

Principais defeitos epigenéticos e metodologias utilizadas para sua detecção

EPIGENÉTICA E EPIGENOMA

A epigenética é o conjunto de mudanças reversíveis e herdáveis que alteram a expressão de um gene sem alteração da sequência de nucleotídeos (genoma funcional). As modificações epigenéticas sofrem influência temporal, ambiental e apresentam diferentes padrões de herança (FEINBERG, 2009).

A cromatina é um complexo de DNA e proteínas, principalmente histonas, que se encontra dentro do núcleo celular nas células eucarióticas, que ajudam a "empacotar" o DNA. A mudança da conformação da cromatina altera a funcionalidade do DNA codificado (SWEATT et al., 2012).

Mecanismos epigenéticos:

Há três mecanismos principais que modificam a acessibilidade da cromatina à proteínas que alteram a transcrição e expressão dos genes (TESCHENDORFF, 2015; BRETTINGHAM; TABERLAY, 2015).

- **Modificação das histonas:** as histonas são proteínas que facilitam o empacotamento do DNA constituindo os nucleossomos. As modificações pós transcricionais ocorrem em resíduos específicos da cauda N-terminal das histonas (COSGROVE; BOEKE; WOLBERGER, 2004). Elas regulam as funções da cromatina alterando o acesso dos fatores de transcrição e ou o recrutamento de proteínas específicas (BERDASCO; ESTELLER, 2010; FAKHR, 2013).
- **Regulação dos mRNA:** Os microRNAs regulam negativamente a expressão dos genes através da degradação e inibição translacional do RNA mensageiro (mRNA) (LU; CHANG; RICHARDSON, 2015).
- **Metilação:** é o mecanismo epigenético mais estudado e bem caracterizado. Os padrões de metilação são estabelecidos depois da síntese de DNA, quando as citosinas dos dinucleotídeos CpG são metiladas através de adições covalentes do grupamento metil na posição 5' de seus anéis pelas enzimas DNA metiltransferases (FAKHR, 2013). A metilação impede a ligação do DNA com os fatores de transcrição e o recrutamento de proteínas, resultando na inibição da expressão gênica (BIRD, 2002; FAKHR, 2013).

Fenômenos epigenéticos:

- **Imprinting:** As marcas de *imprinting* são herdadas de gametas parentais e são mantidas nas células somáticas do indivíduo (EGGERMANN et al., 2015). A expressão monoalélica de certos genes (genes que sofrem *imprinting*), ocorre devido a hipermetilação em um dos alelos conforme a origem parental (KACEM; FEIL, 2009).
- **Inativação parcial do cromossomo X:** a inativação do X ocorre de duas formas diferentes, de forma aleatória e por *imprinting*. A inativação do X paterno com *imprinting* ocorre na placenta. Já a inativação aleatória do X ocorre nos embriões femininos com os dois cromossomos tendo a mesma chance de se tornarem inativos; esse processo ocorre independentemente em cada célula e é coordenado pelos genes XIST e TSIX (AHN; LEE, 2008).

DOENÇAS POR ALTERAÇÕES DO IMPRIMING GENÔMICO

As principais doenças causadas por alterações do *imprinting* estão inclusas em um grupo com características clínicas parecidas, os distúrbios de *imprinting* (IDs). São síndromes que afetam o crescimento, desenvolvimento e metabolismo, possuindo

variações moleculares comuns envolvendo regiões de genes com *imprinting*. Seguem algumas destas doenças com suas respectivas etiologias e testes utilizados para diagnóstico molecular:

Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS): a dissomia uniparental paterna do cromossomo 11 (upd(11p15)pat) é responsável por aproximadamente 20% dos casos, já a hipermetilação da região de controle de imprinting ICR1 do H19/IGF2 no cromossomo 11 (11p15 GOM) é encontrada entre 5 e 10% dos casos. Além destas, mutações ou deleções de genes com imprinting no cromossomo 11 e hipometilação da região de controle de imprinting ICR2 também são causas de BWS. SALSA MLPA ME030 BWS/RSS.

Síndrome de Silver-Russell (SRS): possui duas causas principais, a hipometilação da região de controle de imprinting ICR1 do H19/IGF2 no cromossomo 11 (11p15 LOM) aparecendo em 40% dos casos e com 10% dos casos, a dissomia uniparental materna do 7 (upd(7)mat). SALSA MLPA ME030 BWS/RSS ou SALSA MLPA ME032 UPD7-UPD14.

Síndrome de Prader-Willi (PWS): deleção paterna da região 15q11-q13 com 70% dos casos e upd(15)mat com 30 %. Tratamento com bissulfito seguido de PCR do exon 1 do gene SNURF/SNRPN.

Síndrome de Temple: upd(14)mat em 78% dos casos. Metilação aberrante no gene MEG3 em 12% e deleção paterna dos genes MEG3 ou DLK1 em 10 % dos pacientes. SALSA MLPA ME032 UPD7-UPD14.

Síndrome de Kagami-Ogata: upd(14)pat em 65% dos casos. Metilação aberrante no gene MEG3 em 20% e deleção materna dos genes MEG3 ou DLK1 em 15%. SALSA MLPA ME032 UPD7-UPD14.

Pseudo-hipoparatiroidismo, tipo IB (PHP1B): mutações de perda de função no gene GNAS são responsáveis por 46.5% dos casos. Epimutações isoladas no GNAS estão presentes em 42.5% e deleções maternas que causam metilação aberrante na região 20q13 estão em 8.5% dos pacientes. SALSA MLPA ME031 GNAS.

METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE METILAÇÃO DE DNA

Por meio de digestão enzimática: Na análise de metilação de DNA, enzimas de restrição podem ser utilizadas e sua atividade de clivagem depende da metilação da sequência alvo em um sítio CpG. A maioria das enzimas de restrição são sensíveis à metilação, como HpaII e a HhaI, em que locais CpGs metilados inativam essas enzimas. A principal desvantagem relacionada com a utilização de enzimas de restrição é a dependência da disponibilidade de sequências de reconhecimento específico de enzimas que flanqueiam o sítio CpG de interesse (VIDAKI; DANIEL; COURT, 2013).

- **Southern blot de metilação específica no sítio de restrição HpaII**
- **MLPA**

Conversão de bissulfito: O processo de conversão de DNA por bissulfito leva à desaminação de citosinas não modificadas, mas como resultado a 5-metilcitosina é protegida; as citosinas que resistem ao tratamento de bissulfito são, portanto, identificadas como metiladas (TOLLEFSBOL *et al.*, 2011). Existem duas metodologias principais que podem ser utilizadas após o tratamento com bissulfito:

- **Sequenciamento de gene específico**
- **Metilação global**

REFERENCIAS:

AHN, J. & LEE, J. X chromosome: X inactivation. **Nature Education**, 2008. 1(1):24

BERDASCO, María; ESTELLER, Manel. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. **Developmental Cell**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.698-711, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>.

BIRD, A.. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.6-21, 1 jan. 2002. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.947102>.

BRETTINGHAM-MOORE, Kate H.; TABERLAY, Phillipa C.. Cancer Epigenetics. In: EGGER, Gerda; ARIMONDO, Paola (Ed.). **Drug Discovery in Cancer Epigenetics**. United Kingdom: Academic Press, 2015. Cap. 2. p. 41-62.

COSGROVE, Michael S; BOEKE, Jef D; WOLBERGER, Cynthia. Regulated nucleosome mobility and the histone code. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1037-1043, nov. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb851>.

EGGERMANN, Thomas et al. Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. **Clinical Epigenetics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.23-33, 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-015-0050-z>.

FAKHR, Mehrdad Ghavifekr et al. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. **Genetics Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/317569>.

FEINBERG, Andrew P.. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. **Virchows Archiv**, [s.l.], v. 456, n. 1, p.13-21, 21 out. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-009-0847-2>.

KACEM, Slim; FEIL, Robert. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. **Mammalian Genome**, [s.l.], v. 20, n. 9-10, p.544-556, 17 set. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-009-9223-4>.

LU, Qianjin; CHANG, Christopher C.; RICHARDSON, Bruce C.. **Epigenetics and Dermatology**. Estados Unidos: Academic Press, 2015. p. 307-326.

SWEATT, J David et al. **Epigenetic regulation in the nervous system: Basic mechanisms and clinical impact**. China: Academic Press, 2012.

TESCHENDORFF, Andrew E.. **Computational and Statistical Epigenomics**. Holanda: Springer, 2015.

TOLLEFSBOL, T., et al. , **Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics** 2011, London: Elsevier Inc.

VIDAKI, A.; DANIEL, B.; COURT, D.S., **Forensic DNA methylation profiling-Potential opportunities and challenges**. Forensic Science International-Genetics, 2013. 7(5): p. 499-507.