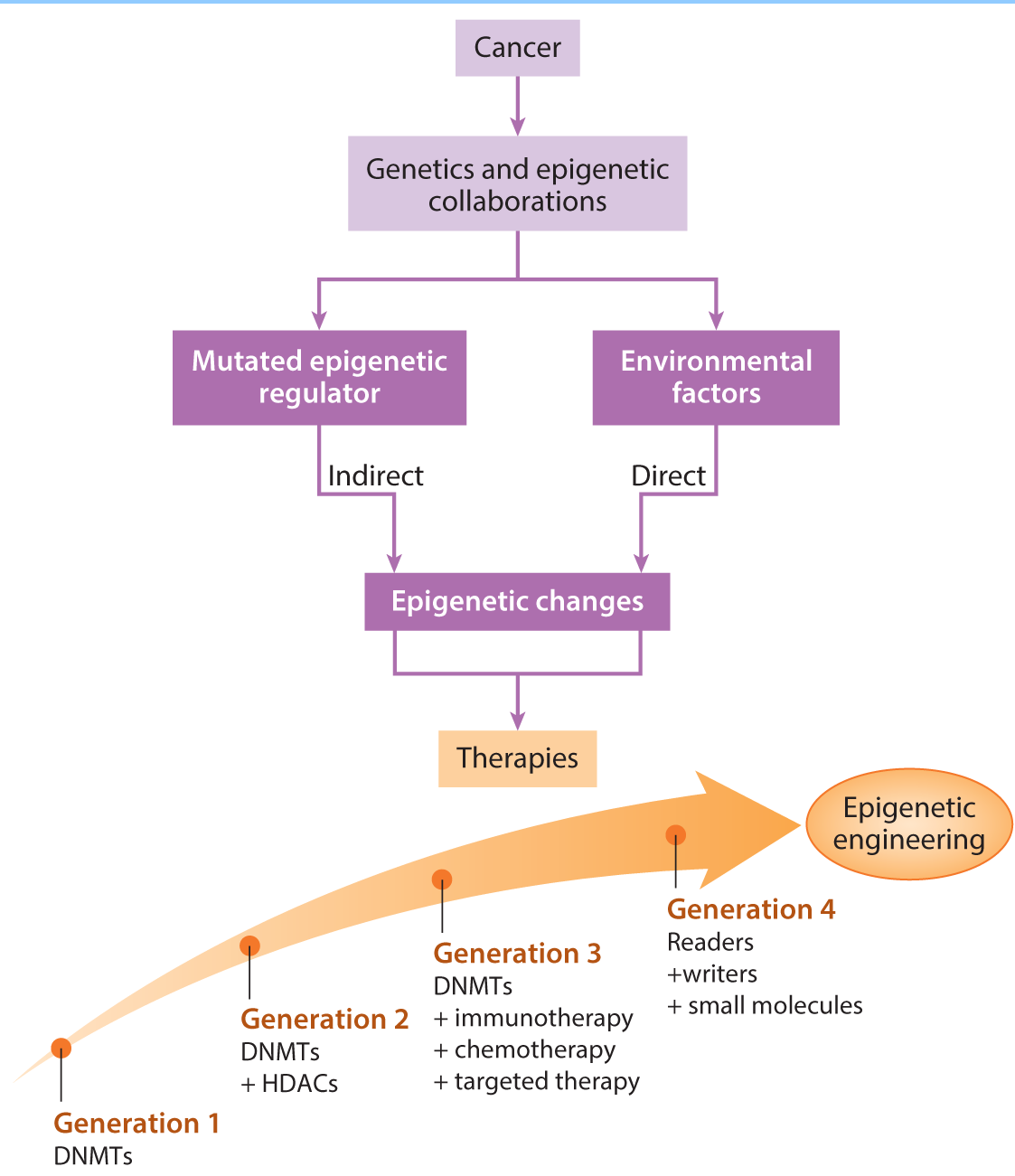
- inibidores de HDAC (desacetilação de histonas): HDACI: promove acetilação das histonas ⇒ ativação gênica
- câncer mostra alteração no balanço entre HAT e HDAC.
- HDAC: exercem efeito pró-oncogênico (silenciamento de genes de apoptose e parada do ciclo celular)
- inibidores de HDAC (HDACI): terapia anti-câncer



Ex.: ácido valpróico,
-tricostatina,
-derivados do ácido hidroxâmico,
-derivados de benzamida

degradação de proteínas mal dobradas

AVANÇOS DA TERAPIA EPIGENÉTICA



-Tratamentos baseados na justaposição de eventos mutacionais e alterações epigenéticas

-Câncer pode ter efeito direto sobre o epigenoma, resultante de inflamação crônica, infecção viral ou mudanças do microbioma, ou ainda efeitos indiretos devido a mutações em genes “drivers” epigenéticos.

-Terapia epigenética envolve várias gerações de terapias

TABLE 2. US Food and Drug Administration-Approved Epigenetic-Acting Drugs

EPIGENETIC-ACTING DRUG	CLINICAL INDICATION	MAJOR DATA	SUPPORTING LITERATURE
DNA methyltransferase inhibitors			
5-azacytidine (azacitidine) Aprovada FDA 2004	Symptomatic MDS	16% overall response rate; 66% hematologic improvement/transfusion independence	Kaminskas 2005 ¹³⁷ Fenaux 2009 ¹³⁸
5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) Aprovada FDA 2006	Intermediate and High-risk MDS	73% objective response rate; 34% complete response rate	Kantarjian 2007 ¹³⁹
Histone deacetylase inhibitors			
Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) Aprovada FDA 2006	Progressive, persistent, or recurrent cutaneous T-cell lymphoma	30% objective response rate	Mann 2007 ¹⁴⁰
Romidepsin (depsipeptide)	Progressive, persistent, or recurrent cutaneous T-cell lymphoma	34% overall response rate; 6% complete response rate	Piekarz 2009 ¹⁴¹

MDS indicates myelodysplastic syndrome.

-Tratamento também de tumores sólidos: glioblastoma, câncer de mama, câncer gastrintestinal e de tireóide

-usado em combinação com inibidores de metilação (efeito aditivo ou sinérgico)

-Combinação com quimio ou radioterapia

Desvantagens

- Não são específicas → reativação indiscriminada de genes (elementos repetitivos ou genes imprintados), apesar que atuam apenas em células em divisão → assim células normais sem divisão não são afetadas → leva a desbalanços alélicos, instabilidade genômica e ativação de retrotransposons;
- As drogas atuam preferencialmente em genes que tornaram-se anormalmente silenciados no câncer → provavelmente devido mudanças do estado de compactação da cromatina em genes silenciados patologicamente como no câncer;
- Efeitos colaterais: toxicidade gastrointestinal, náuseas, vômitos, diarreia, trombo e neutropenia...

CONSEQÜÊNCIAS DOS PROCESSOS EPIGENÉTICOS

- O silenciamento dos genes através de fenômenos epigenéticos nem sempre acarreta problemas.

Exemplos de eventos em que isso ocorre:

1. Regulação da expressão gênica:

- Inativação do X
- *Imprinting* genômico

2. Proteção do genoma contra invasão de seqüências de fora do organismo, por exemplo *DNA viral* (inativado por adição de metila)

3. Processos neoplásicos

IMPRINTING GENÔMICO

É um subgrupo distinto de regulação epigenética em que a atividade de um gene é reversivelmente modificada dependendo do sexo do genitor que o transmitiu

- Processo em que genes específicos são diferencialmente “marcados” durante a gametogênese parental → expressão diferencial de alelos dependendo da origem materna ou paterna

- Assegura a expressão transcricional herdada paternalmente ou maternalmente

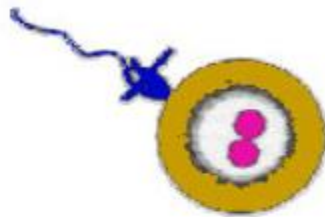
- Somente um dos 2 alelos parentais herdados é normalmente expresso e o outro alelo é reprimido (maioria imprinting materno)

- Expressão monoalélica devido ao padrão de metilação

- *Imprinting* pode ser tecido específico ou tipo celular específico: AS → expressão monoalélica em neurônios mas não na glia.

IMPRINTING GENÔMICO

- ❑ **1984:** ovos de camundongos manipulados com 2 pró-núcleos maternos (**ginogenoto**) ou 2 pró-núcleos paternos (**androgenoto**) → não desenvolviam normalmente e não sobreviviam
- ❑ **Ginogenoto:** formação do embrião, mas pobre desenvolvimento de tecido extra-embriônico
- ❑ **Androgenoto:** melhor formação de tecido extra-embriônico, mas pobre desenvolvimento do embrião



Zigoto com dois pronúcleos maternos

Desenvolvimento de do embrião com tecidos extraembriônicos deficientes



Zigoto com dois pronúcleos paternos

Desenvolvimento de tecidos extraembriônicos em um embrião não viável

Diploidia

Uniparental: presença de 2 genomas haplóides (materno ou paterno)

Imprinting genômico

▣ 1991

- Igf2r
- H19 | Ativos só se herdados da mãe
- Igf2 | (ativo só se herdado do pai)

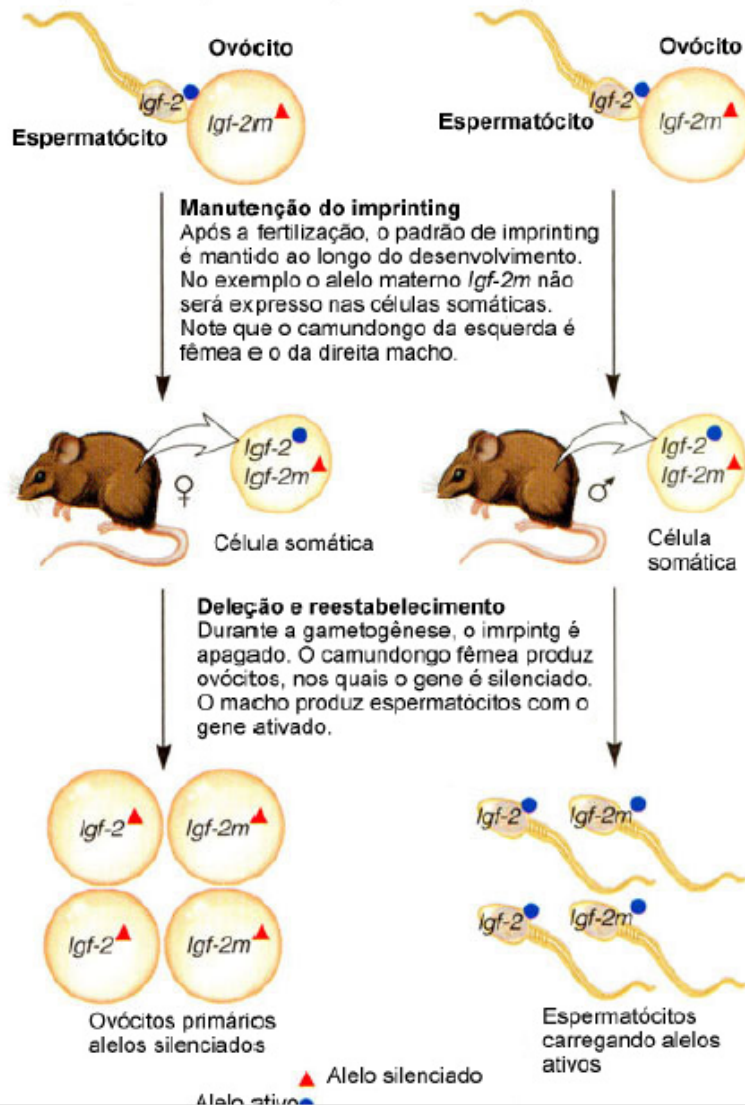
▣ 2001

- Mais de 40 genes com efeito de *imprinting*
 - ▣ mecdin
 - ▣ UBE3A | Prader-willi e Angelman syndromes
 - ▣ p53 (gene de supressão tumoral envolvido no neuroblastoma)
 - ▣ peg3
 - ▣ Igf2 | Afetam o desenvolvimento embrionário
 - ▣ possam existir 100 a 500 genes imprintados???

ESTABELECIMENTO DO IMPRINTING

Estabelecimento do imprinting

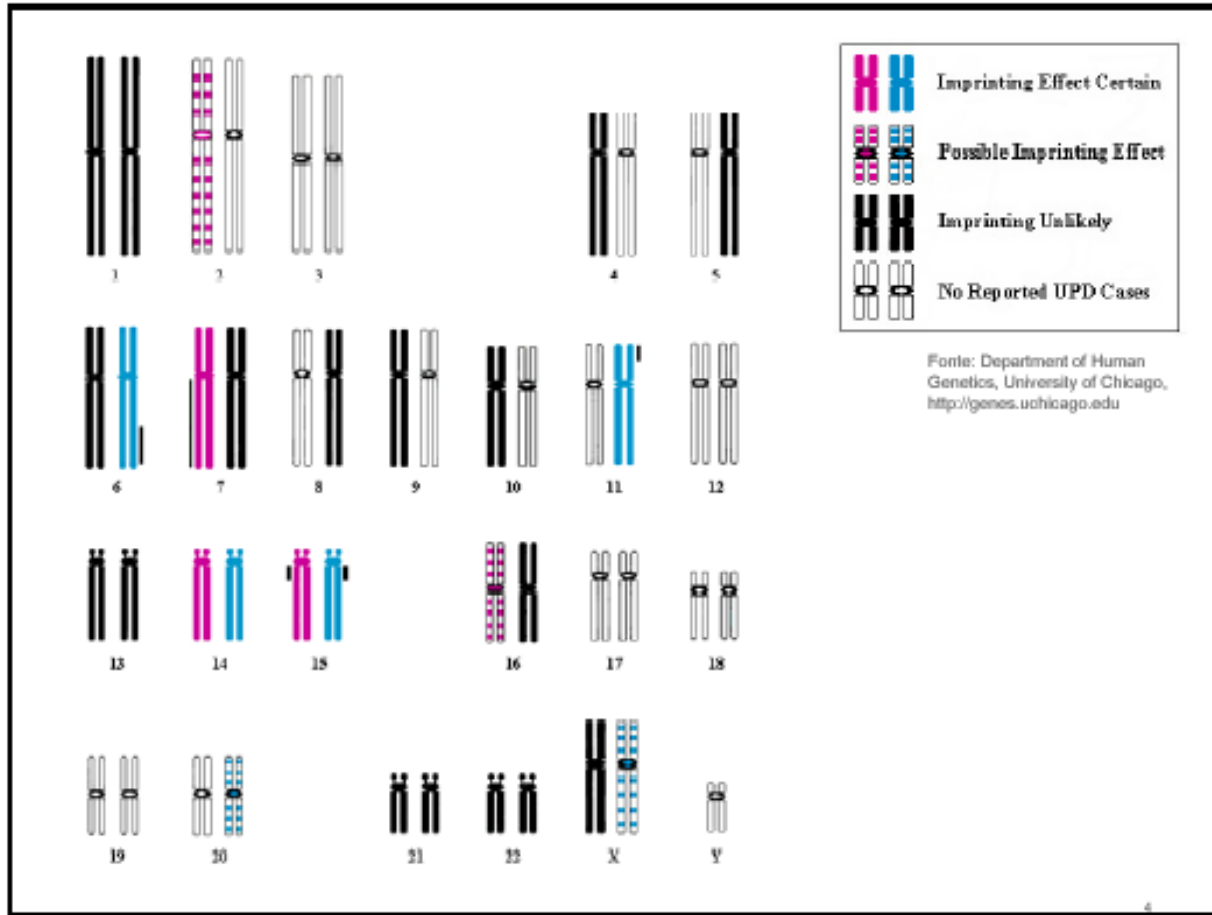
Neste exemplo, o imprinting ocorre no gene *Igf2* que existe nas formas *Igf2* no macho e *Igf2m* na fêmea. O imprinting ocorre de maneira que somente o alelo paterno é expresso.



Os mecanismos de “imprinting” ocorrem em numerosas espécies de insetos, plantas e mamíferos. Este mecanismo pode implicar um simples gene, parte de um cromossomo, um cromossomo inteiro ou todos os cromossomos de um dos pais.

“Imprinting” de genomas pode estar envolvido na escolha do cromossomo X a ser desativado, pois pode influenciar na escolha do cromossomo a ser desativado

IMPRINTING GENÔMICO



Imprinting confirmado:

Materno: 7, 14 e 15

Paterno: 6, 11, 14 e 15

2004: 75 transcritos
imprintados de 13

cromossomos diferentes

Erros:

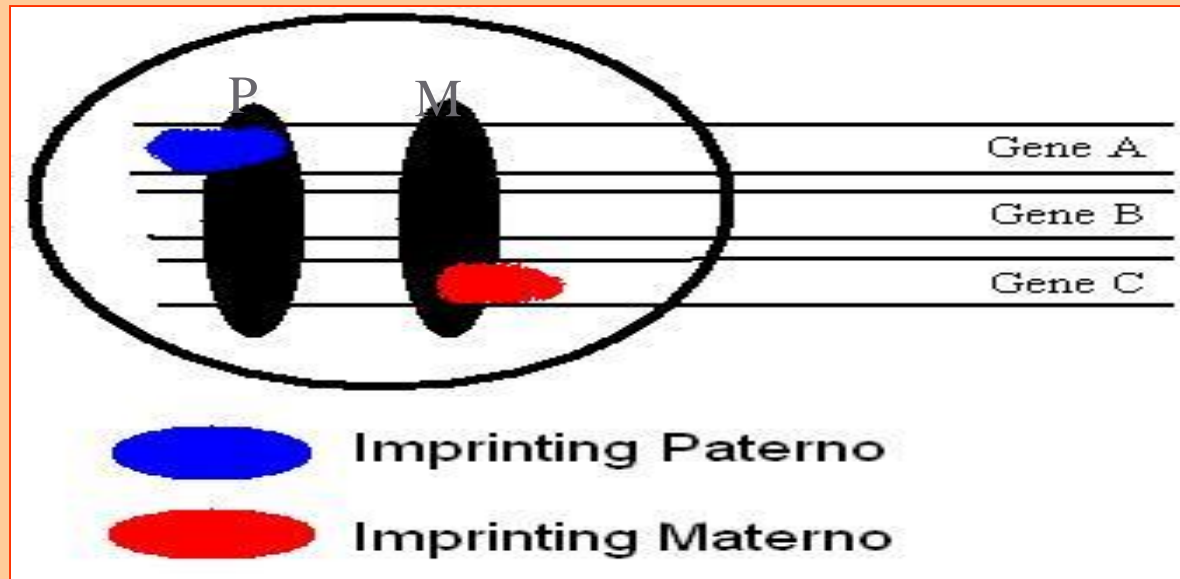
UPD: dissomia
uniparental

Imprinting
defeituoso

Genes imprintados atuam no crescimento embrionário e desenvolvimento e outros influenciam o comportamento após nascimento.

Consequência Funcional: Para que serve

- Funcionalmente estes genes serão haplóides.



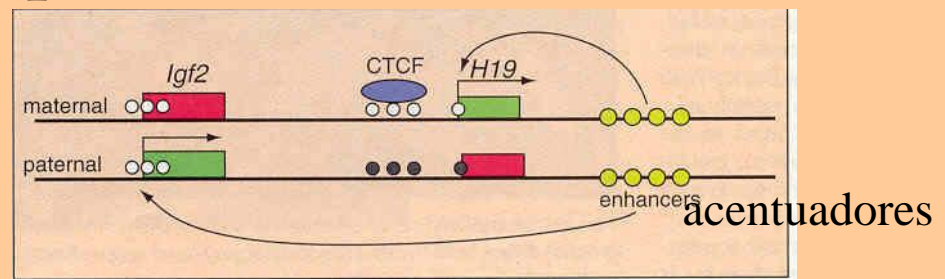
- -gene A tem somente expressão “materna” (alelo paterno inexpressivo)
- -gene C somente “paterna” (alelo materno inexpressivo).
- O produto de ambos é o normal e suficiente para o funcionamento da célula.
- -gene B tem expressão em ambos os alelos, seu produto também é normal para o funcionamento da célula.

Imprinting genômico

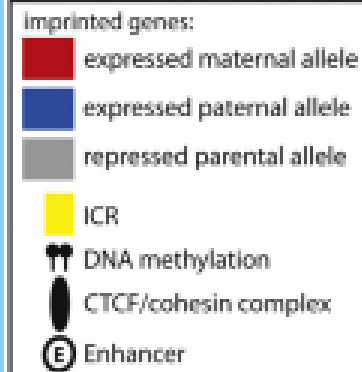
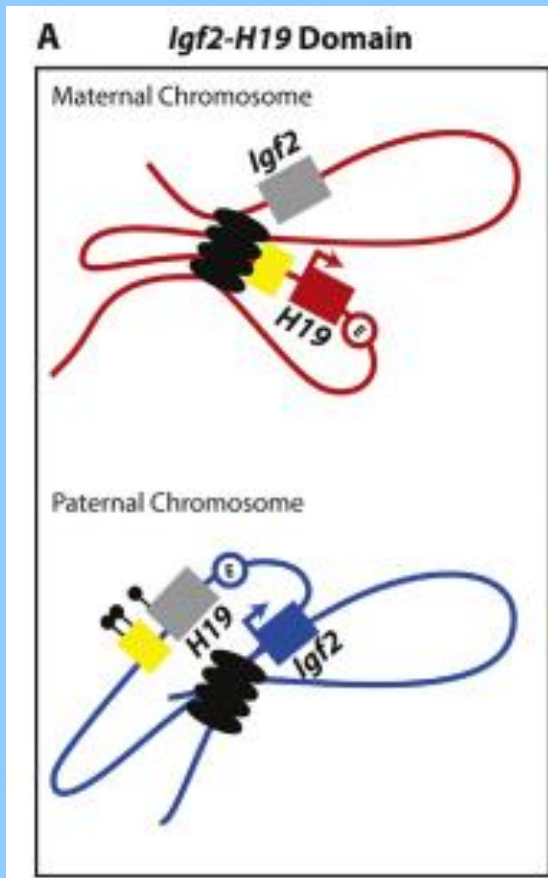
- Metilação está habitualmente envolvida quer ativando ou inativando os genes
- Genes *imprinted* estão presentes em clusters

- Ex:

- H19^p/Igf2^m(11p15.5)
- DKK1/GTL2 (14q32)



- Um dos genes origina 1 proteína o outro RNA não traduzido (cerca de 25% dos genes *imprinted* não originam proteínas-ncRNA)
- Os genes são separados por ilhas CpG as quais são locais de ligação de CTCF, formando uma fronteira cromossômica



CTCF: liga-se ao alelo IgF2 e H19 não metilado – manutenção somática de alelos não metilados no embrião.

Controle da expressão gênica de domínios imprintados:

-no cromossomo materno, CTCF liga-se ao ICR do alelo materno H19 não metilado – formação de alça que previne IgF2 interagir com o “Enhancer” abaixo de H19.

Imprinting genômico - H19/IGF2 e doenças

H19/IGF2: ganho de metilação aberrante da ICR do locus H19/IGF2 - expressão aumentada de IGF2 - super crescimento somático e tumores embrionários (10% casos de SBW)

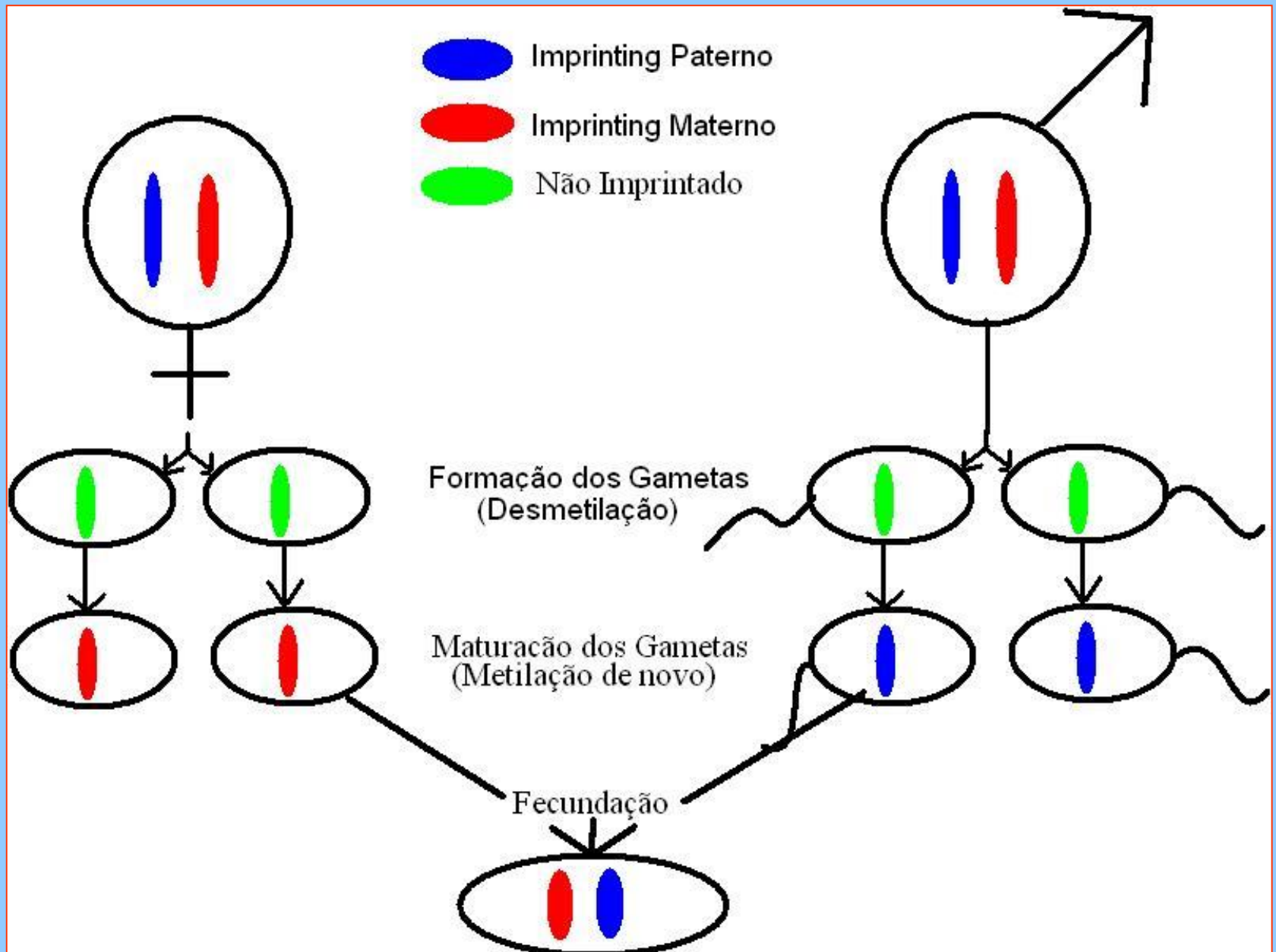
-câncer: tumor de Wilms (renal), colorretal, pulmão, mama e próstata

-Síndrome Beckwith Wiedemann (11p15)

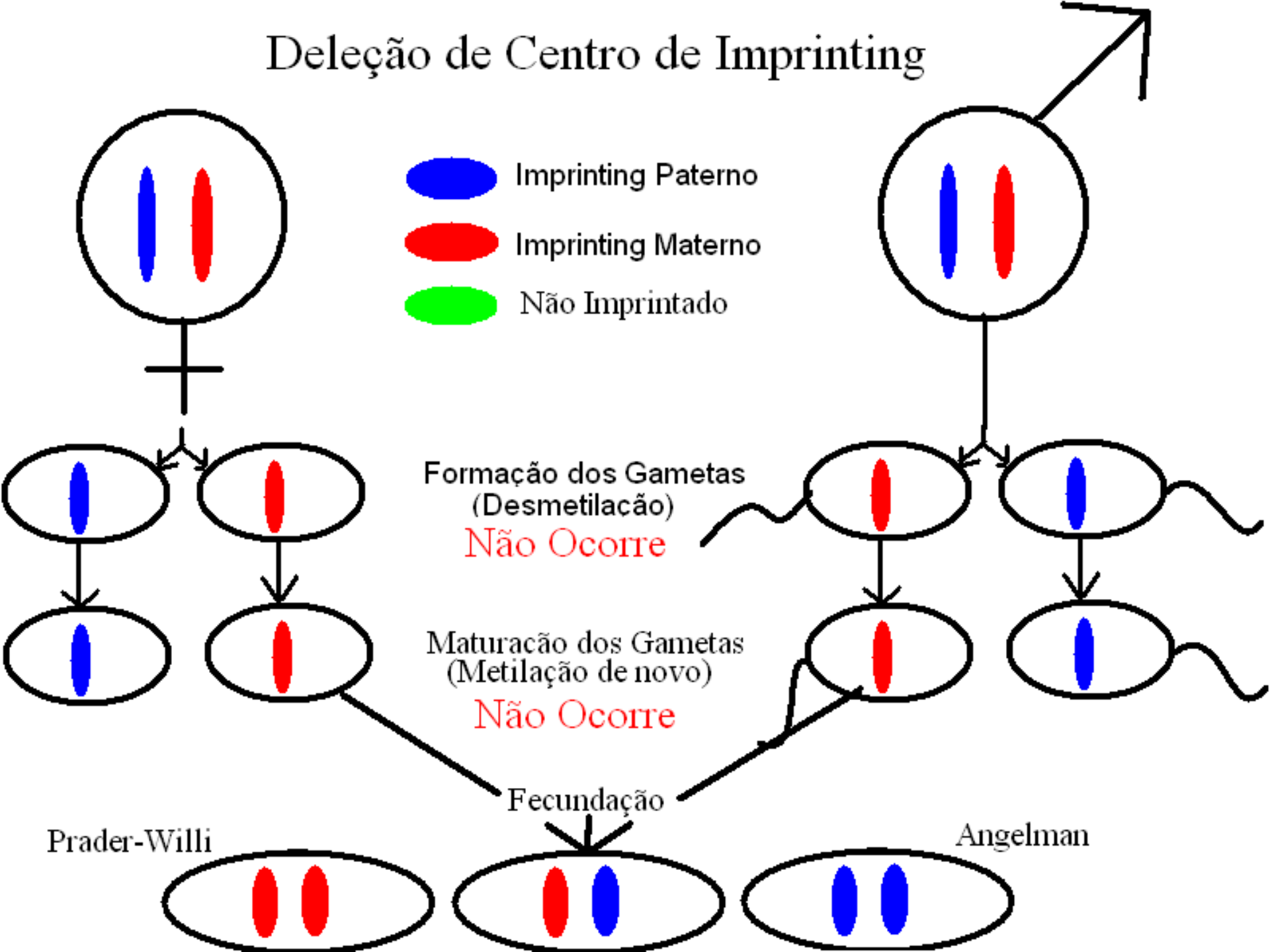


**UPD^p (60% casos)
expressão bialélica de
IGF2: estimula o
crescimento celular e risco
1000 x maior de câncer**

-  Imprinting Paterno
-  Imprinting Materno
-  Não Imprintado



Deleção de Centro de Imprinting



Síndromes de Angelman e Prader-Willi

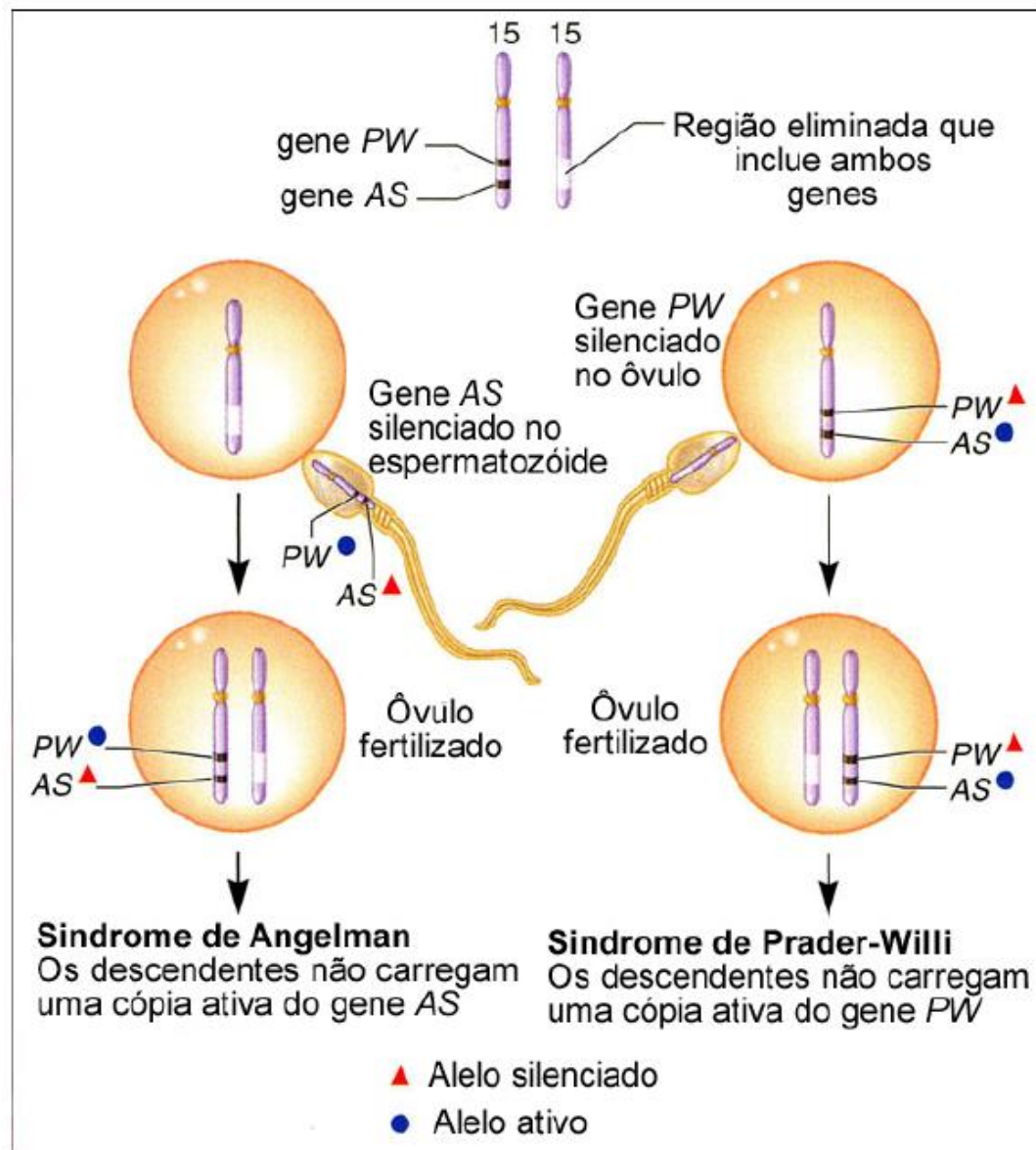
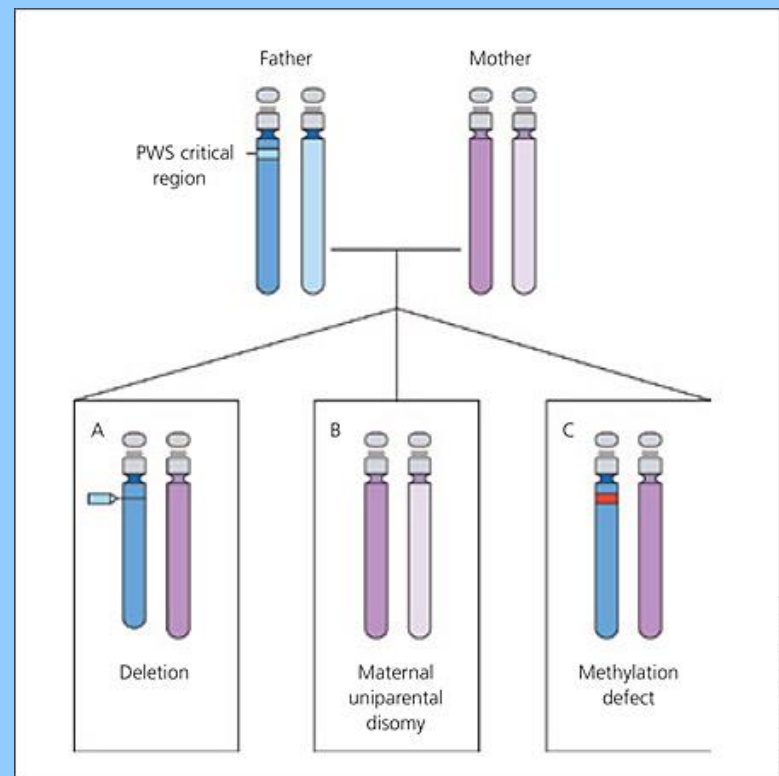
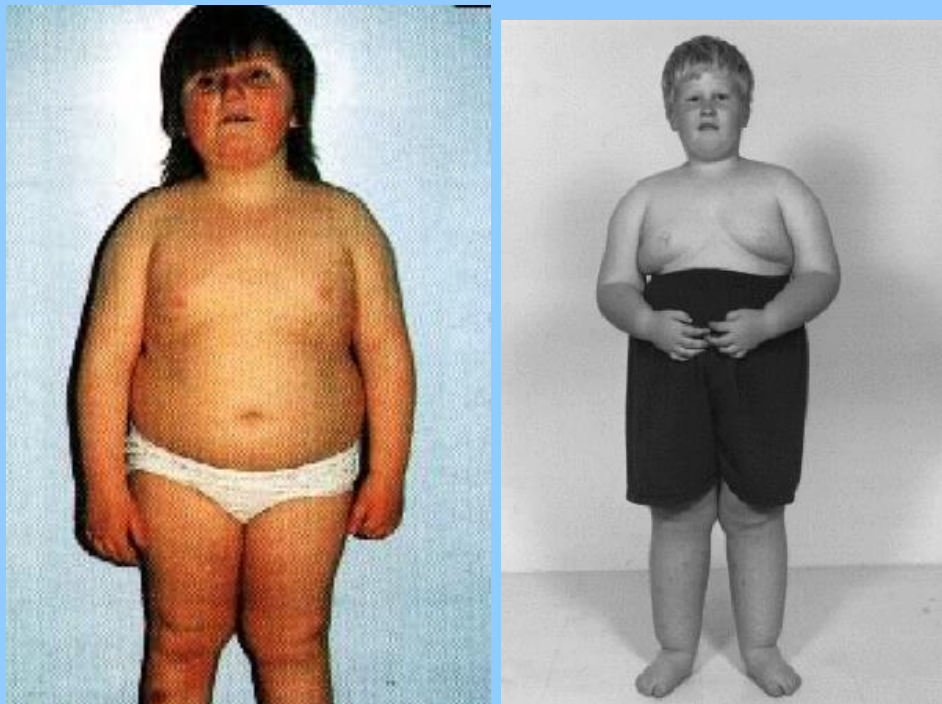


TABLE 3 Selected disorders of imprinted genes

Disorder	Mechanisms in approximate order of frequency	Chromosome region	Specific gene(s)	OMIM
Prader-Willi syndrome	Deletion, UPD, imprint defect	15q11-q13	snoRNAs?, other?	176270
Angelman syndrome	Deletion, UPD, imprint defect, point mutation	15q11-q13	<i>UBE3A</i>	105830
Beckwith-Wiedemann syndrome	Imprint defect, UPD, duplication, translocation, point mutation	11p15.5	<i>IGF2</i> , <i>CDKN1C</i>	130650
Pseudohypoparathyroidism	Point mutation, imprint defect, UPD	20q13.2	<i>GNAS</i>	103580
Russell-Silver syndrome UPD(7)mat	UPD, duplication, translocation, inversion	7p11.2	Various candidates	180860

IMPRINTING GENÔMICO

Síndrome de Prader-Willi



Hipotonia - Baixa estatura

Mãos e pés pequenos

Obesidade severa

Polifagia

RM brando a moderado

Gene ?? SNRPN^m

del(15q11q13)pat (70%)

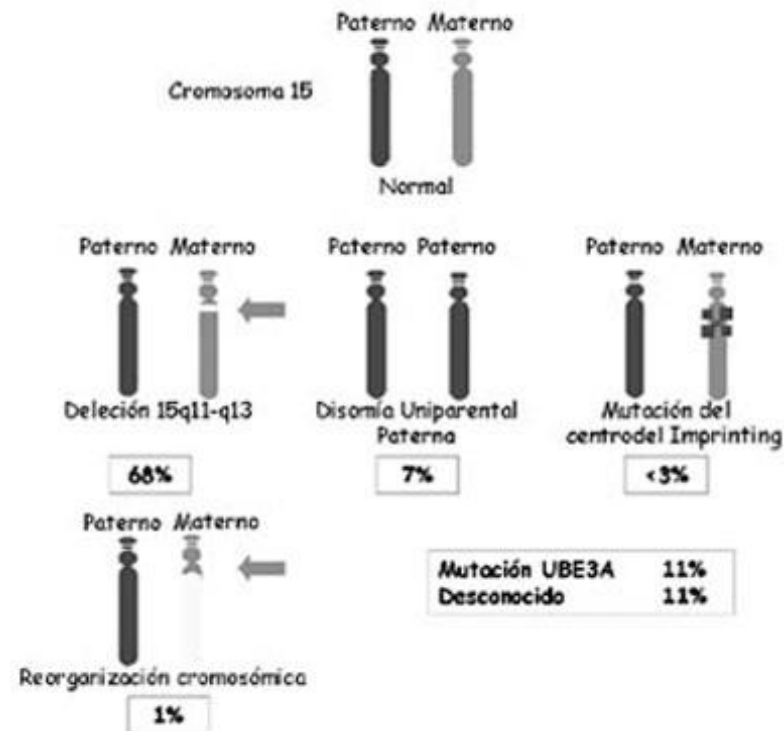
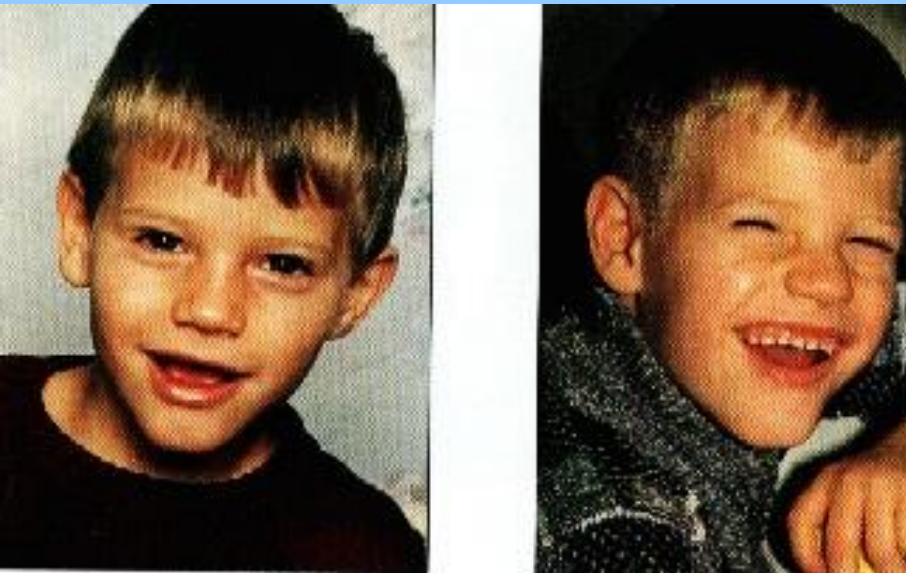
Dissomia materna:upd(15)mat (25%)

Defeito de metilação

<http://www.aafp.org/afp/20050901/827.html>

IMPRINTING GENÔMICO

Síndrome de Angelman



Síndrome da criança feliz

RM grave

Retardo do desenvolvimento

Boca grande – língua protusa

Convulsões

Surtos de riso

gene *UBE3A**p e *ATP10C**p

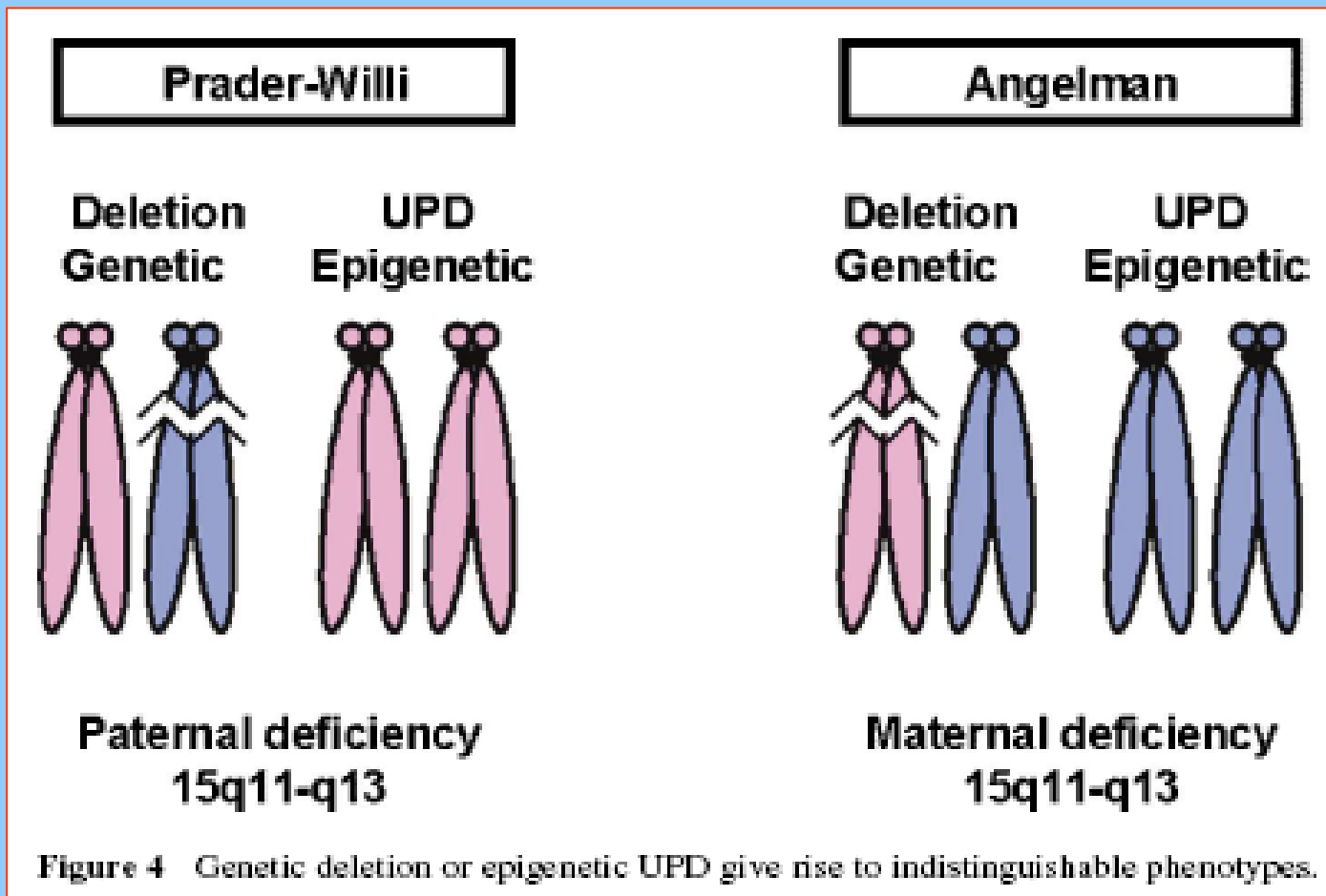
Expressão monoalélica no cérebro

del(15q11q13)mat (68%)

Dissomia paterna: upd(15)pat (7%)

Mutação no ICR (centro imprinting) - (4%)

Mutação no gene *UBE3A* (5%)

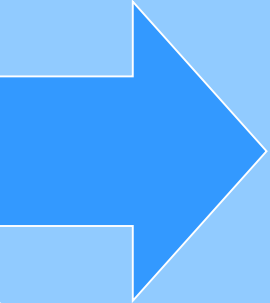


Doenças com fenótipos únicos: mas de origem genética em alguns pacientes (deleção) ou origem epigenética em outros (UPD).


EPIGENÉTICA X GÊMEOS MONOZIGÓTICOS (MZ)

Por que gêmeos MZ não são 100% concordantes?

Epigenótipo sofre mudanças (metilação do DNA e estrutura da cromatina) da fertilização → blastocisto e durante o desenvolvimento



Qualquer alteração *de novo* ou epimutação afetando o **epigenótipo** durante a gametogênese ou embrião antes da clivagem dos MZ → irá afetar ambos os gêmeos de forma concordante



Qualquer **discondância** entre MZ pode ser atribuída a mudanças epigenéticas após a clivagem ao invés de etiologia poligênica

Em quase todas doenças Mendelianas com o gene identificado → uma parcela pequena de pacientes em que não são encontradas mutações após sequenciamento total (éxons e regiões não-codificadoras)

Possibilidade:

**Alterações epigenéticas
ou genéticas que afetam
a expressão gênica.**

EPIGENÉTICA: SUSCETIBILIDADE À DOENÇAS

Marcas epigenéticas aberrantes no útero: pode aumentar suscetibilidade a doenças no adulto

Dieta da gestante afeta padrões epigenéticos: (deprivação de metionina e ácido fólico, nicotina) transcrição ou silenciamento estabelecidos precocemente e mantidos durante a vida

Dieta materna e suscetibilidade a doenças metabólicas: obesidade, intolerância a glicose, diabetes tipo II, e doenças relacionadas: aterosclerose e cardiovascular

- Homens cujos avôs foram expostos à fome na Suécia (Överkalix) antes da puberdade tendem a morrer mais cedo de várias doenças comuns do que homens cujos avôs não foram expostos a fome.
- Tanto a fome holandesa no inverno e a fome em massa da população da China levaram a exposição fetal à deprivação durante o primeiro trimestre de gestação: associado a uma incidência de esquizofrenia na idade adulta que foi o dobro da incidência entre adultos que não tinham expostos a fome durante a gestação.

EPIGENÉTICA E REPRODUÇÃO ASSISTIDA

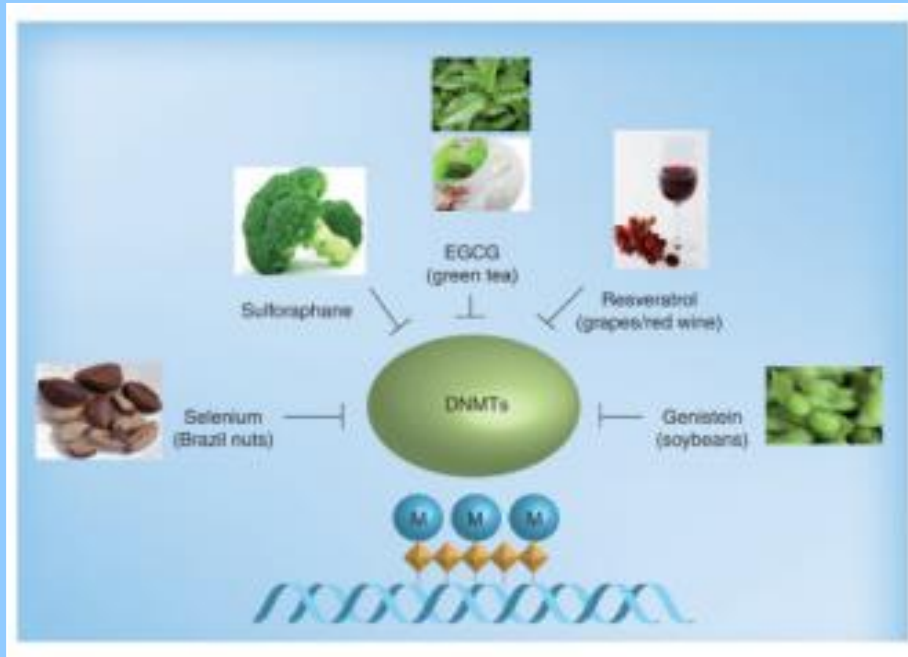
- maior risco de alterações pré e perinatais em crianças concebidas por técnicas de reprodução assistida (TRA)
- **Causas possíveis para distúrbios epigenéticos:**
 - Fatores parentais
 - Uso de drogas para estimulação ovariana
 - Características dos meios de cultivo
 - Manipulação dos gametas e embriões
- Modificações epigenéticas tem sido observadas em crianças por TRA
- **Ex: Síndrome de Beckwith Wiedemann e S. Algelman:** hipometilação dos genes *HCNQ1OT1*, *SNRPN*, *PEG1*, *PLAGL1* e *IGF2R*
- estimulação ovariana c/ gonadotrofina: distúrbios da metilação em oócitos
- **Crianças concebidas por TRA:** maior risco de desenvolver doenças na vida adulta: diabetes, obesidade, câncer, doenças coronárias



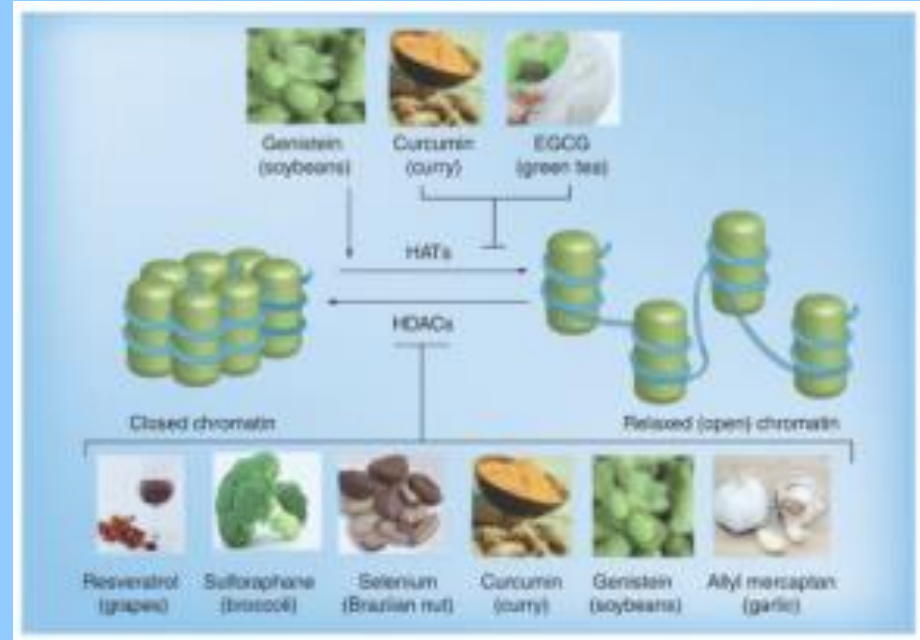
Dieta

- Componentes fitoquímicos da dieta podem prevenir doenças (**celíaca, neurodegenerativa, cardiovascular, câncer**): Chás verde (polifenol), alho, soja (ginesteína), uva (resveratrol), crucíferas (isotiocianatos), curcumina, castanha do Pará (selênio) → moduladores epigenéticos, defesa contra o câncer
- Drogas, químicos, pesticidas, compostos ambientais e contaminantes inorgânicos (arsênico) → podem alterar o epigenoma → contribuir para o desenvolvimento de doenças
- Dieta pode causar acúmulo de fenômenos epigenéticos → afeta o epigenoma
- Importante na terapêutica, quando associada a drogas
- Ex.: Deficiência de folato e vitamina B12: deficiência de metilação

DIETA E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS



Inibidores da dieta das DNMTs

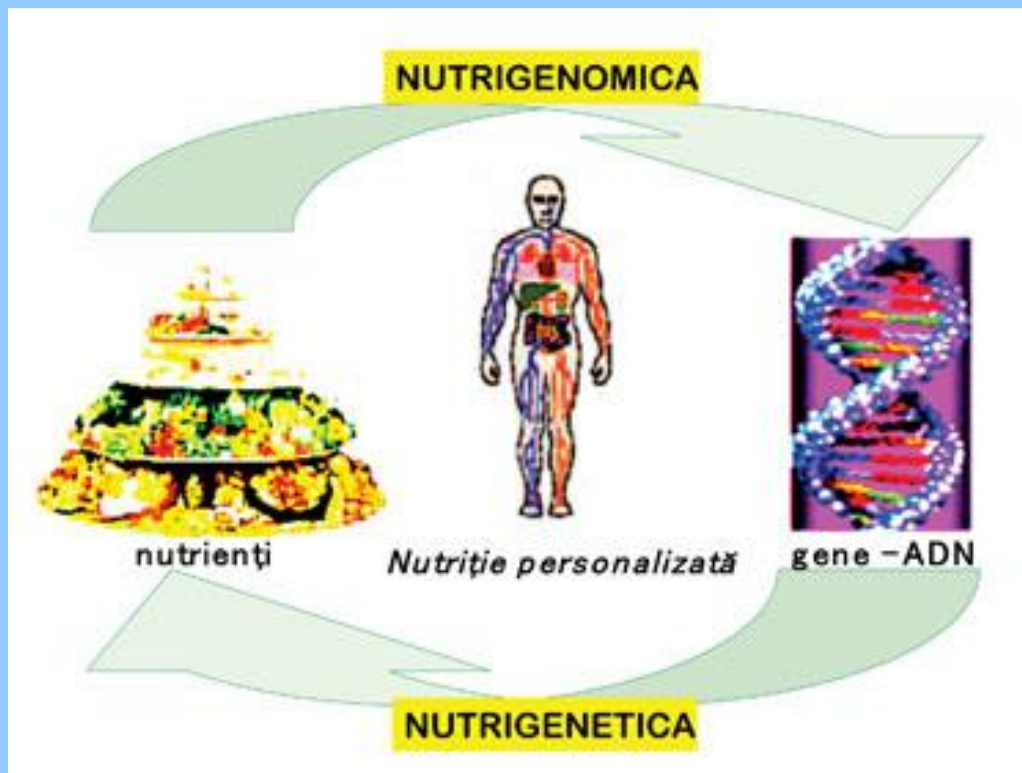


Modificadores da dieta das Histonas

Bioactive epigenetic diet compounds, food sources and epigenetic functions.

Epigenetic diet compounds	Food sources	Epigenetic functions
EC, ECG, EGC and EGCG	Green tea	DNMT and HAT inhibitor, modulates miRNA
Resveratrol	Grapes, peanuts, mulberries, cranberries, blueberries	DNMT and HDAC inhibitor
Curcumin	Tumeric, curry	DNMT inhibitor and miRNA modulator
Genistein	Soybeans, fava beans	DNMT and HDAC inhibitor, enhances HATs, modulates miRNA
Isothiocyanates, sulforaphane	Broccoli, cabbage, kale, watercress	DNMT and HDAC inhibitor
Selenium	Brazilian nuts, chicken, game meat, beef	DNMT and HDAC inhibitor
Allyl mercaptan, organosulfur compounds	Garlic	HDAC inhibitor
Folate	Beans, grains, fortified breakfast cereals, pastas, green vegetables	Deficiencies alter DNA methylation patterns
Alcohol	Alcoholic beverages	High consumption increases promoter hypermethylation

DNMT: DNA methyltransferase; EC: Epicatechin; ECG: Epicatechin-3-gallate; EGC: Epigallocatechin; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate; HAT: Histone acetyltransferase; HDAC: Histone deacetylase.

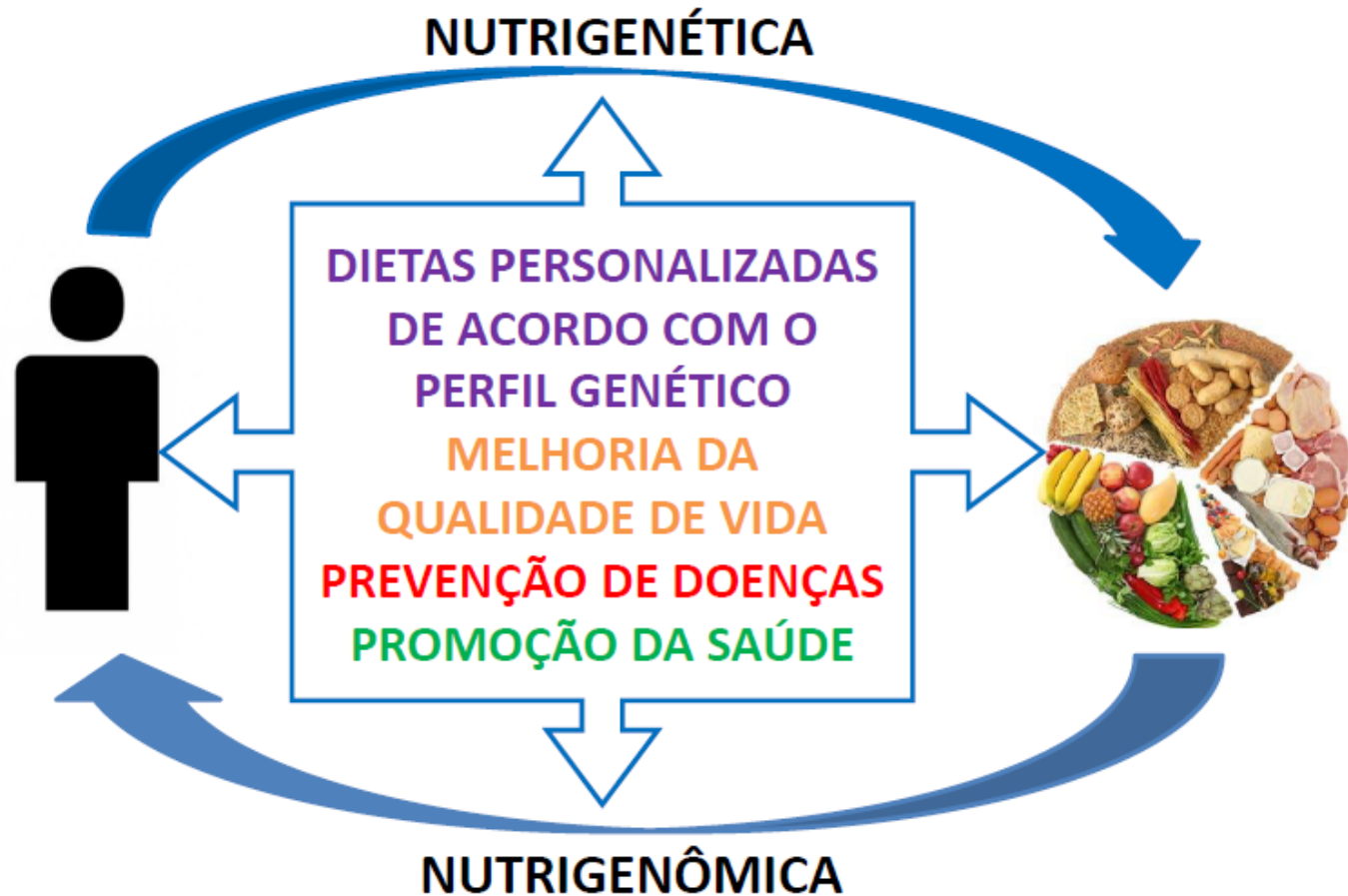


Nutrigenética: analisa as características genéticas individuais (variação genética- polimorfismos), que podem influenciar a sua resposta aos alimentos

Nutrigenômica permite estudar ao longo do tempo a influência da dieta na expressão dos genes.

- como os genes e componentes da dieta se interagem para influenciar o fenótipo (predisposição a doenças)

CONCLUSÃO



PROJETO EPIGENOMA HUMANO

- **Parceria do Instituto Sanger (britânico) e empresa Epigenomics (alemã) - 2007**

- **Como processos epigenéticos contribuem para a biologia humana e doenças**

- **Pretende esclarecer como fatores ambientais (dieta e estresse) podem interferir no funcionamento dos genes?**

- **Como o estilo de vida aciona ou silencia os genes**

- **Como gêmeos idênticos (mesmo genoma) manifestam doenças diversas, como esquizofrenia, diabetes ou câncer?**

- **A metilação do DNA é influenciada pela alimentação → suplementação de **vit B12, ácido fólico e betaína** → ricos em grupo metil → desativação gênica**

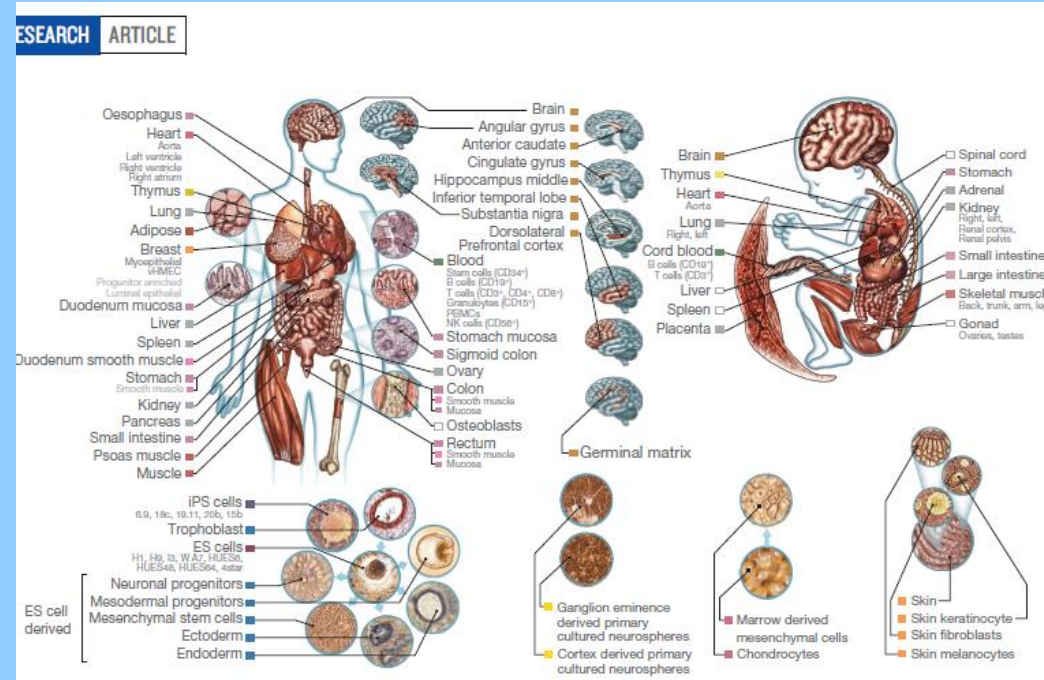


EPIGENOMA HUMANO

-várias organizações públicas e privadas: **NIH Roadmap Epigenomics Consortium**

(<http://nihroadmap.nih.gov/epigenomics/>)

- National Institutes of Health (NIH)
- Alliance for the Human Epigenome And Disease (AHEAD),
- Human Epigenome Project (HEP) (<http://www.epigenome.org/>), uma junta em colaboração da The Wellcome Trust Sanger Institute, Epigenomics AG, The Centre National de Génotypage



Nature (2015) 24 artigos: Atlas do epigenoma humano – 111 tecidos: padrões de modificação de histonas, acessibilidade do DNA, metilação do DNA e expressão RNA

- entendimento da regulação gênica, diferenciação celular
- mecanismos e possíveis relações com doenças e condições como asma, câncer, problemas cardíacos e Alzheimer.