



# CONCEITOS BÁSICOS DE EPIGENÉTICA PARA UNIVERSITÁRIOS

Maria de Mascena Diniz Maia  
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva



Editora  
Universitária  
da UFRPE

Primeira Edição

## **Professora Dra Maria de Mascena Diniz Maia**

Coordenadora do projeto para elaboração deste livro.

Graduada em Farmácia-Bioquímica pela UFPE, Mestre em Bioquímica e Doutora em Ciências Biológicas pela UFPE. Especialista em Microbiologia Clínica pela USP-SP (Laboratório Central-Hospital das Clínicas). Atualmente Professora Pesquisadora da Área de Genética no Departamento de Biologia da UFRPE-SEDE. Como Professora TITULAR vem atuando como docente ministrando aulas nas disciplinas de genética e orientando alunos de IC, extensão e de pós-graduação em projetos nas linhas de pesquisa em genética humana e animal.

---



**Prof. Marcelo Brito Carneiro Leão**

*Reitor da UFRPE*

**Prof. Gabriel Rivas de Melo**

*Vice-Reitor*

**Antão Marcelo Freitas Athayde Cavalcanti**

*Diretor da Editora da UFRPE*

**Victor Sandes de Meneses**

*Diagramação e Arte*

**Edson Cordeiro do Nascimento**

*Diretor do Sistema de Bibliotecas da UFRPE*

**Marco Aurélio Cabral Pereira**

*Chefe de Produção Gráfica da Editora UFRPE*

**Diagramação e Arte**

Victor Sandes de Meneses

(Editora Universitária da UFRPE)

**Textos dos Autores**

Maria de Mascena Diniz Maia

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

**Organizadora**

Maria Mascena Diniz Maia

**Imagem de Capa**

Adaptada de

<https://profissaobiotech.com.br/>

longevidade-nos-pequenos-detalhes/figura-3



Editora Universitária da UFRPE

*Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos*

*CEP: 52171-900 - Recife-PE*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE

Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- 
- M217c Maia, Maria de Mascena Diniz  
Conceitos básicos de epigenética para universitários / Maria de  
Mascena Diniz Maia, Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva. –  
1. ed. - Recife: EDUFRPE, 2020.  
87 p.: il.  
Inclui referências.  
ISBN: 978-65-86547-17-7  
1. Metilação 2. DNA 3. acetilação 4. histonas, 5. microRNA  
I. Maia, Maria de Mascena Diniz

CDD 150.1952

---

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade Federal Rural de Pernambuco- Departamento de Biologia-Genética e dos autores.

## Prefácio

Este livro nasceu do meu desejo de contribuir com a formação dos estudantes da área de biologia sobre um tema relativamente novo e muito atraente no campo da genética, que é a Epigenética. O nosso despertar do interesse por esse campo da genética veio com o tema de dissertação (Mestrado) que minha filha Paula realizou no curso de pós-graduação da UFPE/LIKA com o objetivo de estudar a associação dos polimorfismos dos genes IGF2 (Fator de crescimento tipo insulina II) e H19 em crianças nascidas com baixo peso e, também, avaliar o grau de metilação desses genes associado com baixo peso das crianças ao nascer. Nesse tempo, Isaura Isabelle era nossa aluna IC e também se interessou pelo assunto. Assim, implantamos a técnica de análise de metilação do DNA no Laboratório Genoma e o resultado do experimento sobre metilação do DNA do gene H19 associado ao baixo peso de criança ao nascer foi publicado. Agora que estamos nesse tempo de confinamento devido à pandemia do *COVID-19*, resolvi convidar Isaura para escrever esse livro que acredito ser de grande proveito para a comunidade universitária e demais interessados pelo assunto. Espero que estejamos levando uma leitura agradável, esclarecedora e fácil de entender, especialmente para os nossos alunos dos cursos de Agronomia, Engenharia Florestal, Veterinária, Zootecnia, Biologia (Licenciatura e Bacharelado) da UFRPE. A intenção principal é oferecer aos leitores uma fonte de conceitos básicos da Epigenética, descritos em uma linguagem simples, lógica e sintética, com a intenção de contribuir para exercitar e ampliar seus conhecimentos em cada tema abordado. Eu e Isaura desejamos, portanto, que os nossos alunos, em contato com os assuntos que escrevemos, sejam estimulados a aprender epigenética de uma forma pessoal, relacionando os conteúdos a algo que já conhecem e se deparam no dia-a-dia, associando os fatos do passado com o presente, de modo a tornar os temas mais interessantes no que se refere ao panorama da beleza da vida.

---

## **Coordenadora do Projeto:**

**Maria Mascena Diniz Maia**

Professora Titular da Universidade Federal  
Rural de Pernambuco  
Doutora em Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal de Pernambuco  
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela  
Universidade Federal de Pernambuco  
Bacharel em Farmácia pela Universidade  
Federal de Pernambuco

## **Demais autores:**

**Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva**

Doutoranda em Genética pela Universi-  
dade Federal de Pernambuco  
Mestre em Biologia Celular e Molecular  
pela Universidade de Pernambuco  
Licenciada em Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal Rural de Pernambuco



**UFRPE**

---

## **AGRADECIMENTOS**

A Reitoria da UFRPE pelo apoio para realização desse projeto, a Editora Universitária da UFRPE pela encadernação, a meu filho Alexandre pela confecção de algumas figuras, a Isaura pela colaboração na escrita de alguns capítulos e na organização deste exemplar. Aos Professores, Áurea Wischral e Manoel Adrião Gomes Filho da UFRPE, pela revisão de texto.

Porque DELE, e por ELE, e para ELE são todas as coisas; glória, pois, a ELE (DEUS) eternamente. Romanos 11:36.

---

## **DEDICATÓRIAS**

Aos meus filhos, Paula, Bruno e Alexandre, minhas netas, Maria Gabriela e Maria Luísa e meu neto Francisco.

Maria de Mascena Diniz Maia

À minha família e a todos, cientistas ou não, que mantém viva a chama da curiosidade.

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

## **Especial Gratidão**

Deixo aqui meus agradecimentos especiais a nossa Reitora Professora Dra. Maria José de Sena e ao nosso Vice-Reitor Professor Dr. Marcelo Brito Carneiro Leão pelo apoio, incentivo e colaboração para produção desse pequeno livro sobre Epigenética.

---

# Sumário

Prefácio .....	4
Coordenadora do Projeto: .....	5
Demais autores:.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
DEDICATÓRIAS.....	7
Especial Gratidão .....	7
Capítulo I	
EPIGENÉTICA: CONCEITOS BÁSICOS.....	10
Breve Histórico .....	11
Genoma e Epigenoma.....	12
Marcas Epigenéticas.....	15
Mecanismos Epigenéticos.....	18
Capítulo II	
METILAÇÃO DO DNA.....	20
Histórico e Princípios.....	20
Metiltransferases de DNA (DNMTs).....	22
Mecanismos de ação da metilação do DNA .....	25
Metilação do DNA em diferentes organismos .....	26
Capítulo III	
METILAÇÃO DO DNA	
NOS PROCESSOS CELULARES BÁSICOS .....	29
<i>Imprinting</i> Genômico.....	30
Epigenética da Inativação do Cromossomo X em Humanos.....	35
Capítulo IV	
MODIFICAÇÃO DE HISTONAS .....	39
Histonas na expressão gênica.....	39
Código das Histonas .....	40
Metilação de Histonas.....	41
Acetilação de Histonas .....	43
Fosforilação de Histonas .....	45

---



## Capítulo V

O MUNDO DOS RNAS.....	47
RNAs e o dogma central da biologia .....	47
Regulação epigenética mediada por RNAs em procarionotos .....	50
Regulação epigenética mediada por RNAs em eucariotos .....	51
MicroRNAs (miRNAs) .....	51
<b>Small interfering</b> RNA (siRNAs) .....	53
<b>Piwi-interacting</b> RNAs (piRNAs).....	54
<b>long non-coding</b> RNA (lncRNAs) .....	55

## Capítulo VI

RNAs DE INTERFERÊNCIA: MIRNAS E SIRNAS .....	58
Histórico.....	58
Biogênese.....	59
Mecanismos de Ação.....	62
Impacto de pequenos RNAs nos processos biológicos .....	65

## Capítulo VII

EPIGENÉTICA NAS DOENÇAS HUMANAS.....	67
Doenças complexas .....	67
Câncer .....	68
Epigenética e câncer.....	71
Metilação do DNA no câncer .....	74
Modificações de histonas no câncer.....	75
Expressão de RNAs regulatórios no câncer .....	75
Epigenética, ambiente e estilo de vida .....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS .....	81

---

## EPIGENÉTICA: CONCEITOS BÁSICOS

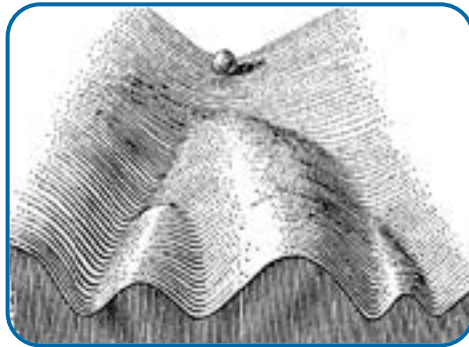
Maria de Mascena Diniz Maia

A vida é caracterizada pela diversidade de seres vivos, e as diferentes espécies apresentam características distintas. Variações fenotípicas como cor dos olhos, altura e peso, são observadas entre indivíduos da mesma espécie, como por exemplo, nos seres humanos. Uma mesma característica (fenótipo) pode apresentar diferentes formas que são atribuídas a variações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA (genótipo), com a contribuição de diferentes fatores ambientais. O genoma humano, por exemplo, apresenta diferentes versões que resultam dos processos de mutações e recombinações, eventos pelos quais, as variações fenotípicas se estabelecem entre os indivíduos, no entanto, apenas essas variantes genéticas não podem explicar todas as diferenças fenotípicas. O corpo humano é constituído por diferentes órgãos, sistemas e diversos tipos celulares com formas e funções diversas. No entanto, todas as células de um indivíduo possuem o mesmo genoma, com as mesmas instruções gênicas, ou seja, o mesmo DNA é usado para dar origem às células musculares, aos fios de cabelo, às células do fígado, aos neurônios, às células da pele e assim por diante. A pergunta é, por que as células de um mesmo organismo que contém genomas idênticos são tão diferentes e possuem funções tão distintas?

A resposta está no processo em que cada tipo celular adquire fenótipos específicos por modificações químicas no genoma, processo conhecido como diferenciação celular. As células devem manter a identidade desses fenótipos e transmiti-la às suas células-filhas, durante as divisões celulares, de forma que a identidade e manutenção desses fenótipos sejam estabelecidas, independentemente da sequência do DNA e das modificações químicas no genoma que levam a modificar sua expressão. Essas modificações químicas que ocorrem no genoma da célula em resposta ao meio ambiente e a processos patológicos, e que não alteram a molécula do DNA, são estáveis e transmitidas por meio de divisões celulares mitose e meiose, podendo ser esclarecidas pelos estudos dos mecanismos **epigenéticos**.

## Breve Histórico

O termo Epigenética é conhecido desde 1942, quando o biólogo inglês, Conrad Hal Waddington (1905-1975), trabalhando com biologia do desenvolvimento, utilizou pela primeira vez o termo **epigenética** para se referir a “todos os eventos que conduzem ao desdobramento do programa genético para o desenvolvimento, ou o ramo da biologia que estuda as interações entre genes e seus produtos que fazem o fenótipo visível. Assim, propôs pela primeira vez a relação entre genes e desenvolvimento, porém, nenhum mecanismo foi proposto para essa relação. Waddington cunhou o termo paisagem epigenética (*“epigenetic landscape”*), como um modelo conceitual de como os genes podem interagir com o ambiente para produzir um fenótipo, quando a natureza física dos genes e seu papel na hereditariedade ainda não eram conhecidos (**Fig. 1**).



**Fig. 1.** Modelo de “*Epigenetic landscape*” proposto por Waddington, representando as várias escolhas possíveis que uma célula (esfera) pode fazer durante o desenvolvimento.

Fonte: The epigenetic landscape proposed by C. H. Waddington (1940) in *Organisers & genes*; Cambridge: Cambridge University Press.

O termo “*epigenetic landscape*” de Waddington é uma demonstração visual de um conjunto de escolhas com as quais uma célula embrionária se depara durante o desenvolvimento e indica a associação da epigênese com a genética.

Desta forma, podemos conceituar a **epigenética** (*epi* - do grego, acima) como um “conjunto de fatores e processos moleculares que ocorrem em torno do DNA, que são estáveis durante as divisões celulares (mitose e

meiose) e que regulam a atividade do genoma independente da sequência do DNA”. Vale lembrar, que a reversibilidade está no conceito da epigenética, o que significa dizer que os fenótipos diferentes produzidos a partir da mesma sequência de DNA, por meio de modificações epigenéticas, são possíveis de reversibilidade tendo em vista que não houve mudança nas bases (A, T, C, G) da molécula do DNA. Assim, podemos deduzir que as marcas epigenéticas não são fixas e podem ser modificadas.

## Genoma e Epigenoma

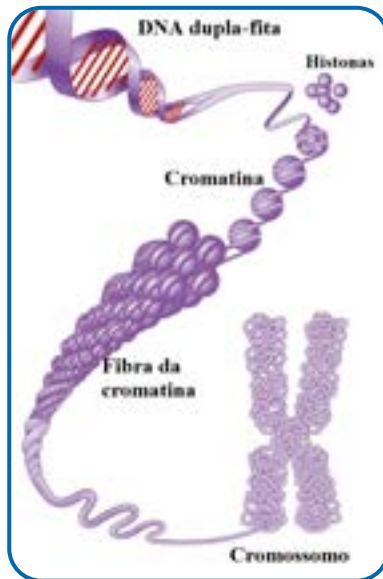
Por definição, o genoma humano é constituído de 23 pares de cromossomos, que contém interiormente os genes e que se encontram dentro do núcleo da célula diploide após o processo de fecundação entre as células gaméticas, óvulo e espermatozoide. Podemos dizer que o **genoma** é o código genético ou o conjunto de genes do ser humano. Cada gene é constituído por uma sequência específica de DNA (ácido desoxirribonucleico) que determina as características herdadas geneticamente.

**Os Cromossomos** dos organismos eucariontes estão localizados no núcleo das células e são estruturas lineares de DNA dupla hélice que carregam os genes que codificam as características físicas particulares de cada indivíduo. O DNA é quimicamente formado por pentose – um açúcar que apresenta moléculas formadas por cinco átomos de carbono; fosfato – um radical de ácido fosfórico e quatro bases nitrogenadas que se juntam aos pares: adenina (A) com timina (T) e citosina (C) com guanina (G).

O conceito de **cromossomo** e **cromatina** é o mesmo, o que muda é a forma como se encontram no interior do núcleo em certas fases do ciclo celular. Cada **cromossomo eucariótico** constitui uma estrutura formada por uma única molécula de DNA dupla hélice associada a proteínas histonas e não histonas formando um arranjo complexo também conhecido como cromatina.

Quando a célula entra em divisão, a estrutura da cromatina se torna altamente compactada formando o que se chama de **cromossomo**, que pode ser visto no microscópio ótico, na fase de metáfase da divisão celular. A diferença entre eles é que o cromossomo é a **cromatina** compactada (**Fig. 2**). Vale salientar, que a cromatina não é uma estrutura uniforme, apresentando segmentos altamente condensados (heterocromatina) e seg-

mentos menos condensados (eucromatina). Esse grau de compactação da cromatina é um processo dinâmico e sua conformação pode ser alterada de acordo com os sinais ambientais exógenos e endógenos a que a célula é submetida.

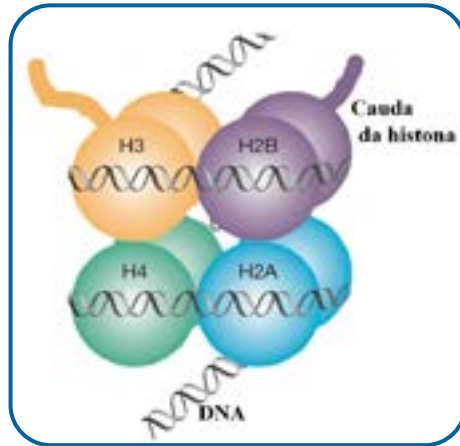


**Fig. 2.** Condensação do cromossomo (estrutura de cromossomo e cromatina).

Fonte: Tortora G. J. & Derrickson B. H. "Principles of Anatomy and Physiology".  
11th ed. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons (2006).

Sabe-se que a molécula do DNA é muito maior que o núcleo de uma célula eucarionte e o DNA de uma célula humana só é capaz de caber no núcleo graças a função de organização das proteínas histonas que são especializadas para empacotar a molécula de DNA numa estrutura chamada de **nucleossomo (Fig. 3)**.

Os nucleossomos são as unidades básicas de compactação do DNA composto por cerca de 200 pb de DNA enrolado ao redor de um octâmero de histonas. As histonas nucleares (H2A, H2B, H3 e H4) são proteínas de caráter básico (ricas em aminoácidos básicos, como arginina e lisina), com sequências de aminoácidos altamente conservadas entre os eucariontes. As histonas formam complexos octaméricos cada um contendo duas subunidades



**Fig. 3.** Estrutura do Nucleossomo.

Fonte: Zaidi, et al. "De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease." *Nature* 498.7453 (2013): 220-223.

de cada uma das quatro diferentes histonas. O DNA é enrolado em torno do octâmero de histonas com um superenrolamento solenoidal para a esquerda, com quase duas voltas. A histona H1 não faz parte do núcleo de histonas do nucleossomo em vez disso, ela se liga ao DNA ligante (liga nucleossomos adjacentes) e é denominada histona de ligação. A histona H1 juntamente com outras proteínas não histonas estão envolvidas na estruturação e organização da cromatina. As caudas N-terminais das histonas projetam-se dos nucleossomos e estão acessíveis às enzimas que adicionam e removem grupos químicos por ligações covalentes tais como, acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, entre outros. A adição destes grupos muda o nível de expressão dos genes acondicionados em nucleossomos contendo histonas modificadas.

Algumas modificações estão associadas a genes ativos (acetilação), enquanto outras estão associadas tanto a genes ativos quanto a genes silenciados (metilação). A posição das modificações nas caudas das histonas também está associada às funções, como por exemplo, a metilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 (H3) está associada a genes ativos, enquanto nas lisinas 9 e 27 está associada a genes silenciados. Desta forma, podemos dizer que as histonas funcionam na helicoidização do DNA em cromossomos e na regulação da atividade gênica.

Assim como as histonas, a molécula de DNA também sofre modificações químicas que podem influenciar tanto a estrutura da cromatina quanto o controle da expressão gênica. Essas modificações que podem ocorrer nos aminoácidos das caudas das histonas (que fazem parte da cromatina) e nos nucleotídeos da molécula do DNA, em geral nas citosinas, compreendem o conjunto de marcas epigenética da célula. Portanto, o conjunto de marcas epigenéticas de uma célula é chamado **epigenoma**. Essas marcas regulam o acesso da maquinaria de transcrição de RNA à sequência dos genes, que pode promover ou impedir o processo.

## Marcas Epigenéticas

Em humanos, após a fecundação, a célula-ovo ou zigoto, que é uma célula totipotente, inicia o processo de divisão celular mitótica para dar origem a diferentes tipos de células, órgãos e tecidos do corpo.

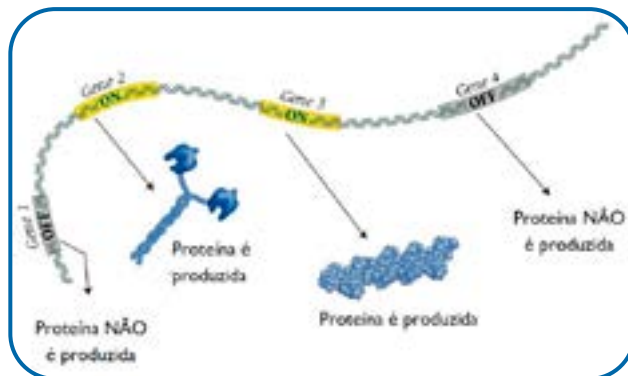
O desenvolvimento embrionário (embriogênese) corresponde ao conjunto de mecanismos de multiplicação e diferenciação celular que leva à formação de tecidos de um embrião e depende da captação de sinais pelas células que podem vir de dentro das próprias células, de células vizinhas (incluindo as células da mãe) e do meio externo (ambiente). Estes sinais irão determinar a morfologia, a fisiologia do embrião e do indivíduo e também o seu comportamento. Os sinais do ambiente externo recebidos pelas células podem ser nutrientes, hormônios, frio, calor, carinho, estresse, entre outros. Assim, o núcleo das células, responde a esses sinais do ambiente conforme o processo de modificações químicas do DNA e da cromatina. De um modo geral, esse conjunto de modificações químicas ou bioquímicas que ocorre no genoma, determina o epigenoma que estabelece diferentes formas de acesso à informação contida no DNA, possibilitando que, após a fertilização, o zigoto com um único genoma dê origem a diferentes tipos celulares, que se diferenciam em órgãos e tecidos do corpo humano.

Ao longo do tempo, pesquisas biológicas baseadas nas teorias genéticas mendelianas, acreditavam que fenótipos específicos dependiam apenas de informação contida no DNA da célula, responsável pela transmissão de características ao longo das gerações. Entretanto, estudos recentes, têm revelado a existência de processos alternativos de herança fenotípica não mendeliana

para esclarecer certos mecanismos de herança que não envolvem mudanças na molécula do DNA. A epigenética, é uma área promissora, para esclarecer esse tipo de herança.

Sabe-se que o fenótipo resulta da interação entre o genoma e o epigenoma o qual é influenciado pelos fatores ambientais. Estudos revelam também que, durante o desenvolvimento humano, ocorrem modificações químicas no genoma que não alteram a sequência do DNA e são denominadas **marcas epigenéticas**, que estão associadas a variações fenotípicas do indivíduo devido às mudanças na expressão gênica que ocasionam.

As marcas epigenéticas podem ser apagadas e reprogramadas durante a produção de gametas e a formação do zigoto e também podem persistir no organismo e serem herdadas juntamente com o DNA para as futuras gerações (herança epigenética transgeracional). Se forem adquiridas no início da vida, podem ocasionar grande impacto no fenótipo adulto com o desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes, obesidade, cardiopatias, artrite reumatoide, entre outras. Além disto, se estas marcas afetarem células gaméticas podem também influenciar no fenótipo das gerações posteriores. Também é conhecido que as marcas epigenéticas estão associadas ao mecanismo de ativação/desativação de um gene em certos tecidos onde a expressão desse gene se faz ou não necessária (**Fig. 4**).



**Fig. 4.** As marcas epigenéticas definem a ativação (ON) e desativação (OFF) dos genes necessários as células e tecidos, influenciando as proteínas expressas.

Fonte: <https://slideplayer.com/slide/3709446>.



Estudos têm comprovado que os padrões e marcas epigenéticas (por exemplo, metilação do DNA, acetilação de histonas da cromatina, expressão de RNAs regulatórios) alteram o acesso à informação genética e são diferentes em cada tipo de célula e tecido do corpo humano e que também podem mudar com o tempo. Enfim, podemos dizer que os mecanismos epigenéticos são fundamentais para o desenvolvimento do indivíduo e decisivos para o mecanismo correto do controle da expressão gênica ao longo da vida.

Enquanto a informação genética (genoma) de uma célula é considerada estável, a informação do epigenoma é considerada um processo dinâmico ao longo da vida, tendo em vista ser orientado pela interação entre fatores genéticos e ambientais. Os esclarecimentos científicos da relação entre genes e ambiente surgiram com a descoberta da base molecular epigenética que controla a ativação e desativação do gene. Após a descoberta desses mecanismos epigenéticos, muitos processos biológicos têm sido melhor compreendidos. A alteração das marcas epigenéticas pode ser originada da interação do genoma do indivíduo com o meio ambiente interno e externo em qualquer estágio de sua vida, gerando epigenomas em permanente adaptação e que podem levar ou não ao desenvolvimento de patologias.

Um exemplo de estudos de mudanças epigenéticas de indivíduos resultante da interação do genoma com o meio ambiente, está na divergência entre os gêmeos monozigóticos que apesar de terem genomas idênticos exibem diferenças fenotípicas como ansiedade, obesidade, entre outras que são acentuadas à medida que envelhecem. Este fato só pode ser explicado pelas experiências individuais vividas ao longo de suas vidas. Isso nos faz concluir que gêmeos monozigóticos possuem genomas idênticos, porém, epigenomas diferentes devido às marcas epigenéticas induzidas pelo meio ambiente. Outro exemplo de modulação controlado pelos mecanismos epigenéticos, é o caso das fêmeas de abelhas que se desenvolvem a partir de larvas geneticamente idênticas, mas a dieta exclusiva com geleia real transforma uma operária infértil em uma rainha fértil, devido a capacidade desse alimento em silenciar um gene chave. Pesquisas revelam também que o estado epigenético e a expressão de alguns genes podem ser afetados pela exposição de gestantes a determinados nutrientes ou toxinas.

Lembrando que esses efeitos epigenéticos podem ser reversíveis, uma vez que dependem do estilo de vida do indivíduo, ao contrário das mudanças genéticas convencionais que são consideradas irreversíveis.

## Mecanismos Epigenéticos

A expressão gênica é um processo complexo que envolve inúmeras etapas. O passo inicial na expressão gênica é a transcrição da molécula de DNA em uma cópia exata do RNA. Para iniciar a transcrição, a RNA polimerase se liga a uma região específica do DNA (o promotor) para formar uma cadeia de RNA mensageiro (RNAm) complementar a uma das cadeias de DNA. Em eucariotos, no processo pós-transcricional, uma guanosina metilada é adicionada à extremidade 5' do RNAm transcrito e essa molécula é processada em um mecanismo conhecido como Splicing. O splicing do RNAm ocorre através de uma série de eventos de clivagem e ligação que removem sequências de íntrons (que não contém informação para aquela proteína) e unem éxons (que contém as informações necessárias a formação da proteína) de uma maneira apropriada.

Em eucariotos, após a união dos éxons, o terminal 3' do RNAm é clivado e uma cadeia de resíduos de adenosina, conhecida como cauda poliA, é adicionada na preparação para o transporte de RNAm do núcleo para o citoplasma. Nesta fase, o RNAm está pronto para ser traduzido pelos ribossomos no citoplasma de uma célula eucariótica, convertendo a informação biológica do RNA em uma proteína. Na tradução, os polipeptídeos são sintetizados de maneira sequencial, do terminal N ao terminal C, por meio de três etapas distintas - iniciação, alongamento e terminação.

Após o início, o código genético é lido em trincas de nucleotídeos (códon) especificados pelo RNAm e os aminoácidos especificados são reunidos durante o processo de alongamento e ligados por uma reação peptidil transferase, resultando na formação de uma ligação peptídica e no alongamento da cadeia de peptídeos. A terminação da tradução ocorre quando um dos códon de terminação (UAG, UAA e UGA) sinaliza a liberação de uma cadeia polipeptídica completa.

Em seguida, o ribossomo se desliga do RNAm e as subunidades ribossômicas (maior e menor) se dissociam, e mais uma vez estão prontas para iniciar um novo ciclo. A proteína gerada pode sofrer várias modificações pós-traducionais antes de ser usada em seu papel funcional.

Este é um resumo simples sobre a expressão gênica em um organismo eucarionte, mas na realidade numerosas etapas regulatórias são envolvidas

para manter a integridade do processo e trabalhar com fatores externos para controlar cada estágio. Pesquisas científicas têm comprovado que processos epigenéticos, incluindo metilação do DNA, modificação de histonas e RNAs regulatórios influenciam a expressão gênica, principalmente no nível da transcrição, no entanto, outras etapas do processo (por exemplo, *splicing* e tradução) também podem ser reguladas epigeneticamente.

A seguir, será descrito o papel da epigenética e sua influência na expressão gênica. Os processos epigenéticos que alteram de maneira estável os padrões de expressão gênica (e/ou transmitem as alterações na divisão celular) incluem: (1) metilação do DNA; (2) modificação pós-traducional das proteínas histonas e remodelação da cromatina; e (3) mecanismos baseados em RNA.

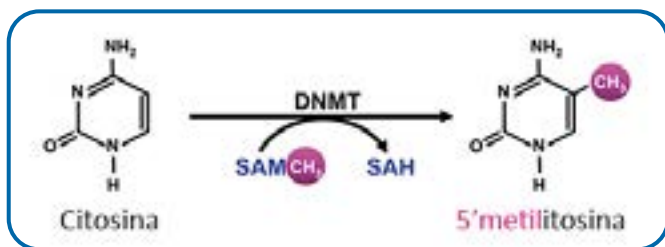
## METILAÇÃO DO DNA

Maria de Mascena Diniz Maia e  
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

### Histórico e Princípios

A metilação do DNA é considerada uma das modificações epigenéticas mais estáveis e mais estudadas e deve ser o principal mecanismo a liderar a herança epigenética ao longo das gerações. Em 1975, dois biólogos ingleses, Robin Holliday e John Pugh, e um biólogo americano, Arthur Riggs, sugeriram pela primeira vez, que a metilação, uma modificação química do DNA, é herdável, pode ser induzida por influências ambientais e deve ser vista como um importante mecanismo para o controle da expressão gênica em organismos superiores. Assim, pode ser apontada como uma marca epigenética herdável e reversível, que se propaga após a replicação do DNA e tem fundamental influência na expressão gênica. Esse mecanismo explica, em parte, as mudanças nos padrões de expressão gênica e a diferenciação celular ao longo do desenvolvimento.

A reação de metilação consiste na adição de um radical metil (-CH<sub>3</sub>) na posição 5' de uma molécula de citosina na sequência do DNA, resultando em uma 5-metil citosina (**Fig. 5**) geralmente seguida por uma guanina (dinu-



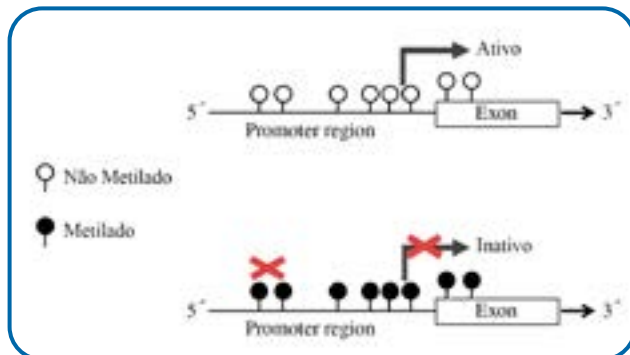
**Fig. 5.** A enzima DNA metil-transferase (DNMT) catalisa a transferência do grupamento metil (CH<sub>3</sub>) da S-adenosil-metionina (SAM) para o carbono 5' da citosina, formando a 5-metilcitosina (5meC) ou seja, a citosina metilada.

Fonte: Adaptado de <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>

cleotídeo 5'-CpG -3', **p** significa ligação fosfodiéster) onde se encontram os sítios de ligação e reconhecimento destes fatores. A citosina é uma base nitrogenada que é muito susceptível a diversas modificações químicas e isso faz com que sua reatividade permita modificações enzimáticas que podem ser adaptadas para novas funções epigenéticas, mas também pode alterar a informação genética codificada e conduzir a mutações. A integridade epigenética deve-se à estabilidade genética da citosina. Vale informar, que os doadores de radical metil são obtidos da dieta e são principalmente a metionina, seguido do folato, colina e vitamina B12.

Os grupos metil permitem a ligação normal de hidrogênio no sulco maior do DNA alterando suas características biofísicas e resultando em dois efeitos: podem inibir o reconhecimento do DNA por algumas proteínas ou podem facilitar a ligação de outras proteínas ao DNA. A metilação do DNA leva ao recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, impedindo que a enzima RNA-polimerase se ligue à molécula. Em geral, a metilação do DNA está associada à repressão gênica e padrões de metilação podem ser mantidos após a replicação do DNA e a divisão mitótica. O emparelhamento 5'-CpG-3', ocorre a uma frequência baixa na maior parte do genoma, mas ocorre a um nível alto nas regiões referidas como ilhas 5'-CpG-3'. Em mamíferos, a metilação pode estar concentrada em regiões do genoma onde há maior densidade de ilhas 5'-CpG-3' ou também em ilhas 5'-CpG-3' isoladas ao longo do genoma. Estima-se que aproximadamente 70-80% de todas as citosinas no contexto CpG são metiladas.

O controle da expressão gênica é influenciado pela localização da metilação do gene. Assim, se a metilação ocorre na região promotora da transcrição, o gene não será transcrito, e, como consequência, não há expressão gênica e o fenótipo é reprimido (**Fig. 6**). Da mesma forma, a metilação no DNA em regiões acentuadoras da transcrição, ou em elementos regulatórios necessários a transcrição de alguns genes, inibem o processo transcricional. Embora a metilação em outras regiões do DNA esteja sendo investigada, parece não ter esse efeito como, por exemplo, nas regiões chamadas de corpo do gene (região após o primeiro éxon), onde a metilação parece contribuir para o aumento da transcrição e não a repressão. Estes mecanismos, no entanto, ainda estão sendo investigados e não se sabe ao certo como acontecem.



**Fig. 6.** Metilação do DNA regulando a ativação da transcrição gênica. TFs: Fatores de transcrição.

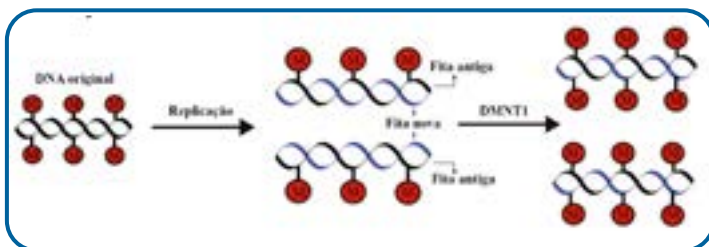
Fonte: Kondo, et al. "Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 37.2 (2008): 389-400.

A ligação de grupos metil à citosina do DNA altera a sua estrutura, com consequentes modificações nas interações do gene com a maquinaria no núcleo da célula necessária para a transcrição, processo geralmente visto como marca repressiva que inibe o início de transcrição, quer por prevenção da ligação de certos fatores de transcrição, quer por recrutamento de proteínas metil-ligantes (MBPs), gerando DNA com cromatina compactada. As regiões da molécula de DNA onde não existem genes ativos (regiões chamadas de heterocromatina) são notadamente compactadas e metiladas. Vale destacar que os perfis de metilação do DNA são alterados em muitas doenças. Estudos revelam que grande parte dos tipos de câncer apresentam tanto hipometilação ao longo do genoma quanto hipermetilação aberrante em genes supressores de tumores ou em RNAs não codificantes.

## Metiltransferases de DNA (DNMTs)

As células têm a capacidade de metilar e desmetilar o DNA, um processo que influencia o controle da expressão gênica. As metiltransferases de DNA (DNMTs) pertencem a uma família de enzimas responsáveis pela metilação do DNA (**Fig. 5**). Foram identificadas quatro DNMTs em mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b, cada uma com sua função específica.

A DNMT1 cuida da manutenção da metilação do DNA durante a replicação, copiando o padrão de metilação da fita de DNA original para a fita recém-sintetizada. Para compreender porque esse processo é necessário e o quanto ele é crucial para a integridade das células, é preciso esclarecer alguns detalhes: A replicação é um processo semi-conservativo, ou seja, as “fitas filhas” são formadas por uma fita ancestral e uma nova e ambas as fitas de DNA são replicadas simultaneamente. O processo de replicação ocorre muito rápido e depende de muitas enzimas que fazem com que a informação da fita nova seja completamente idêntica ao genoma que lhe deu origem. Devido à complexidade deste processo, podem ocorrer erros que são reconhecidos e “consertados” por mecanismos de reparo, ou seja, enzimas identificam o erro e consertam os nucleotídeos errados. Aí surge a pergunta: Se a fita recém-sintetizada é complementar a fita ancestral e o processo ocorre simultaneamente nas duas fitas, como as enzimas de reparo reconhecem qual fita deve ser consertada? É justamente neste ponto que entra a **metilação de manutenção** mediada pela DNMT1 (Fig. 7). Toda a fita ancestral apresenta algum grau de metilação e o mecanismo de reparo, que envolve diversas enzimas, consegue reconhecer a fita original e fita recém-sintetizada. Assim, essas enzimas sabem quem é a fita “nova” que possui o erro. Após o término da replicação e atuação do mecanismo de reparo, uma DNMT1 copia o padrão de metilação do DNA original para a fita nova e o ciclo celular continua. A dupla fita de DNA que contém um dos filamentos metilados e o outro não metilado, é denominada **hemimetilada** (Fig. 7).



**Fig. 7.** Metilação de manutenção mediada por DNMT1, onde a fita recém-sintetizada do processo de replicação recebe a metilação.

Fonte: Heerboth, et al. “Use of epigenetic drugs in disease: an overview.” *Genetics & epigenetics* 6 (2014): GEG-S12270.

Outras DNMTs também são cruciais ao funcionamento da célula, como DNMT3a e DNMT3b. Ambas as enzimas, DNMT3a e DNMT3b, são responsáveis pela maioria dos processos de metilação *de novo*, visando os dinucleotídeos 5'-CpG-3' não metilados de maneira contínua. Enquanto as DNMTs de manutenção atuam sobre regiões de DNA hemimetiladas, as DNMTs responsáveis pela metilação *de novo*, adicionam radicais metil a regiões do genoma que não haviam sido metiladas anteriormente. Estas enzimas (DNMT3a e 3b) controlam a expressão dos genes no contexto da regulação epigenética, em determinadas células e tecidos, durante o desenvolvimento. A metilação de novo é essencial desde o desenvolvimento embrionário, pois após a fertilização ocorre uma desmetilação significativa do genoma, que é como se a célula 'zerasse' sua programação gamética inicial para dar origem ao novo indivíduo e formar diferentes células e tecidos.

Diferentemente, a DNMT2 foi identificada, mas pouco se sabe sobre suas funções. Alguns estudos mostraram que a DNMT2 tem fraca capacidade de metilação do DNA *in vitro* e parece estar envolvido na metilação do RNA.

A desmetilação do DNA é feita por um grupo de enzimas específicas, num processo que pode ser ativo ou passivo. A desmetilação ativa envolve as **desmetilases** e parece ser necessária para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais. Entre as enzimas desmetilases, há uma família de enzimas denominadas *ten-eleven translocation* (TET) que são as principais atuantes no processo ativo de desmetilação e são responsáveis por gerar modificações químicas diferentes na citosina que são mais fáceis para o mecanismo de reparo da célula reconhecer. Neste processo, a 5-metilcitosina pode ser convertida em 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina ou 5-carboxilcitosina. As bases com estas modificações não naturais são facilmente reconhecidas e substituídas por uma citosina nova, sem a metilação, pelos mecanismos de reparo de DNA da célula. Outro processo que pode ocorrer é a desmetilação passiva, onde não há envolvimento de desmetilases, e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular.

Para ilustrar como este processo é essencial para a célula, pesquisas apontam que a redução na atividade de DNMT resultou em desmetilação de dinucleotídeos CpG e reativação de vários genes silenciados por metilação como, p16INK4a, receptor do ácido retinóico b (RARb), O-6-metilguanina



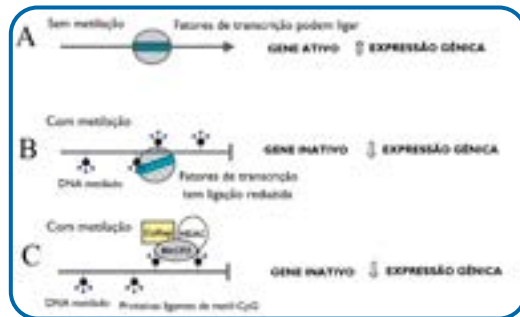
metiltransferase (MGMT) e homólogo humano mutL 1 (hMLH1). Esses exemplos mostram que as células têm a capacidade de metilar e desmetilar genes específicos e controla, assim, a expressão desses genes com a adição de grupos metil associados ao silenciamento e remoção de grupos metil associados à indução da expressão gênica.

## Mecanismos de ação da metilação do DNA

Neste capítulo já foi discutido que a metilação do DNA tem um impacto na regulação de algumas regiões do genoma, mas a pergunta é: como a metilação da citosina influencia na expressão do gene?

A metilação do DNA atua principalmente como um repressor transcricional do gene via múltiplos mecanismos. O primeiro mecanismo, pelo qual a metilação de DNA dificulta a transcrição, é que a adição do radical metil nas citosinas altera o reconhecimento da dupla-hélice pela maquinaria transcricional. Esta maquinaria envolve múltiplas proteínas que são capazes de reconhecer regiões promotoras e os pontos exatos onde precisam se ligar para a transcrição ocorrer. Com as bases nitrogenadas modificadas, as enzimas que reconhecem essa região, principalmente os fatores de transcrição, não reconhecem o local de ligação.

Um segundo mecanismo, pelo qual a metilação impacta na expressão gênica, é que a presença da metilação nas citosinas recruta proteínas co-repressoras que são ligantes do metil-CpG (MBPs) que competem com os fatores de transcrição pela ligação com aquela sequência do DNA, ou seja, gera um impedimento alostérico para a ligação dos fatores de transcrição. Alguns destes repressores foram identificados e os principais deles são as *Methyl CpG binding proteins* (MeCPs), onde são atuantes duas proteínas principais: MeCP1 e MeCP2 (**Fig. 8**). Esta classe de enzimas, uma vez ligada ao DNA, pode recrutar outros correpressores como NCoR (*nuclear receptor co-repressor 1*) e HDACs (histonas deacetilases) que juntas, aumentam o impedimento alostérico para a ligação dos fatores de transcrição e modificam a cromatina, dificultando ainda mais a transcrição gênica. As enzimas HDACs fazem parte de outra regulação epigenética relacionada à modificação de histonas e será abordada nos capítulos posteriores.



**Fig. 8.** Mecanismos de ação pelos quais a metilação do DNA afeta a transcrição gênica. A) o DNA que não apresenta metilação possui transcrição ativa; B) a presença da metilação reduz o reconhecimento e ligação de fatores de transcrição no promotor gênico; C) A presença de metilação recruta co-repressores que modificam cromatina e competem com os fatores de ligação pela sequência de DNA.

Fonte: Ling and Groop. "Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes." *Diabetes* 58.12 (2009): 2718-2725.

Além da função no silenciamento transcricional, muitos pesquisadores têm discutido outras funções da metilação na regulação gênica, principalmente quando esta metilação ocorre em regiões diferentes do promotor gênico, isto é, em regiões regulatórias da transcrição (próximas a genes) e no corpo do gene. Alguns estudos sugerem que a presença de metilação no corpo do gene não tem um impacto negativo na transcrição, e podem até mesmo estimular o alongamento da transcrição. No entanto, esses resultados ainda são controversos e os mecanismos de como isto ocorre não são bem conhecidos até o momento.

## Metilação do DNA em diferentes organismos

A metilação do DNA é importante para as células de todos os organismos vivos, embora o padrão de metilação e os processos fisiológicos relacionados a essa modificação química, muitas vezes, sejam diferentes entre os organismos.

Em **procariontos**, a metilação do DNA foi conhecida desde o ano de 1950 em um estudo de infecção bacteriana por fagos, embora ainda não esteja completamente elucidado seus mecanismos e funções. Nestes organismos, diferente de eucariotos, a metilação ocorre principalmente na adenina,

embora metilações em citosinas também sejam encontradas. Outra diferença significativa entre procariotos e eucariotos é a quantidade de DNMTs. Como já visto neste capítulo, poucas DNMTs atuam em eucariotos, enquanto que uma grande quantidade e variedade de DNMTs já foram encontradas em procariotos.

Uma das principais funções das DNMTs relacionadas à metilação da adenina (desoxiadenosina metilase) está associada ao mecanismo de defesa dos procariotos. Algumas destas DNMTs são associadas a enzimas capazes de cortar um DNA exógeno, isto é, ocorre uma metilação de manutenção dessas células que torna a célula capaz de reconhecer um material genético estranho (sem o padrão de metilação característico de procariotos). Assim, a célula consegue se proteger e degradar o material genético invasor. Além disso, algumas DNMTs em procariotos também parecem estar envolvidas no controle de replicação dos cromossomos, regulação da expressão gênica e o sistema de reparo de incompatibilidade de DNA.

A metilação do DNA também já foi investigada em outros organismos como **leveduras**. Embora diversas vias proteicas sejam similares entre leveduras e mamíferos, ainda não se sabe ao certo se os genes de algumas leveduras estudadas como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe* são regulados pela metilação do DNA, como ocorre em mamíferos. Até mesmo a existência de metilação em citosinas do genoma de leveduras tem sido discutida, isto é, os pesquisadores não têm concordado sobre a existência ou não de metilação no genoma de leveduras. Grande parte dos estudos conduzidos indica ausência da metilação no genoma de leveduras e enzimas DNA metiltransferases também não são comumente encontradas. Alguns estudos, no entanto, mostram níveis baixos de metilação em *S. cerevisiae* e sugerem que possivelmente há baixos níveis de metilação no DNA em leveduras, embora este número seja tão pequeno que não é detectado pelos métodos normalmente utilizados até o momento.

A metilação do DNA também tem sido investigada em **plantas** utilizadas como organismo modelo como *Arabidopsis thaliana*, onde foram encontrados altos níveis de metilação de citosinas. Em plantas, a proporção de citosinas metiladas chega a até 30% do total de citosinas do genoma, número superior ao de mamíferos, por exemplo. Além disso, a metilação do DNA em plantas acontece em qualquer citosina, não necessitando de sequências

CpG ou qualquer outro contexto específico, como em mamíferos. Nestes organismos também são identificados altos níveis de metilação na adenina, principalmente no DNA mitocondrial das plantas. Além disso, a metilação do DNA em plantas tem certa variação e é específica de tecidos, organelas, idade e espécie.

Nestes organismos, o efeito epigenético da metilação do DNA está muito relacionado ao silenciamento gênico, estabilidade do genoma e *imprinting* (processo discutido no próximo capítulo). O efeito biológico dessas alterações epigenéticas, que incluem a metilação do DNA, está relacionado ao contexto ambiental onde a planta está inserida. Algumas funções como, por exemplo, o reconhecimento de vírus, insetos e resposta a estresse ambiental abiótico, como intensidade de luz e ausência de água, bem como, a floração e produção de sementes, são modulados pela metilação do DNA.

Em **animais**, o padrão de metilação e os processos celulares relacionados também variam. Entre estes, a *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas) que é um modelo animal muito estudado, apresenta baixos níveis de metilação em citosinas no genoma e há uma mudança significativa nos níveis de metilação em cada estágio do ciclo de vida. Além disso, alguns tipos de insetos que são sociáveis apresentam a atuação das DNMTs comuns em mamíferos, como DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, já em insetos solitários foi verificada a presença principalmente da DNMT2, embora, até o momento, ninguém saiba ao certo o porquê destas diferenças e qual impacto exercido sobre os processos biológicos. Os mamíferos são os organismos melhor estudados e compreendidos do reino animal, incluindo os seres humanos. Como citado anteriormente, a metilação do DNA em mamíferos ocorre apenas no contexto CpG e estima-se que 3 a 8% de todas as citosinas do genoma são metiladas em mamíferos.

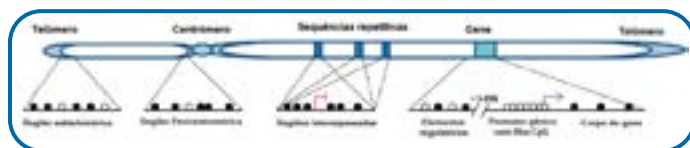
Grande parte das informações apresentadas neste livro baseia-se na compreensão do que foi descoberto em seres humanos e camundongos (*Mus musculus*). O estudo da metilação do DNA em mamíferos tornou possível a compreensão sobre o padrão de metilação, enzimas envolvidas no processo, funções e mecanismos de ação e localização destes no genoma, além, é claro, do efeito biológico que esta alteração química causa nos indivíduos e a implicação destes nos processos biológicos básicos, como será discutido no próximo capítulo.

## METILAÇÃO DO DNA NOS PROCESSOS CELULARES BÁSICOS

Maria de Mascena Diniz Maia

Ciente dos conceitos básicos e mecanismos de ação pelos quais a metilação do DNA impacta, serão discutidos agora os processos celulares básicos e fisiologia do indivíduo relacionados à metilação do DNA. Mas, para tal, é preciso destacar os locais onde a metilação normalmente ocorre no cromossomo, uma vez que os locais e densidade de metilação presentes, impactam a função biológica da metilação. Em mamíferos, algumas regiões do cromossomo com poucos ou quase nenhum gene apresentam uma quantidade muito alta de metilação, por exemplo, regiões teloméricas, subteloméricas, pericentroméricas e sequências repetitivas. Estas regiões são importantíssimas para manutenção e estrutura cromossômica, pois é a partir destas regiões que os cromossomos são alinhados e separados no processo de divisão celular.

A metilação presente nestas regiões garante a integridade e proteção, pois as mantem com um grau significativo de compactação da cromatina, o que diminui, inclusive, as quebras de DNA nestes locais e deixa as regiões menos susceptíveis a mutações, que ocorre normalmente por agentes químicos e físicos. Além das regiões importantes na estrutura cromossômica e divisão celular, as regiões que apresentam sequências altamente repetitivas também são bastante metiladas (**Fig. 9**). Estas regiões normalmente são ricas em elementos de transposição ou transposons que são sequências de DNA, quando não metiladas, são capazes de induzir sua autorreplicação e ‘saltar’ para outro trecho do genoma, podendo inclusive quebrar genes importantes para a célula.



**Fig. 9.** Distribuição da metilação em diferentes regiões do cromossomo.

Fonte: Zampieri, et al. “Reconfiguration of DNA methylation in aging.” *Mechanisms of ageing and development* 151 (2015): 60-70.

Além destes trechos importantes a integridade do cromossomo e do genoma, os genes normalmente apresentam certo grau de metilação, principalmente em locais conhecidos como Ilhas CpG. Estas Ilhas CpG são regiões com um mínimo de 200 nucleotídeos onde o dinucleotídeo CpG (citosina-fosfato-guanina) aparece em pelo menos metade da sequência, e estão localizadas em regiões gênicas ou próximas a genes.

Estima-se que existam aproximadamente 30.000 Ilhas CpG no genoma humano, indicando que grande parte dos genes pode ser regulado pela metilação destas regiões. Além disso, cerca de 70% dos promotores gênicos conhecidos, são associados a Ilhas CpG, sustentando esta hipótese. Normalmente as Ilhas CpGs encontram-se desmetiladas, e provavelmente isto ocorre para permitir a transcrição dos genes. A metilação do DNA é crucial em alguns contextos específicos, onde pode impactar genes, grupos de genes e cromossomos inteiros. Alguns casos serão vistos neste capítulo.

### ***Imprinting* Genômico**

Nos mamíferos, a metilação do DNA é imprescindível para o mecanismo do desenvolvimento embrionário normal e tem grande papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina. O *imprinting* genômico é um processo biológico normal, onde um gene ou grupo de genes é marcado bioquimicamente com informações sobre sua origem parental. Assim, existirá uma marcação específica se o gene teve origem paterna ou materna e, deste modo, se deve ser expresso ou não a fim de manter um funcionamento celular normal.

Você pode perguntar: como uma célula sabe se um gene é de origem materna ou paterna? Ele vem com uma etiqueta de presente? A resposta é que alguns genes passam por um processo chamado *imprinting* durante a gametogênese, ou o início da formação do gameta. O *imprinting* genômico pode ser definido como e em que tempo uma cópia de um gene é silenciada devido à sua origem parental. Uma maneira de silenciar um gene é através da metilação do DNA, onde grupos metil são adicionados aos nucleotídeos da citosina nos dinucleotídeos CG para reduzir a expressão gênica naquela região. Em outras palavras, se a cópia de um gene dos pais precisar sofrer *imprinting* durante a formação do gameta, grupos metil serão adicionados à

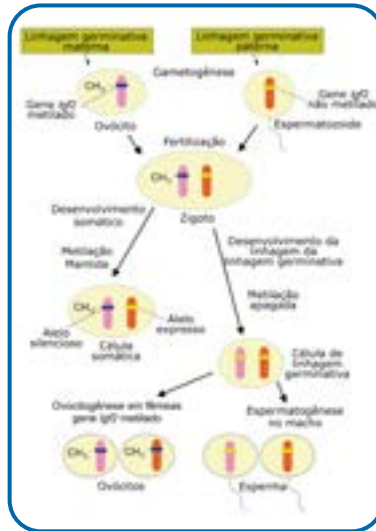
cópia dos pais como um tipo de etiqueta. A célula então não irá transcrever ou expressar essa cópia do gene. É importante ressaltar que essa metilação é mantida durante a replicação do DNA. Dessa maneira, essa marcação não é perdida quando as células se dividem.

O *imprinting* genômico é uma forma normal de regulação de genes que faz com que um subconjunto de genes de mamíferos seja expresso a partir de um dos dois cromossomos parentais. Alguns genes que sofrem *imprinting* são expressos a partir dos cromossomos herdados da mãe e outros a partir dos cromossomos herdados do pai. Isso significa que os genomas materno e paterno não são funcionalmente equivalentes e esta é a razão pela qual, tanto o genoma materno quanto o paterno são necessários para o desenvolvimento normal dos mamíferos. O *imprinting* genômico também foi descrito em plantas nas quais se acredita que o processo tenha evoluído independentemente dos mamíferos, embora aspectos do mecanismo de impressão possam ser os mesmos em ambos os organismos.

A existência de genes que sofrem *imprinting* acrescenta outra dimensão aos padrões de herança previstos pela genética mendeliana. Por exemplo, distúrbios de impressão foram descritos, exibindo efeitos de origem parental em seus padrões de herança. Nesses distúrbios, machos e fêmeas são geralmente igualmente afetados, no entanto, o defeito se manifesta apenas na herança de um dos pais de um sexo. A herança do progenitor do sexo oposto não resulta em uma anormalidade porque o gene defeituoso pode ser reprimido no cromossomo derivado desse progenitor.

Um dos primeiros genes que sofrem *imprinting* já identificado, foi o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2 - Insulin-like Growth Factor 2), que apesar de imprescindível para o desenvolvimento embrionário no meio uterino, apenas o alelo paterno é expresso. Em seguida, foi descoberto o gene H19 que só se expressa na linhagem materna produzindo um RNA não codificante que tem a propriedade de inibir a transcrição do IGF2 e, dessa forma, regula o crescimento fetal.

A superexpressão do IGF2 pode ser responsável pelo crescimento excessivo do embrião e, em geral, só se expressa na ausência de H19. O interessante é que a expressão dos genes H19 e IGF2 estão intimamente ligadas, uma vez que estão expressos nos mesmos tecidos durante o desenvolvimento fetal, apesar de ser a partir de diferentes alelos parentais (**Fig. 10**).



**Fig. 10.** Mecanismo do *imprinting* Genômico do IGF2. O gene é metilado em fêmeas mas não em machos.

Fonte: SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J.; MOTTA, P. A. **Fundamentos de Genética**. 4ed Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2008.

De acordo com a “teoria do conflito genético” o *imprinting* genômico é consequência de um efeito evolutivo entre os mamíferos. Os genes que sofrem *imprinting* seriam mediadores da “batalha entre os sexos” no período fetal, apresentando funções opostas: genes de expressão paterna geralmente promovem o crescimento (por exemplo, IGF2), enquanto genes de expressão materna o suprimem (por exemplo, H19, que inibe a transcrição do gene IGF2). Isto sugere que o interesse paternal é na otimização de seus alelos para adquirir maior quantidade possível de nutrientes, e assim garantir descendentes maiores e mais fortes.

O *imprinting* genômico é um tipo de regulação de transcrição em eucariotos superiores, tendo em vista que pode regular se um gene está “ligado” ou “desligado”. É também um exemplo de alteração epigenética no DNA. Epigenética descreve alterações no DNA ou cromatina que são herdadas ou transmitidas de seus pais juntamente com os próprios genes. É importante ressaltar que a epigenética não se refere à sequência de DNA que você herdou de sua mãe e pai. Literalmente, esse termo significa algo que você herdou fora de seus genes.

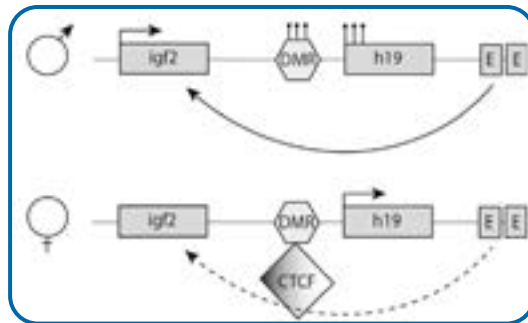


Os genes que sofrem *imprinting* estão localizados em “clusters” e geralmente são controlados por elementos que se ligam na região controladora de *imprinting* (ICR). Um desses elementos envolvidos no controle da expressão é a proteína CTCF que se liga em ICR não metiladas ou hipometiladas e bloqueia a transcrição. As ICRs são sequências de DNA ricas em CpG e são metiladas em um dos dois gametas parentais. Essa metilação *imprinting* é adquirida durante a gametogênese, porém antes da determinação do sexo esses *imprinting* parentais são apagados nas células germinativas na gônada fetal. Como o embrião se desenvolve em macho ou fêmea, o *imprinting* gamético é colocado em genes *imprinted* paternos durante a produção de espermatozoide ou em genes *imprinted* maternos durante a formação dos ovócitos. Assim, após a fecundação essa metilação *imprinted* é mantida no mesmo cromossomo parental através das divisões celulares.

H19/IGF2 representa os primeiros genes historicamente caracterizados como *imprinted* genes. Tanto o H19 como o IGF2 são mapeados no cromossomo 11p15.5. O H19 codifica um RNA longo não codificante (lncRNA), que modula negativamente a proliferação de células trofoblásticas placentárias humanas. Em particular, o lncRNA expresso pelo H19 tem como alvo o microRNA (miR-675), que, por sua vez, reprime a transcrição do IGF1R. O IGF2 codifica um fator de crescimento que é capaz de ativar o receptor de fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF1R) e promover o crescimento fetal e placentário. Ao contrário do IGF1, que é preferencialmente expresso após o nascimento, o IGF2 é produzido principalmente no desenvolvimento embrionário inicial. Com base nisso, pode-se supor que uma expressão baixa do gene IGF2 no espermatozóide possa influenciar negativamente o resultado da gravidez, embora nenhum estudo tenha investigado esse aspecto até o momento.

A expressão do gene IGF2 é regulada pela taxa de metilação da DMR (Região diferencialmente Metilada) do H19. No alelo materno, a DMR do H19 não é metilada, permitindo a expressão do H19 e impedindo o acesso ao potencializador do gene IGF2. No alelo paterno, a metilação do DMR do H19 leva à expressão do gene IGF2. Vários estudos descreveram a ocorrência de baixas taxas de metilação da DMR H19 em pacientes inférteis (**Fig. 11**). No nível espermático, isso pode levar à baixa expressão do gene IGF2, afetando o resultado da gravidez.

Um resultado de estudo realizado em 119 placentas humanas (56 por fertilização *in vitro* [FIV], 41 por injeção intracitoplasmática de espermatozoides [ICSI] e 22 por concepção natural) encontrou níveis 1,9 e 1,8 vezes mais altos de expressão de lncRNA codificado pelo H19, respectivamente em placentas derivadas de ICSI e IVF comparadas com aquelas provenientes da concepção natural. Além disso, os níveis de mRNA de IGF2 resultaram significativamente mais baixos em casais submetidos à ART (Técnica de Reprodução Assistida) em comparação com os controles e, embora o peso ao nascer e da placenta tenham sido menores no grupo de ART, eles não foram significativamente diferentes em comparação aos controles. Este estudo fornece evidências para expressão anormal de H19 e IGF2 em placentas de pacientes submetidas à ART. Devido à taxa anormal de metilação da DMR do H19 observada em pacientes inférteis, homens submetidos a programas de ART podem provavelmente apresentar hipometilação do gene H19, o que pode explicar a expressão anormal de H19 e IGF2 nas placentas derivadas de ART.



**Fig. 11.** Mecanismo de regulação dos genes IGF2 e H19. O genoma paterno expressa o gene IGF2 pela ação de elementos potencializadores ou enhancers (E). No entanto, o gene H19, não é expresso devido a metilação na Região Diferencialmente Metilada (DMR) e no promotor do gene. Porém, no genoma materno a ausência de metilação na DMR provoca o recrutamento de proteínas do tipo CTCF as quais bloqueiam a atividade dos potencializadores (E) sobre o gene paterno IGF2. Em consequência, a expressão do gene IGF2 é interrompida e assim favorece a atividade dos potencializadores (E) sobre a expressão do gene materno H19.

Fonte: German, R.; Miguel, L. Impronta Genómica y Desarrollo Embrionario Genomic Imprinting and Embryonic Development. **Int. J. Morphol.**, v.30 (4):1453-1457, 2012.

## Epigenética da Inativação do Cromossomo X em Humanos

A inativação do cromossomo X ocorre no início do desenvolvimento de fêmeas de mamíferos. Uma vez feita a escolha inicial de qual X inativar, o mesmo X é silenciado de forma estável através de divisões mitóticas subsequentes. Assim, as fêmeas são mosaicos para duas populações celulares: uma na qual o cromossomo X paterno está ativo e uma na qual o cromossomo X materno está ativo. Esse mosaicismo é observável quando o produto de um gene ligado ao X pode ser visualizado, como no caso da cor da pelagem dos gatos malhados. De fato, a expressão irregular ou em mosaico dos genes ligados ao X foi uma base para a hipótese original de Lyon, em 1961.

Acredita-se que a inativação do cromossomo X ocorra a fim de obter equivalência de dose entre fêmeas de mamíferos que têm dois cromossomos X e machos, que têm um único cromossomo X e o cromossomo Y, que determina o sexo. Em outros organismos com cromossomos sexuais, há uma necessidade semelhante de **compensação de dose**, no entanto, o mecanismo para obter expressão gênica cromossômica equivalente em sexo é bastante variado. Por exemplo, em *Drosophila*, o único cromossomo X em machos (XY) é hiper-transcrito ou hiperativado; em *C. elegans*, ambos os cromossomos X em hermafroditas são hipoativados. Esses são os três mecanismos diferentes de compensação de dose – inativação, hiperativação e hipoativação. Apesar dos resultados muito diferentes, todos esses processos envolvem modificações da cromatina e os processos de *Drosophila* e de mamíferos envolvem um RNA funcional.

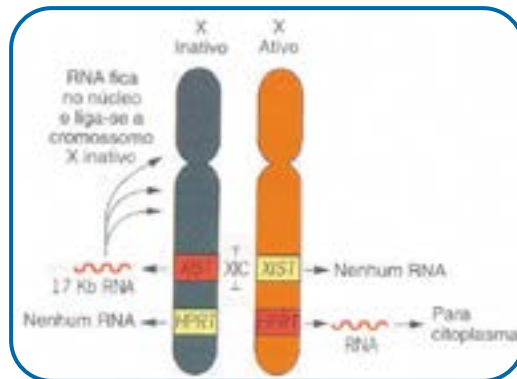
Como a necessidade de compensação de dose surge da divergência dos cromossomos X e Y, previa-se que os genes compartilhados entre os dois cromossomos, particularmente aqueles nas regiões de emparelhamento do X e Y (as regiões pseudoautossômicas - PAR), não seriam sujeitos à inativação de X. Este é realmente o caso, e diz-se que esses genes escapam da inativação. Surpreendentemente, também há um grande número de genes adicionais no cromossomo X humano que escapam à inativação.

Há décadas, os geneticistas têm tentado elucidar a base molecular de compensação de dose. A ideia mais aceita é que alguns fatores se ligam especificamente ao cromossomo X e alteram suas atividades transcricionais.

Em mamíferos diplóides, todos os cromossomos X, exceto um, são inativados, sugerindo uma marcação inicial de um único X ativo. Porém,

nem todos os genes em um cromossomo X inativado são transcricionalmente silenciados. O gene que permanece ativo é denominado XIST, que em seres humanos foi comprovado que este gene codifica um transcrito RNA (Xist) de 17kb desprovido de leitura aberta significativa, ou seja, não codifica proteína. Assim, esse gene tem como produto de transcrição um RNA (Xist) que não é traduzido. É um RNA longo, poliadenilado, restrito ao núcleo e está nos cromossomos X inativados e parece não estar associado aos cromossomos X ativos nem de machos nem de fêmeas.

A inativação do X começa em um local chamado centro de inativação do X, a região Xic (**Fig. 12**) e se espalha em sentidos opostos até as pontas do cromossomo e à medida que são produzidas mais cópias do RNA (Xist) do XIST, o cromossomo X vai sendo coberto por esse material (RNA). Em seguida o RNA atrai histonas que encobrem ainda mais o X inativo, além de fatores de metilação. Por fim, quando o cromossomo inativado é compactado, pode ser visto como uma pequena estrutura globular heterocromática chamada de corpúsculo de Barr, visto ao microscópio óptico nos núcleos interfásicos, e associado à membrana nuclear das células. O Xist/XIST é um grande RNA não traduzido, poli-adenilado processado alternativamente sendo o único gene transcrito do cromossomo X inativo, mas não do cromossomo X ativo das células somáticas. O gene não possui nenhuma estrutura de leitura aberta conservada e, presumivelmente, funciona como um RNA. Antes da inativação,



**Fig. 12.** Inativação do cromossomo X em humanos. Expressão do gene XIST no cromossomo inativo de mulheres.

Fonte: SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J.; MOTTA, P. A. **Fundamentos de Genética**. 4ed Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2008.

a expressão de Xist (RNA) é detectada como um pequeno ponto de expressão de ambos os cromossomos X, até que os transcritos se acumulem e se localizem no futuro X inativo, mediado pelo menos em parte pela estabilização do transcrito. O enigma de como um dos dois cromossomos X aparentemente equivalentes pode ser escolhido para expressar Xist e, portanto, ser inativado, ainda precisa ser esclarecido. É claro, no entanto, que componentes do Xic estão envolvidos, e foi sugerido que os níveis de RNA (Xist) podem influenciar qual X sofre inativação.

As regiões promotoras Xist/XIST em camundongos e humanos são constitutivamente ativas, contendo locais de ligação para fatores de transcrição e sem atividade específica para o sexo. Assim, elementos adicionais devem ser responsáveis pelo silenciamento do XIST nos machos e pela expressão de um único X nas fêmeas. A metilação do DNA tem sido implicada na regulação do Xist/XIST em células diferenciadas, uma vez que a região promotora do alelo transcricionalmente ativo no cromossomo X inativo não é metilada, enquanto a do alelo transcricionalmente inativo no cromossomo X ativo é metilada, ou seja, no cromossomo X ativo o gene XIST encontra-se hipermetilado. A perda da metilação de XIST/Xist resulta na expressão do gene em células somáticas, mas não embrionárias, sugerindo que a metilação é um evento tardio no controle da expressão de XIST. Os elementos 5' e 3' do gene XIST parecem regular a função do Xist no início do desenvolvimento e, portanto, são componentes importantes do Xic.

Os cromossomos X inativos devem ter uma estrutura de cromatina muito diferente de outros cromossomos devido em parte, à associação de histonas ao DNA. Uma das quatro histonas, a H4, pode ser modificada quimicamente pela adição de grupos acetil a qualquer lisina de sua cadeia polipeptídica. A H4 acetilada (que significa ativação de gene) está associada em todos os cromossomos no genoma humano, porém no X inativo ela está restrita a três bandas estreitas que correspondem a regiões de genes ativos do cromossomo X inativo. A H4 acetilada também está ausente em áreas de heterocromatina nos outros cromossomos. Assim, podemos concluir que a falta de H4 acetilada, é uma característica essencial do cromossomo X inativo.

Para definir se a inativação do X é um processo aleatório, temos que considerar o momento em que se dá o processo de inativação. Nós não sabemos com precisão em que instante do desenvolvimento ocorre a inativação,

mas sabe-se que acontece muito antes do nascimento, que existem muitas divisões celulares posteriores e que cada linhagem celular conserva o padrão de inativação da célula com o X inativado que lhe deu origem. Assim, é mais aceitável dizer que o fenômeno é aleatório em relação às linhagens celulares, como uma determinada população de células da pele, por exemplo. Podemos ver um exemplo de inativação aleatória do X em mosaicismos nos padrões de coloração, encontrados no pelo de alguns mamíferos, como nas pelagens tricolores das raças de gatas cálico, já que esses padrões estão relacionados ao cromossomo X e são exclusivos das fêmeas. A distribuição das áreas claras, escuras e cor de laranja numa gata cálico revela, com riqueza de detalhes, a inativação aleatória do X nas linhagens de células capilares do animal (**Fig. 13**).



**Fig. 13.** Gata da raça cálico.

Fonte: <https://www.peritoanimal.com.br/porque-os-gatos-tricolores-sao-femeas-20667.html>.

A hipermetilação do DNA é observada na região 5' dos genes no X inativo, mas não no X ativo ou nos genes no X inativo que escapam à inativação. Geralmente, considera-se que a metilação é um evento tardio no processo de inativação do X e acredita-se que desempenhe um papel mais significativo na manutenção do estado inativo do que na iniciação. Isso é apoiado por estudos que mostram que células deficientes em DNA metiltransferases (DNMT1 e DNMT3a/DNMT3b) demonstram expressão Xist (RNA) adequada e silenciamento de genes ligados ao X. Por outro lado, a importância posterior da metilação do DNA para a inativação do cromossomo X é apoiada por estudos que demonstraram a reativação de alguns genes após o tratamento com agentes desmetilantes, particularmente em conjunto com a interrupção de outras características de um cromossomo X inativo estável.

## MODIFICAÇÃO DE HISTONAS

Maria de Mascena Diniz Maia

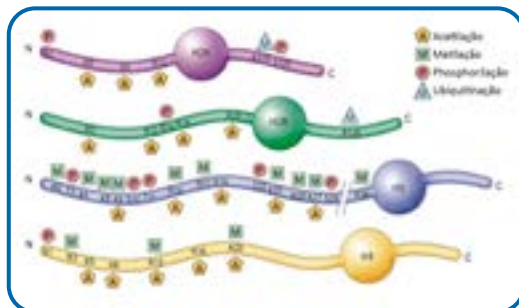
### Histonas na expressão gênica

Nas células eucarióticas, cada cromossomo contém uma única molécula de DNA associada às proteínas histonas formando uma estrutura chamada nucleossomo, em cujo contexto a transcrição gênica ocorre. A unidade básica da cromatina é o nucleossomo que consiste em um octâmero de duas moléculas de cada uma das quatro moléculas de histonas (H2A, H2B, H3 e H4), em torno do qual estão envolvidas 147 pb de DNA. Outro tipo de histona (histona ligante, H1) liga-se externamente ao DNA entre os nucleossomos (**Fig. 3**). As histonas ajudam a acondicionar o DNA para que ele possa ser contido no núcleo da célula tendo em vista ser uma longa molécula, porém mais recentemente foi demonstrado seu envolvimento regulador da expressão gênica.

As histonas centrais são proteínas básicas altamente conservadas com domínios globulares em torno dos quais o DNA é envolto em caudas flexíveis, relativamente não estruturadas, que sobressaem do nucleossomo. Os resíduos de lisina podem se ligar a um, dois ou três radicais metil enquanto a arginina pode ser mono ou di metilada.

As caudas estão sujeitas a uma variedade de modificações pós-traducionais. Essas modificações afetam a função dos cromossomos por dois mecanismos: 1) quase todas as modificações alteram a carga eletrostática das histonas graças à adição de grupos funcionais, formando ligações covalentes através da acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, entre outras, o que pode levar a mudança nas propriedades estruturais das histonas e ligantes do DNA. 2) essas modificações podem criar, estabilizar, romper domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo do DNA (**Fig. 14**).

Nas histonas, ao contrário da metilação do DNA que normalmente desativa os genes, algumas modificações estão associadas à ativação como



**Fig. 14.** Principais modificações de histonas e o local onde estas ocorrem. Fonte: Gräff, and Mansuy. "Epigenetic codes in cognition and behaviour." Behavioural brain research 192.1 (2008): 70-87.

acetilação e outras como a metilação pode ativar ou desativar genes dependendo da posição da modificação do aminoácido nas caudas das histonas. Por exemplo, a metilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 está associada a genes ativos, enquanto nas lisinas 9 e 27 está associada a genes silenciados (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** O efeito da metilação da lisina de histona sobre a transcrição do DNA.

<b>Modificação</b>	<b>H3K4</b>	<b>H3K9</b>	<b>H3K27</b>	<b>H3K79</b>	<b>H4K20</b>	<b>H2BK5</b>
Mono-metilação	Ativação	Ativação	Ativação	Ativação	Ativação	Ativação
Dimetilação	Ativação	Repressão	Repressão	Ativação	-	-
Trimetilação	Ativação	Repressão	Repressão	Ativação Repressão	-	Repressão

Fonte: A autora. M.M.D.Maia

As modificações pós-traducionais dessas proteínas são importantes para o controle da expressão gênica, ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X.

## Código das Histonas

O “código de histona” é uma hipótese que afirma que a transcrição do DNA é regulada em parte por modificações químicas pós-traducionais

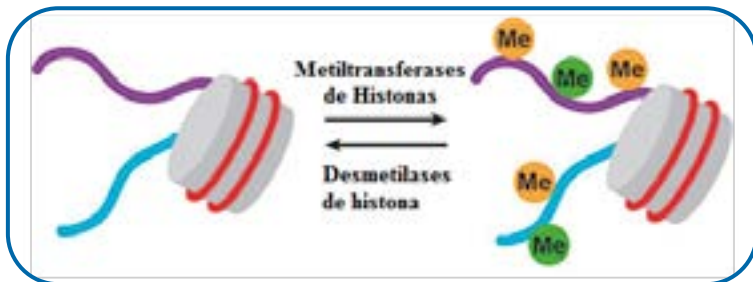


nas proteínas das histonas. Por meio desses mecanismos, o fenótipo de uma pessoa pode mudar sem alterar sua composição genética, mas controlando a expressão gênica. Assim, podemos observar que as modificações químicas nas histonas, como acetilação, metilação e ubiquitinação, causam conversão de DNA de um estado de eucromatina para um estado de heterocromatina e vice-versa.

Os resíduos de lisina e arginina são metilados nas histonas. Porém as lisinas metiladas são as marcas mais bem compreendidas do código das histonas, pois aquela lisina específica metilada indica os estados de expressão gênica. Por exemplo, a metilação das lisinas H3K4 e H3K36 está correlacionada com a ativação transcricional, enquanto a desmetilação de H3K4 está correlacionada com o silenciamento da região genômica. A metilação das lisinas H3K9 e H3K27 está associada com a repressão transcricional (**Tabela 1**).

## Metilação de Histonas

A metilação de histona é a modificação de certos aminoácidos em uma proteína de histona pela adição de um, dois ou três grupos metil. Como sabemos, no núcleo celular, o DNA é enrolado em torno das histonas. A metilação e a desmetilação das histonas desativam e ativam os genes do DNA, respectivamente, afrouxando suas caudas, permitindo que fatores de transcrição e outras proteínas acessem o DNA ou enrolem suas caudas ao seu redor, restringindo assim o acesso das ferramentas de transcrição à molécula do DNA (**Fig. 15**).



**Fig. 15.** Metilação e Desmetilação de Histonas.

Fonte: Figura modificada de <http://pharmacy.wisc.edu/>.

Esta modificação altera as propriedades do nucleossomo e afeta suas interações com outras proteínas. A metilação da histona geralmente está associada à repressão transcricional. No entanto, a metilação de alguns resíduos de lisina e arginina das histonas resulta em ativação transcricional. As enzimas envolvidas na metilação da histona são as histonas metiltransferases (HMTs), que atuam predominantemente nas histonas H3 e H4. Existem dois tipos de metilação da histona, a direcionada ao resíduo de arginina (R) e a direcionada ao resíduo de lisina (K). Geralmente, a metilação da arginina está envolvida na ativação gênica e com isso, as histonas metiltransferases (HMTs) são recrutadas pelos promotores como fatores coativadores. Em comparação, a metilação da lisina pode ter múltiplos efeitos na função da cromatina, dependendo do resíduo específico da lisina e do nível de modificação (mono-, di- ou trimetilação de uma única lisina). Por exemplo, a dimetilação de H3-K9 e a trimetilação de H3-K27 estão amplamente associadas ao silenciamento de genes e à formação de heterocromatina, enquanto a metilação de H3-K4, H3-K36 ou H3-K79 está associada à cromatina ativa (**Tabela 1**).

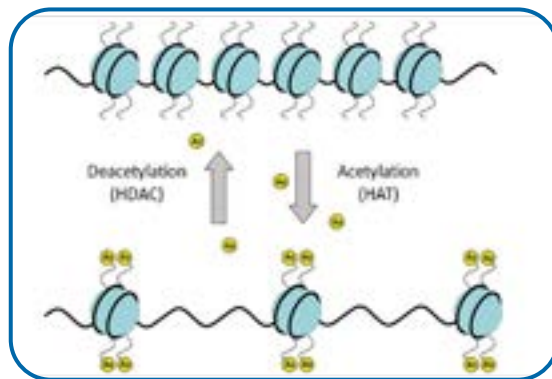
A metilação da histona afeta a expressão gênica, em parte por sua associação com a metilação do DNA, pois muitas proteínas envolvidas na metilação do DNA (como as metiltransferases de DNA e proteínas de ligação a grupo metil) também interagem diretamente com as enzimas metiladoras de histona. Esses processos indicam uma convergência das vias de metilação do DNA e das histonas, que podem cooperar para silenciar os genes supressores de tumores nas células cancerígenas.

O estado de metilação dos resíduos de histona é regulado dinamicamente através das atividades opostas das histonas metiltransferases e desmetilases. As modificações das histonas como acetilação e fosforilação são reguladas dinamicamente através de ações enzimáticas opostas; i.e. acetiltransferases/ desacetilases ou cinases/ fosfatases. Até recentemente, pensava-se que a metilação da histona era uma marca estática sem essa relação dinâmica. Essa suposição se baseava na alta estabilidade da ligação carbono-nitrogênio e, portanto, pensava-se que a remoção da marca do radical metil ocorresse apenas através do *turnover* de histonas ou remoção proteolítica das caudas de histonas. A descoberta de enzimas desmetilases, capazes de remover essa marca, solidificou a natureza dinâmica da metilação da histona e abriu espaço para diversas descobertas biológicas e farmacológicas.

## Acetilação de Histonas

Acetilação e desacetilação de histonas são processos pelos quais os resíduos de lisina na cauda do N- terminal que se projetam do núcleo de histonas do nucleossomo são acetilados e desacetilados como parte da regulação dos genes. Os mecanismos subjacentes ao controle da expressão gênica dependente da acetilação da histona incluem um efeito direto na estabilidade das matrizes nucleossômicas e na criação de locais de acoplamento para a ligação de proteínas reguladoras.

A acetilação da histona é catalisada pelas histonas acetil transferases (HATs), enquanto a reação reversa é realizada pelas histonas desacetilases (HDACs) (**Fig. 16**). As histonas acetiltransferases e desacetilases são, respectivamente, as enzimas dedicadas à adição e remoção de grupos acetila dos resíduos de lisina nas caudas N- terminal da histona. A acetilação das histonas é atribuída à ativação transcricional, silenciamento gênico, reparo de DNA e progressão do ciclo celular.



**Fig. 16.** Processo de acetilação e Desacetilação de histonas. A histona acetiltransferase (HATs) adiciona grupos acetila (Ac) às caudas de histona, o que resulta em uma abertura do nucleossomo, permitindo que fatores de transcrição acessem o DNA e iniciem a transcrição gênica.

As histonas desacetilases (HDACs) removem o Ac das caudas de histonas, levando a uma estrutura da cromatina fechada impedindo a transcrição gênica.

Fonte: Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW.

Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2009; 30(3):266–277.

As histonas acetiltransferases (HATs) são enzimas que acetilam resíduos de lisina em suas ramificações N-terminais em histonas, através da transferência de um grupo acetil da Coenzima A, formando o N-acetil-lisina. As histonas deacetilases (HDAC's) são uma família de enzimas que representam papéis fundamentais em vários processos biológicos, principalmente porque se caracterizam por sua ação repressiva na transcrição gênica. São classificadas como enzimas capazes de remover grupos acetil ( $O=C-CH_3$ ) do aminoácido lisina em uma histona, permitindo às histonas a capacidade de compactar o DNA. A acetilação de resíduos de lisina nas caudas de histonas N-terminais é uma das modificações covalentes mais estudadas que influenciam a regulação de genes em células eucarióticas. As enzimas exercem papel fundamental nos processos de desenvolvimento e sua desregulação tem sido associada à progressão de diversos distúrbios humanos, incluindo o câncer.

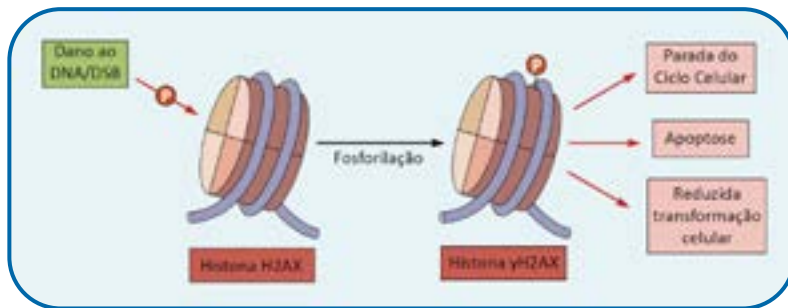
HATs e HDACs participam da renovação de grupos acetil de histonas no genoma e, além disso, algumas também modificam outros fatores. Através de sua interação física com sequência específica de fatores de transcrição, estas enzimas também são direcionadas a promotores específicos e nesse local modificam as histonas ou fatores de transcrição e, assim, regulam a transcrição de genes. A acetilação de histonas neutraliza a carga positiva nos resíduos de lisina (K), de maneira a enfraquecer as interações eletrostáticas entre as histonas e o esqueleto de fosfato do DNA e a promover a expressão gênica. A acetilação de lisina nas histonas H3 e H4 está associada à cromatina ativa ou aberta, uma vez que permite que vários fatores de transcrição tenham acesso aos promotores gênicos.

Acetilação nas histonas H2A no resíduo K5, H2B nos resíduos K5, K12, K15, K20, H3 nos resíduos K4, K14, K18, K23, K27 e H4 nos resíduos K8 e K16 tem efeitos na ativação da expressão gênica (código das histonas). É importante saber que a histona H1 também é importante na determinação do nível de condensação do DNA, mas não é regulada pela acetilação.

Enfim, devemos ter em mente que a acetilação das caudas lisina da histona não é aleatória e que as HATs preferencialmente acetilam caudas de histonas específicas. Curiosamente, as enzimas HATs também têm como alvo proteínas não-histonas, como por exemplo, os fatores de transcrição TP53, E2F1 e GATA1. Por outro lado, a desacetilação por HDACs remove grupos acetil de neutralização de carga das caudas lisina da histona, levando à condensação da cromatina e à inativação gênica.

## Fosforilação de Histonas

A fosforilação de histonas pode ocorrer em serina, treonina ou tirosina (**Fig. 17**). Como a acetilação, a fosforilação está geralmente associada à ativação transcricional. Isso é compreensível, pois o grupo fosfato adicionado aos aminoácidos é carregado negativamente e, assim, cria uma força repulsiva com os fosfatos com carga negativa da estrutura do DNA. A fosforilação da histona é mediada por meio de proteínas cinases (que adicionam grupos fosfato) e proteínas fosfatases (que removem grupos fosfatos). Por exemplo, em relação ao sistema nervoso central, a fosforilação de histonas pode ser a mais interessante modificação de histonas, pois a ativação de muitos neurônios leva à ativação de proteínas cinases e/ou proteínas fosfatases.



**Fig. 17.** Fosforilação de Histonas.

Fonte: Taraswi, B. and Debabrata, C.A. Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. v.31, n. 24, p. 4858–4873, Dec. 2011. MINIREVIEW

O processo de fosforilação de histonas está associado à condensação mitótica e a segregação cromossômica, transcrição e reparo de danos ao DNA e a ativação da apoptose. Assim, a fosforilação da histona H3, por exemplo, está envolvida em dois processos estruturalmente opostos: ativação transcricional, que requer a cromatina descompactada durante a interfase, e condensação cromossômica durante a divisão celular. A modificação de histonas por fosforilação pode ocorrer em todas as classes das histonas, em resíduos de serina e treonina. Quatro sítios de fosforilação na serina são identificados: serina 10 e 28 da H3, serina 1 da H4, serina 1 da H2A e serina 14

da H2B. Entre essas modificações, destaca-se a fosforilação do resíduo serina 10 da histona H3 (H3S10f). Embora a acetilação e a metilação das histonas tenham sido estudadas extensivamente ao longo dos anos, a fosforilação das histonas, só recentemente se tornou um tópico de investigação mais interessante, devido às informações sobre as novas funções celulares das histonas fosforiladas continuamente relatadas na literatura.

Na maioria dos casos, a fosforilação dos resíduos de serina e treonina das caudas de histonas parece estar envolvida na condensação da cromatina durante a mitose e meiose; por exemplo, a fosforilação C-terminal de Thr119 na histona H2A está ligada à regulação da estrutura e função da cromatina durante a mitose, e a fosforilação da H3 Ser10 (H3S10) está relacionada à compactação da cromatina durante a mitose. Ainda, a fosforilação da histona H2AX S139 também foi associada à apoptose.

## O MUNDO DOS RNAS

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

### RNAs e o dogma central da biologia

Os RNAs (ácidos ribonucleicos) desempenham funções vitais na manutenção, homeostase e funcionamento de todas as células. Esta molécula é tão importante e versátil nos processos celulares que há uma hipótese em que o RNA foi considerado a primeira forma de vida na Terra primitiva e foi responsável pela formação da primeira célula procariota. Na hipótese do **Mundo de RNA**, proposta por Walter Gilbert, em 1986, a ideia de que o RNA foi a primeira molécula parece plausível, pois ela tem propriedades informativas como o DNA, ou seja, pode passar informação adiante para outras células e, tem propriedades catalíticas como enzimas, ou seja, podem catalisar reações como a própria síntese e outras funções que permitiram estabelecer a primeira célula formada. Neste capítulo, a grande versatilidade de funções de moléculas de RNA será abordada.

Diferente do DNA, o RNA geralmente é uma molécula de simples fita, o que o torna mais flexível e permite que a molécula apresente diversas conformações. Algumas moléculas de RNA podem ser denominadas de ribozimas pelo fato de que podem catalisar reações, como enzimas proteicas. Além disto, o RNA apresenta uma ribose em seu nucleotídeo, diferente do DNA que apresenta uma desoxirribose e, nos ribonucleotídeos, as bases nitrogenadas são adenina, guanina, citosina e uracila.

Existem diversos tipos de RNA em uma mesma célula, embora apenas algumas classes sejam discutidas amplamente em aulas de genética básica e molecular. Um dos principais pontos onde os RNAs celulares são abordados é no **dogma central da biologia**, que se refere ao fluxo de informações contidas no DNA até a formação de uma proteína, passando pela molécula intermediária do RNA (DNA → RNA → Proteína) (**Fig. 18**). No entanto, este RNA intermediário mencionado no dogma central da biologia refere-se ao RNA mensageiro (mRNA) ou **RNA codi-**

**ficante** que representa em média 4% de todo RNA presente na célula, ou seja, aproximadamente 4% do RNA celular é traduzido em proteína. Todas as outras moléculas de RNA vão desempenhar suas funções na forma de moléculas de RNA e são denominadas de **RNAs não codificantes**.

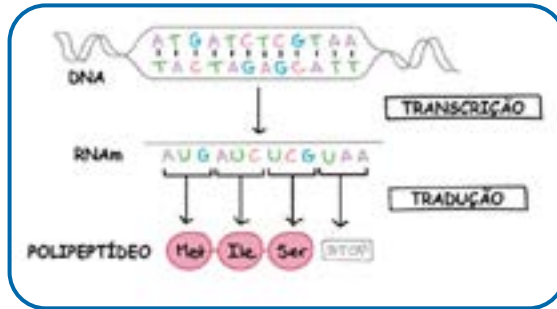


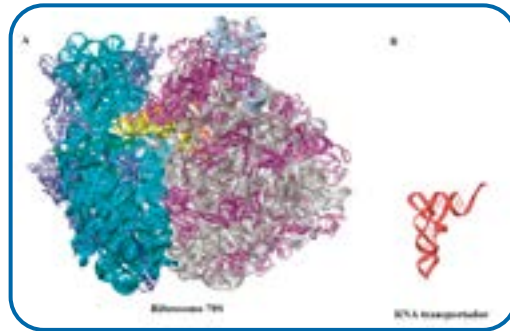
Fig. 18. Dogma Central da Biologia.

Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Dogma\\_central\\_-\\_traduzido.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Dogma_central_-_traduzido.jpg)

A maior parte dos RNAs não codificantes são essenciais no processo de tradução (conversão da informação biológica presente em um mRNA em uma proteína), como o RNA ribossomal, que representa aproximadamente 70% do RNA celular uma vez que são responsáveis por compor as “fábricas de proteínas” (ribossomos) e são transcritos em muitas cópias. E o RNA transportador, que representa aproximadamente 15% do RNA total e também são transcritos em muitas cópias, uma vez que são os “operários” dos ribossomos (Fig. 19) e cruciais para o processo de tradução acontecer. Estas classes de RNAs são transcritas como produto final, uma vez que têm conformações específicas que fazem com que sua função possa ser desenvolvida sem que precise ser convertido em uma proteína.

Além destas classes de RNA, existem os **RNAs regulatórios não codificantes** que também fazem parte do funcionamento básico celular e podem apresentar diferenças entre as células. Alguns RNAs regulatórios são específicos de eucariotos e atuam no núcleo, como os pequenos RNAs nucleares e nucleolares (snRNA e snoRNA) que são importantes no processo de transcrição atuando inclusive no mecanismo de *splicing* que une éxons. Os snRNAs atuam se unindo a proteínas para compor o complexo ribonucleoproteico de processamento, também conhecido como spliceossomo, para retirar íntrons do mRNA eucariótico. Enquanto que os snoRNAs atuam principalmente





**Fig. 19.** A. Estrutura do ribossomo 70S contendo RNA ribossomal (azul ciano, cinza e azul acinzentado), proteínas ribossomais (azul escuro e roxo), RNA transportador (amarelo e laranja) e RNA mensageiro (verde). B. Conformação do RNA transportador.

Fonte: Noller, H. F. (2005). RNA structure: reading the ribosome. *Science*, 309(5740), 1508-1514.

no nucléolo, ajudando no processamento de outros RNAs funcionais como RNA ribossomal e RNA transportador.

Seja na forma de RNA mensageiro, ribossomal, transportador ou os RNAs pequenos nucleolares e nucleares, é possível perceber a crucial importância desta molécula para o funcionamento da célula. Mas, além destas funções, muitos RNAs pequenos são importantes na regulação da expressão gênica e são considerados **RNAs de interferência**, conhecidos também como marcas epigenéticas importantes na diferenciação, funcionamento celular e até mesmo na proteção do genoma. É importante destacar que os RNAs funcionais necessários à síntese proteica e processamento do RNA tem uma expressão constitutiva em todas as células, ou seja, estão sendo sintetizados continuamente. Por outro lado, os RNAs regulatórios só serão sintetizados mediante a necessidade celular e diferentes RNAs regulatórios são expressos em células diferentes. Além disto, também é importante destacar que os RNAs ribossomais e transportadores estão presentes em todos os tipos celulares, enquanto que os outros RNAs não codificantes estão presentes apenas em eucariotos e os snoRNAs estão presentes em *eucariotos e archaea*.

Os RNAs de interferência funcionam normalmente diminuindo a expressão de um gene em mecanismos de silenciamento gênico que serão abordados posteriormente. Estes RNAs de interferência basicamente são os miRNAs (microRNAs), siRNAs (small interfering RNA), piRNAs (Piwi-interacting RNA) e lncRNA (long non-coding RNA).

## Regulação epigenética mediada por RNAs em procariotos

A maior parte do conhecimento acerca da regulação da transcrição e tradução mediada por RNAs é gerada em organismos eucariotos. No entanto, pequenos RNAs regulatórios também são encontrados em procariotos, estudos indicam que estes RNAs podem estar envolvidos em processos como replicação de plasmídeos e expressão de genes específicos. Uma classe desses RNAs regulatórios são os snoRNAs (small nucleolar RNAs), por exemplo, que fazem parte da regulação transcricional do rRNA 6S de *Escherichia coli*. Além desta classe, alguns outros RNAs regulatórios também parecem atuar em bactérias, principalmente na regulação da tradução e degradação de mRNAs.

A regulação da tradução e expressão mediada por RNAs, ganhou uma certa notoriedade, principalmente pela semelhança entre os mecanismos presentes em procariotos e eucariotos. Uma das classes de RNAs reguladores bacterianos são chamados de sRNAs e suas funções estão relacionadas ao controle da tradução de genes específicos. Os sRNAs apresentam aproximadamente 80-110 nucleotídeos e são relativamente abundantes em algumas bactérias, uma vez que estudos de bioinformática identificaram mais de 100 sRNAs em *E. coli*, por exemplo. Os sRNAs atuam em genes que possuem sequências complementares a deles, isto é, formando um duplex de RNA sRNA:mRNA, e promovem a destruição do mRNA, inibição da tradução e, em alguns casos, estimulando a tradução. Uma das proteínas mais importantes neste processo é a proteína Hfq, responsável por auxiliar o pareamento entre o sRNA e mRNA, aumentando a estabilidade de ligação.

Um exemplo de sRNA controlando processos biológicos em bactérias, é o RNA RybB. Esse sRNA é amplamente estudado em *E. coli*, apresenta 81 nucleotídeos e pode regular muitos genes. A maioria dos genes alvo, isto é, complementares ao RNA RybB são codificadores de proteínas que armazenam ferro. Na *E. coli*, o ferro livre é necessário em diversas condições, mas pode ser tóxico se estiver em níveis aumentados. Quando o RybB é expresso, este pode se ligar nos genes que codificam as proteínas que armazenam ferro, induzindo sua degradação e, conseqüentemente, diminuindo o armazenamento de ferro na célula. Outros sRNAs também foram identificados principalmente associados com a regulação de genes que codificam produtos tóxicos a célula.

RNAs regulatórios também atuam como agentes de defesa de procaríotos, principalmente contra vírus e sequências extracromossômicas invasoras. Esses RNAs de “defesa” estão principalmente relacionados ao sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que é um ‘sistema imune adaptativo’ dos procaríotos. Neste sistema existem sequências repetidas e organizadas no genoma de várias bactérias que foram adquiridas de infecções prévias por vírus e plasmídeos invasores, como se fosse a impressão digital dessas moléculas exógenas. Esse sistema e sequências servem para que a bactéria reconheça essas moléculas invasoras facilmente, caso ocorra uma reinfecção, e consiga clivar a molécula utilizando uma ribonuclease associada que normalmente é uma proteína Cas. A atuação do sistema CRISPR depende da transcrição de um RNA simples e longo (crRNA) que é quebrado em sequências de RNA mais curtas. Esses RNAs curtos ficam ligados a proteínas Cas e direcionam essas proteínas a moléculas invasoras, como o genoma de um vírus. Esse processo é bastante complexo e aqui, foi descrito apenas um resumo simples da atuação de moléculas de RNAs na defesa dos procaríotos.

## **Regulação epigenética mediada por RNAs em eucariotos**

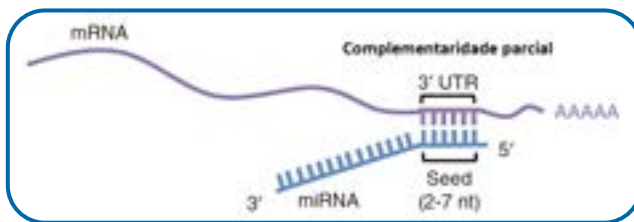
A regulação transcricional e traducional mediada por RNAs em eucariotos incluem diversas classes de RNAs longos e pequenos. Entre estes, existem os snRNA e snoRNAs, que já foram previamente discutidas neste capítulo, e os RNAs de interferência. Os RNAs de interferência funcionam normalmente diminuindo a expressão de um gene em diferentes mecanismos de silenciamento gênico que serão abordados posteriormente. Estes RNAs de interferências basicamente são (microRNAs), siRNAs (*small interfering RNA*), piRNAs (*Piwi-interacting RNA*) e lncRNA (*long non-coding RNA*).

### **MicroRNAs (miRNAs)**

Os miRNAs são RNAs de aproximadamente 22 nucleotídeos amplamente relacionados a regulação da expressão gênica e atuando principalmente no silenciamento de mRNAs. Grande parte do estudo de RNAs regulatórios foi conduzido na tentativa de conhecer a função dos miRNAs na regulação dos genes, por isto, estes são os RNAs de interferência

mais compreendidos quando comparados com as outras classes de RNAs de interferência. Estima-se que aproximadamente 1/3 dos genes em humanos são regulados por miRNAs. Existem aproximadamente 2000 miRNAs descritos, até o momento, e os estudos indicam que um mesmo miRNA pode reconhecer e regular a expressão de mais de 200 mRNAs alvos. A principal função atribuída aos miRNAs é a diminuição da expressão de um mRNA alvo, que é complementar a sua sequência, ou seja, o miRNA, fita única, se liga em regiões complementares de um mRNA alvo, também fita única, formando uma dupla-fita de RNA e induz a diminuição na sua expressão. Normalmente os miRNAs se ligam nas regiões 3'UTR (*untranslated region*) do mRNA, isto é, nas regiões não codificantes que ficam após o códon de parada de tradução e, como o próprio nome já diz, não são traduzidas. Estudos indicam que os miRNAs podem diminuir a expressão dos mRNAs por diferentes mecanismos, como por exemplo, induzindo a degradação do mRNA ou induzindo o bloqueio na tradução desse mRNA, impedindo assim, o fluxo de informação gênica (DNA → RNA → proteína).

Os miRNAs são moléculas bastante eficientes na regulação da expressão pois, após atuar na regulação de um mRNA alvo, o miRNA permanece intacto e está pronto para regular a expressão de outro mRNA. Outro fator marcante nesta regulação gênica é que a complementariedade entre o mRNA alvo e o miRNA não precisa ser perfeita para ocorrer, é comum que apenas uma parte dos nucleotídeos do miRNA se liguem com estabilidade ao mRNA alvo e ainda assim consigam regular sua expressão. Esta região de complementariedade é chamada de Região Seed ou Região semente (**Fig. 20**). Os detalhes relacionados a este processo serão abordadas no próximo capítulo.



**Fig. 20.** Ligação parcial do miRNA com um mRNA alvo através da região seed.

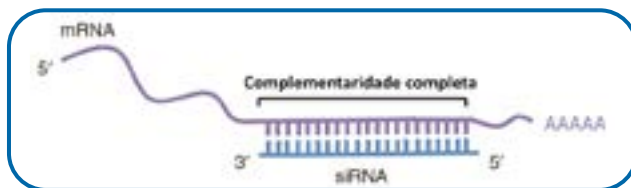
Fonte: Lam, et al. “siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing.” *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 4 (2015): e252.

## *Small interfering RNA (siRNAs)*

Os siRNA também são pequenos RNAs de interferência que atuam basicamente silenciando genes. Estas moléculas foram identificadas primeiramente em plantas, em *Caenorhabditis elegans* e, posteriormente, em mamíferos. Os siRNAs são muito parecidos estruturalmente com os miRNAs e apresentam propriedades físico-químicas também semelhantes, embora os mecanismos de ação, ou seja, a forma como estas moléculas regulam os genes sejam diferentes. A biogênese do siRNA é similar ao miRNA, onde ambos são transcritos em fragmentos grandes de RNA no núcleo, migram para o citoplasma como uma dupla-fita de RNA e são processados (clivados em fragmentos menores) por uma enzima chamada Dicer. Após um processamento inicial, o siRNA forma um complexo com outras proteínas (RISC e Ago) e tem sua fita complementar clivada, se tornando um siRNA maduro com aproximadamente 22 nucleotídeos em fita simples e pronto para regular a transcrição de um mRNA alvo.

Porém existem diferenças significativas entre os siRNAs e miRNAs, como o fato do siRNA possuir apenas um mRNA alvo, devido a necessidade de complementariedade total entre as sequências para a sua atuação, ou seja, aproximadamente 22 nucleotídeos do siRNA devem se ligar completamente para que o siRNA consiga regular o mRNA (**Fig. 21**). Após a ligação, os siRNAs funcionam principalmente promovendo a clivagem do mRNA através de enzimas endonucleotídicas (que clivam sequências de nucleotídeos).

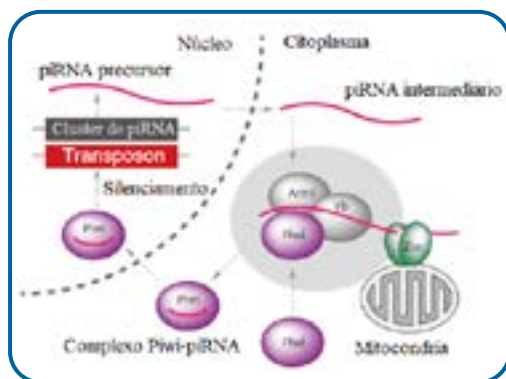
O fato do siRNA ter alvos tão específicos, ou seja, um único siRNA normalmente é capaz de afetar um único mRNA, atraiu atenção de muitos pesquisadores, pois eles podem regular genes específicos de muitas doenças genéticas sem comprometer o funcionamento de outros genes.



**Fig. 21.** Ligação completa do siRNA com um mRNA alvo para promover seu silenciamento.  
Fonte: Lam, et al. "siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing." *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 4 (2015): e252.

## *Piwi-interacting RNAs (piRNAs)*

Os piRNAs são pequenos RNAs (24-32 nucleotídeos), vinculados a um grupo de proteínas denominadas PIWI, e foram primeiramente identificados como um grupo de pequenos RNAs que auxiliam na proteção do genoma silenciando transposons. Os transposons são trechos do DNA capazes de se “mover” pelo genoma, isto é, estes genes têm a capacidade de induzir sua duplicação e inserção em outro trecho do genoma, o que pode provocar, inclusive, a perda de função de um gene ou uma nova mutação (Fig. 22).



**Fig. 22.** Mecanismo de ação de piRNAs sobre o silenciamento de transposons. Um piRNA é transcrito a partir de uma região do genoma chamada de Cluster de piRNA, processado para formação de uma molécula intermediária e se complexa com diversas proteínas que contirão seu processamento deixando o piRNA com aproximadamente 30 nucleotídeos. Este piRNA maduro, por sua vez, se complexa com proteínas Piwi e migram juntas para o núcleo onde promovem o silenciamento de transposons.

Fonte: [http://www.spring8.or.jp/en/news\\_publications/press\\_release/2012/121015/](http://www.spring8.or.jp/en/news_publications/press_release/2012/121015/)

O primeiro piRNA foi identificado em testículo de *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas) e já foram encontrados em diversos outros animais. Os piRNAs são principalmente relacionados a fertilidade, devido ao seu importante papel na espermatogênese, além de manter a integridade das células germinativas, promover o silenciamento de transposons e auxiliar na regulação da expressão de alguns genes necessários ao rearranjo cromossômico. Devido ao seu importante papel na linhagem germinativa, os piRNAs são predominantemente encontrados nas gônadas, no entanto, alguns piRNAs

também têm sido identificados em células somáticas humanas de forma tecido específica, isto é, apenas algumas poucas células apresentam a expressão desta classe de RNA. A expressão desregulada de piRNAs também tem sido alvo de estudos para muitas doenças, como câncer, onde foi verificado que alguns piRNAs podem estar atuando na proliferação, apoptose, invasão e migração de células cancerígenas.

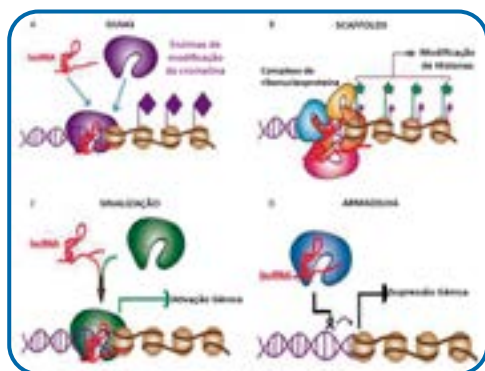
### *long non-coding RNA (lncRNAs)*

Os lncRNAs ou RNAs longos não codificantes possuem mais de 200 nucleotídeos. Diferente dos miRNAs, os lncRNAs são menos compreendidos embora a desregulação de uma parte dos lncRNAs descobertos tenha sido associada a doenças humanas como câncer. Muitas vezes os pesquisadores se deparam com alguns desafios no estudo dessa classe de RNA, como o fato de que muitos deles são pouco expressos e mal conservados na sequência do DNA. A conservação da sequência do DNA, ou seja, a sequência do DNA que codifica o lncRNA ser igual ou parecida em diferentes espécies e grupos zoológicos, é importante para que a função do lncRNA específico seja conhecida, uma vez que a identificação da função da molécula normalmente é feita utilizando organismos modelos como *Caenorhabditis elegans* (nematóide), *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas) e *Mus musculus* (camundongo). Se a sequência do lncRNA muda entre os animais, fica mais difícil de descobrir a real função dele, já que normalmente se há uma mudança na sequência, há também uma mudança na função.

A maioria dos genes de lncRNAs está localizada aproximadamente a uma distância de 10 mil bases de genes que codificam proteínas e, outros ainda estão localizados em regiões de íntrons ou na fita anti-sense de codificação, isto é, um mRNA é transcrito em uma fita (*fita sense*) e a outra fita complementar (*anti-sense*) contém o gene de um lncRNA. Estas moléculas podem ser encontradas em tipos celulares específicos como neurônios, hepatócitos e macrófagos.

A principal função associada aos lncRNAs é que eles servem de sinal molecular para regulação da transcrição em resposta a determinados estímulos, ou seja, é transcrito apenas em condições específicas. Os lncRNAs funcionam se ligando e “sequestrando” complexos modificadores de histonas, proteínas

que se ligam ao DNA, como fatores de transcrição, e até mesmo a RNA polimerase, que é a enzima responsável por catalisar a reação de transcrição (**Fig. 23**). Os lncRNAs também podem “sequestrar” outras enzimas catalíticas ou subunidades de complexos enzimáticos necessários a transcrição. Além disso, alguns estudos sugerem que até a transcrição do lncRNA atua como um regulador da transcrição do gene, devido a sua proximidade (aproximadamente 10 mil nucleotídeos de distância) com alguns genes que codificam proteínas. Outra função em que os lncRNAs podem regular a transcrição de um gene é através da interação com DNA metiltransferases (DNMTs), promovendo o recrutamento ou inibição destas enzimas e alteração do nível de metilação do DNA, processo este que afeta a transcrição do gene e foi abordado nos capítulos anteriores. Os lncRNAs também podem atuar nos complexos remodeladores da cromatina, contribuindo para um gene se tornar acessível ou não à maquinaria de transcrição. Os lncRNAs também podem atuar na indução da transcrição gênica servindo como guia para que complexos enzimáticos, que vão ajudar na transcrição, cheguem no local do gene específico.



**Fig. 23.** Principais mecanismos de regulação transcricional mediada por lncRNAs. a) O lncRNA atua como guia e recruta enzimas modificadoras da cromatina (histonas metilases, acetilases e outras) e pode induzir ou reprimir a transcrição; b) O lncRNA atua no Scaffold, ou esqueleto da cromatina, interagindo com fatores de ligação ao RNA (complexo ribonucleoproteico) que podem recrutar proteínas de transcrição (induzindo a expressão) ou repressores gênicos (reprimindo a transcrição); c) O lncRNA pode sinalizar para a maquinaria de transcrição o gene que deve ser transcrito; d) O lncRNA pode atuar como uma armadilha se ligando e “sequestrando” os fatores de transcrição, promovendo a repressão gênica.

Fonte: Bhat, et al. “Long non-coding RNAs: mechanism of action and functional utility.”

Non-coding RNA research 1.1 (2016): 43-50.



O **quadro 1** resume as classes de RNAs não codificantes, o tamanho aproximado destes e os organismos onde ocorrem:

<b>RNA não codificante</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Organismo</b>
RNA ribossomal (rRNA)	120 ~ 4700 nt	Todos
RNA transportado (tRNA)	70~100 nt	Todos
<i>Small nuclear</i> RNA (snRNA)	70 ~ 350 nt	Eucariotos
<i>Small nucleolar</i> RNA (snoRNA)	70 ~300 nt	Eucariotos e archaea
Micro-RNA (miRNA)	19 ~22 nt	Eucariotos
<i>Small interference</i> RNA (siRNA)	21~25 nt	Eucariotos
<i>Piwi-interacting</i> RNA (piRNA)	24~32 nt	Eucariotos
<i>Long non-coding</i> RNA (lncRNA)	> 200 nt	Eucariotos

**Quadro 1.** Resumo dos RNAs não codificantes e suas características.

Fonte: <https://www.mblbio.com/bio/g/product/epigenetics/RNAworld.html>.

A maior parte destas moléculas regulatórias foi descoberta e ganhou notoriedade após os anos 2000, desde então, crescentes avanços têm sido feitos para compreender melhor a função delas nos fenômenos fisiológicos normais e alterados. Alguns destes RNAs regulatórios são amplamente estudados em diversas patologias humanas como câncer, doenças cardíacas, neurológicas e autoimunes. Nestes estudos, destacam-se os miRNAs e siRNAs que têm sido bem estudados e compreendidos em diversas patologias e, inclusive, alguns ensaios clínicos, com o objetivo de utilizá-los no tratamento de diversas doenças, têm sido feitos e mostram resultados promissores. Sendo assim, dedicaremos o próximo capítulo para aprofundar o conhecimento sobre a biogênese e mecanismos de ação destas duas classes de RNA.

## RNAS DE INTERFERÊNCIA: MIRNAS E SIRNAS

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Como já foi discutido nos capítulos anteriores, grande parte da regulação do processo transcricional e traducional é mediada por proteínas reguladoras, principalmente fatores transcricionais e outras proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA. No entanto, moléculas de RNA também são essenciais e participam ativamente deste processo de regulação. Esta regulação transcricional e traducional ocorre em todos os organismos vivos, procariotos e eucariotos. Os procariotos apresentam pequenos RNAs regulatórios que foram abordados no capítulo anterior, no entanto, grande parte dos estudos está direcionada a eucariotos, principalmente no que compete aos RNAs de Interferência. Nas últimas duas décadas houve um salto significativo no conhecimento acerca de RNAs de interferência, onde os principais deles são os microRNAs (miRNAs) e *Small interference RNAs* (siRNAs).

Os miRNAs e siRNAs são pequenos RNAs de interferência que têm atraído atenção porque atuam na regulação da expressão de genes que normalmente se encontram desregulados em muitas patologias. Por isso, estes são alvos prováveis para descoberta e desenvolvimento de novas drogas e podem ser usados como uma ferramenta para manipular a expressão gênica em diferentes organismos.

### Histórico

Os **miRNAs** são RNAs de tamanho que varia, em média, entre 19 e 22 nucleotídeos e foram descobertos em 1993 por Victor Ambros. No ano de 1998, Andrew Fire e Craig Mello publicaram um estudo sobre a atuação de miRNAs na regulação da expressão gênica em um organismo modelo de estudo: *Caenorhabditis elegans*, que lhes conferiu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina do ano de 2006. No entanto, a relevância dos miRNAs na regulação da expressão gênica só foi evidenciada em meados dos anos 2000, a partir da descoberta de dois miRNAs específicos: Let-7 e Lin-4 e o impacto biológico provocado por eles. O miRNA Let-7 foi associado a repressão do mRNA

lin-14, enquanto que o miRNA lin-4 foi associado a repressão do mRNA lin-41. Ambos pareciam estar envolvidos no desenvolvimento do *C. elegans*.

Os siRNAs são pequenos RNAs que variam em comprimento de 21 a 25 nucleotídeos e são capazes de silenciar genes. O siRNA foi descoberto em plantas no ano de 1999, por David Baulcombe e Andrew Hamilton, em um experimento de indução de silenciamento gênico mediada por vírus. Pouco tempo depois, estudos funcionais comprovaram a ação de siRNA sintéticos na degradação de transcritos genômicos específicos em mamíferos e os estudos começaram a ganhar notoriedade na comunidade científica. Historicamente, os siRNAs foram identificados apenas como moléculas exógenas, artificiais ou não, capazes de gerar o silenciamento gene-específico, no entanto, no ano de 2008 foram identificados os siRNAs endógenos.

Os miRNAs ficaram conhecidos como reguladores endógenos, ou seja, controlando o funcionamento celular e participando ativamente de processos básicos da célula. Enquanto que os siRNAs são reconhecidos como defensores da integridade ao genoma e capazes de responder a ácidos nucleicos invasores, como vírus que se integram ao DNA, transposons e transgenes. A biogênese e mecanismo de ação de ambas as classes de RNA serão discutidas a seguir.

## Biogênese

Uma das primeiras diferenças entre os miRNAs e siRNAs se refere a sua biogênese. Os miRNAs podem ser gerados a partir de genes de miRNAs ou regiões de éxons e íntrons liberadas no processamento de mRNAs, enquanto os siRNAs são gerados a partir de precursores de RNAs dupla-fita e podem ser gerados pela célula ou artificialmente, isto é, *in vitro*.

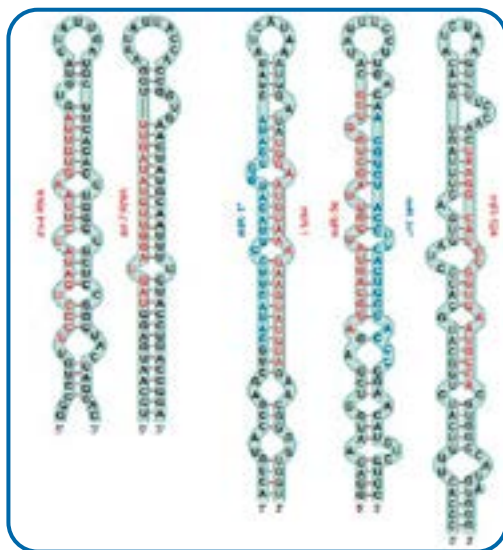
Os miRNAs podem ser codificados por genes específicos, que se localizam em regiões intragênicas, ou seja, dentro de genes como em regiões intrônicas ou em regiões codificadoras, ou regiões intergênicas, ou seja, possuindo genes próprios e utilizando uma maquinaria de transcrição própria. Estas especificidades nos locais do genoma onde o miRNA poderá ser transcrito constituem as vias canônicas e não-canônicas de biogênese do miRNA.

A **via canônica de biogênese do miRNA** ocorre quando os miRNAs estão localizados em genes próprios e são transcritos pela RNA polimerase II. Os miRNAs são codificados como transcritos longos com uma estrutura

bastante específica denominada de miRNA primário (**pri-miRNA**) que apresenta diversas estruturas secundárias, se dobra sobre si mesmo e forma ‘grampos’ com uma haste em formato de alça (**Fig. 24**). A primeira forma de processamento do miRNA é a clivagem dessa haste para que o pri-miRNA forme um RNA fita dupla, denominado de **pré-miRNA** que possui entre 65 e 70 nucleotídeos. O complexo de endonucleases formado por Drosha-DGCR8 atuam para realizar este processamento.

No caso da **via não canônica de biogênese do miRNA**, ocorre normalmente a síntese de um mRNA comum e algumas sequências, como íntrons, são liberadas através do seu processamento. As estruturas liberadas, muitas vezes, apresentam sequências de RNA com grampo e haste-alça muito similares aos pré-miRNAs e podem dar origem a miRNAs maduros e funcionais. Quando os miRNAs são originários de regiões intrônicas são denominados mirtrons.

Em ambas as vias (canônica e não-canônica) de biogênese do miRNA ocorre a formação do **pré-miRNA**, que será transportado para o citoplasma através da exportina 5 e será novamente processado por outro complexo



**Fig. 24.** Transcritos de pré-miRNAs identificados em *Caenorhabditis elegans*, antes da clivagem enzimática, mostrando a estrutura em grampo que contém, em vermelho e azul, os miRNAs funcionais.

Fonte: Watson, James D. et al. Biologia molecular do gene. Artmed Editora, 2015.

proteico, composto pelas proteínas Dicer-TRBP. Esse segundo processamento cliva as estruturas em grampo (alça) que estão adjacentes a estrutura do miRNA e gera um miRNA dupla-fita contendo o miRNA funcional e sua fita complementar, que será degradada posteriormente. Como é possível ver na **Fig. 25**, muitas vezes, ambas as fitas são capazes de gerar miRNAs maduros que vão regular genes diferentes. Todas as etapas do processo de biogênese de miRNA é regulada minuciosamente.

As diferenças apresentadas entre o siRNA e miRNA, está no fato de que o RNA precursor do siRNA é um RNA dupla fita longo que pode ser proveniente de várias fontes, como genoma viral, dupla-fita de RNA derivado de transposons, quebras do DNA e pri-miRNAs (miRNAs primários), ou seja, moléculas de RNA dupla-fita presentes no citoplasma. Os siRNAs ficaram conhecidos como moléculas de defesa contra ácidos nucleicos invasores, justamente porque muitas vezes são originados a partir destas moléculas e atuam contra elas. O RNA dupla-fita é reconhecido pelo domínio de ligação a RNA da enzima Dicer (a mesma enzima atuante no processamento do miRNA), que é responsável por gerar um RNA de 21 a 28 nucleotídeos em uma única etapa de processamento. O RNA dupla-fita pré-processado é unido a outras proteínas que tem a função de degradar a fita complementar, tornando o siRNA uma molécula madura, e farão a atividade catalítica no silenciamento mediado por siRNA. Um resumo da biogênese de siRNA está na **Fig. 25**.



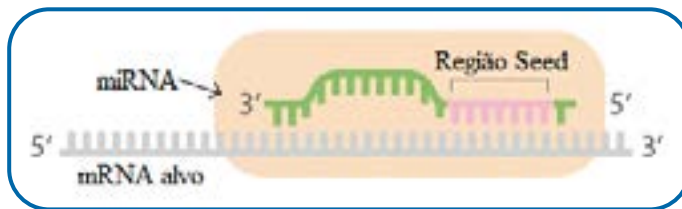
**Fig. 25.** Resumo da biogênese e mecanismo de ação de miRNAs e siRNAs.

Fonte: Mak, J. "RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity." *Retrovirology* 2.1 (2005): 35.

## Mecanismos de Ação

Uma das principais diferenças entre miRNAs e siRNAs é a forma como eles atuam em seus alvos. Os miRNAs são considerados **reguladores trans**, pois são codificados por um gene e atuam sobre outros genes, tendo inclusive diversos alvos. Os siRNAs são considerados **reguladores cis**, pois normalmente são gerados como produto de um gene transcrito e atuam na regulação destes mesmos genes, necessitando inclusive de uma alta complementariedade entre o siRNA e mRNA alvo, o que garante sua especificidade. O impacto biológico dos miRNAs e siRNAs, obviamente, também tem relação com essas particularidades na regulação.

O pareamento entre o miRNA e o RNA alvo, comumente, é parcial e ocorre principalmente em um local denominado de **região seed**, ou resíduos-semente. Essas regiões de alta complementariedade entre miRNA e mRNA envolvem de 6 a 7 nucleotídeos e estão presentes entre as bases 2 e 9 do miRNA. A região seed é decisiva para a especificidade do mRNA alvo e é por causa desta região que um mesmo miRNA pode regular diferentes alvos. Além disso, a partir desta região, os pesquisadores conseguem prever possíveis alvos dos miRNAs e fazem análises experimentais para comprovar essa regulação (**Fig. 26**).



**Fig. 26.** Heteroduplex de miRNA e mRNA alvo indicando o pareamento da região seed.

Fonte: disponível em: [https://old.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/miRNA\\_Introduction.php](https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/miRNA_Introduction.php).

Independente da forma como esses pequenos RNAs foram formados, os mecanismos pelos quais ocorre a regulação do gene dependem de um complexo denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). Este complexo contém muitas proteínas e, entre elas, proteínas da família Argonauta (AGO), que é o componente central desse complexo. O complexo ligado ao miRNAs é conhecido como **miRISC** e o complexo ligado ao siRNAs

é denominado de **siRISC**. Em ambos os casos, o miRNA ou siRNA, em suas formas maduras, apresentam uma única fita de RNA. Esses pequenos RNAs vão atuar como guias para direcionar o complexo RISC a alvos específicos e complementares, formando um heteroduplex de RNA fita dupla (miRNA:mRNA alvo ou siRNA:mRNA alvo). A ligação estável entre os pequenos RNAs e o mRNA alvo torna possível a regulação que ocorre nos chamados **Corpúsculos de processamento** (Corpo P) no citoplasma.

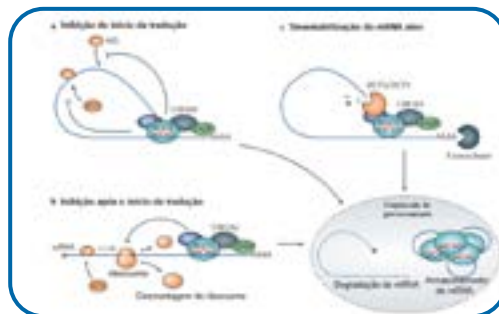
Existem alguns mecanismos pelos quais os pequenos RNAs induzem o silenciamento gênico. O primeiro deles é induzindo a degradação do mRNA ou *slicing* (termo que se refere ao fatiamento do RNA). Normalmente para que ocorra a degradação do alvo, há a necessidade da alta complementariedade entre o pequeno RNA e o alvo. Esta alta complementariedade é encontrada em siRNAs, então normalmente este é o mecanismo de ação desta classe de RNA, embora miRNAs que possuem uma alta complementariedade principalmente na região seed, também podem induzir a degradação do mRNA. Quando há ligação do pequeno RNA com o mRNA alvo, o complexo que contém a AGO e uma outra endonuclease potente, a GW182, promove uma clivagem inicial do mRNA na posição do CAP 5' (base modificada no início do mRNA) e cauda poli-A (extensão de adeninas no final do mRNA). Essa clivagem causa a desestabilização do mRNA e outras proteínas fazem uma ubiquitinação dessa molécula que levam a sua degradação. Existem várias proteínas da família Argonauta presentes em diversos organismos e, nem todas elas conseguem clivar o RNA. Neste caso, outros mecanismos de silenciamento gênico são utilizados.

No segundo mecanismo, os pequenos RNAs podem inibir a tradução do mRNA. Os miRNAs normalmente não precisam de uma complementariedade tão grande com o mRNA alvo e é frequente ocorrer um mau pareamento de bases, embora este ainda consiga se ligar de maneira estável. Nos casos onde a complementariedade não é completa, o que ocorre, em grande parte das vezes nos miRNAs, é a inibição da tradução em vez da clivagem do mRNA. A inibição da tradução pode ser feita por duas formas, o complexo de silenciamento impede a montagem do ribossomo ou induz a desmontagem dele. A atuação do complexo miRISC no início da montagem do ribossomo ocorre porque o miRNA ao se ligar, impede o reconhecimento de fatores de iniciação da tradução, como eIF4F (necessário na montagem do complexo ribossômico 80S) e, conseqüentemente, as subunidades do ribossomo não são

montadas. Caso as subunidades já tenham sido montadas e a tradução esteja ocorrendo, o complexo miRISC pode inibir o alongamento da tradução, facilitando também a degradação dos peptídeos recém-sintetizados e induzindo a desmontagem das subunidades do ribossomo.

Interessantemente, os pequenos RNAs não atuam apenas na inibição pós-transcricional (**Fig. 27**). Pesquisas indicam que o RISC também pode se dirigir para o núcleo e, ligado ao seu 'guia' que é o pequeno RNA, pode se ligar a regiões específicas no DNA e recrutar proteínas que promovem modificações da cromatina em torno de promotores gênicos ou reguladores transcricionais. Neste caso, tanto o RISC quanto o pequeno RNA envolvido, farão um silenciamento transcricional. Esse processo ocorre, por exemplo, em *Schizosaccharomyces pombe*, onde um siRNA atua no silenciamento de regiões centromérica. Curiosamente, em outra levedura bastante estudada, a *Saccharomyces cerevisiae*, não foram identificadas proteínas e outras moléculas relacionadas a regulação mediada por RNAs de interferência.

Os miRNAs também foram relacionados com outras funções peculiares, como a ativação traducional. Esse mecanismo não está muito claro até o momento, mas sabe-se que outras proteínas podem estar no complexo RISC, como a FXR1, e ativar a tradução do mRNA em contextos celulares específicos. Esse processo já foi verificado em células gaméticas (oócitos) e em células que foram submetidas a algum tipo de estresse, mas ainda não se sabe como ou por que esse processo ocorre.



**Fig. 27.** Mecanismo de silenciamento pós-traducional de pequenos RNAs. miRNAs podem atuar direcionando os mecanismos, enquanto que o siRNA promove a desestabilização e clivagem do mRNA alvo.

Fonte: Ha and Kim. "Regulation of microRNA biogenesis." *Nature reviews Molecular cell biology* 15.8 (2014): 509-524.



Outro fato interessante a ser comentado, é que pequenas quantidades dos RNAs de interferência conseguem induzir uma inibição bastante significativa nos mRNAs alvo, isto porque após a degradação ou inibição de um mRNA, o complexo não é degradado e está pronto para promover a regulação em outro alvo.

## Impacto de pequenos RNAs nos processos biológicos

Neste capítulo e no capítulo anterior foram mencionados alguns exemplos de como pequenos RNAs participam de processos importantes para a célula. Processos estes, que vão desde o controle do desenvolvimento em *C. elegans*, até o controle da inflamação em mamíferos. Alguns exemplos de RNAs de interferência em diferentes organismos serão vistos a seguir.

Em leveduras como *Schizosaccharomyces pombe*, foram feitos experimentos que comprovaram que a perda da via de RNAs de interferência não promova a morte das células, embora ocorra um significativo problema de crescimento destas. Os experimentos que geraram a perda dessa via nesses organismos, produziram perturbações na segregação cromossômica, perda de silenciamento gênico nos centrômeros e uma desregulação do padrão de metilação de histonas, indicando que RNAs regulatórios são importantes para manutenção de todos esses processos. Além disso, da mesma forma que ocorre em bactérias (sistema CRISPR-Cas), nas leveduras os RNAs de interferência atuam como mecanismos de defesa contra vírus e transposons mediante os piRNAs (discutidos no capítulo anterior).

Em plantas, os RNAs de interferência também são importantes no controle de transposons e infecções virais, além de regular alguns genes relacionados à coloração, produção de fitohormônios, crescimento e outras características. Estudos mostraram que plantas com mutações nos genes da Argonata ou Dicer não conseguem conter infecções virais e a replicação viral é consideravelmente maior. Em contrapartida temos, por exemplo, mecanismos virais que atuam diminuindo a estabilidade de alguns siRNAs em plantas, como é o caso do HcPro do vírus Y da batata que reduz a produção e estabilidade de alguns siRNAs e conseguem se espalhar pela planta. Os pequenos RNAs (siRNAs e miRNAs) têm sido utilizados pela indústria para melhorar as características de plantas de interesse econômico, como por

exemplo, aumentar o rendimento e produtividade da espécie, rendimento dos grãos e até mesmo o prazo de validade de frutas e verduras.

No que se refere ao reino animal, foi verificada que a perda da via de RNAs de interferência, incluindo os próprios RNAs e proteínas que participam do processo, é letal, inclusive em organismos menos complexos, como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, bem como em outros organismos estudados. Um clássico exemplo em *C. elegans* é a atuação do lin-4 regulando a atividade do lin-14 e influenciando o desenvolvimento do verme. Além disso, alguns pesquisadores também sugerem que os RNAs de interferência podem ser importantes no silenciamento da heterocromatina em vários organismos, incluindo moscas e plantas.

Em seres humanos, os RNAs de interferência atuam de diversas formas. Assim como em todos os organismos mencionados acima, RNAs de interferência, principalmente siRNAs, atuam na defesa da célula contra transposons e protegendo a célula contra infecções. Estima-se que 45% do genoma humano, seja composto por sequências que foram transposons em algum momento, e estes, precisam ser silenciados e mantidos como heterocromatina para evitar danos ao genoma da célula. Os piRNAs, como mencionado no capítulo anterior, também são excepcionalmente importantes nesse silenciamento de transposons em células germinativas. Os miRNAs, são amplamente estudados em diversas patologias humanas, como câncer, doenças cardíacas, metabólicas, neurológicas e autoimunes. Devido a característica do miRNA de reconhecer e regular diversos genes que atuam em diferentes vias, qualquer desregulação nestes, pode desencadear um problema grave para o organismo. Assim, essas moléculas desreguladas têm sido identificadas e estudadas como possíveis biomarcadores para as doenças. Da mesma forma, a manipulação da expressão gênica mediada por siRNAs e miRNAs também tem sido abordada em estudos biotecnológicos e mostram resultados promissores, indicando que podem, muito em breve, ser usadas pela medicina personalizada como possíveis fontes de novas terapias para diversas doenças complexas.

## EPIGENÉTICA NAS DOENÇAS HUMANAS

Maria de Mascena Diniz Maia e  
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

### Doenças complexas

Como já foi visto anteriormente, diversos fatores epigenéticos podem modular a regulação de genes de maneira extremamente coordenada em todas as células e tecidos de um organismo. Diversos fatores intrínsecos, como o genoma, e extrínsecos, como o ambiente, podem modular a regulação epigenética. Consequentemente, se estes mesmos fatores se encontram desregulados, podem desencadear uma série de consequências no organismo e levar a patologias.

As doenças humanas podem ser divididas basicamente em doenças monogênicas, isto é, causadas por um único gene, e doenças complexas. Grande parte das doenças humanas é considerada **complexa**, isto é, apresentam múltiplas causas e existem muitos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais envolvidos. Quanto maior a complexidade da doença, mais fatores ambientais influenciam o desfecho, e mais fatores epigenéticos podem ser relacionados. Entre as muitas doenças complexas, os fatores epigenéticos têm sido amplamente relacionados com doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus, doença de Chron e outras; distúrbios neurológicos, como Parkinson, esquizofrenia, Alzheimer; doenças cardíacas, como infarto do miocárdio e aterosclerose; e diversos tipos de câncer, como leucemias, mama, pulmão, próstata e outros.

Nas doenças autoimunes há diversos fatores epigenéticos associados. No lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo, foram previamente identificados níveis diminuídos de metilação em linfócitos T e genes importantes para resposta imunológica como CD70, CD11a e PRF1. Em relação às modificações de histonas, foram identificadas modificações como redução da trimetilação da H3K9 e níveis desregulados de histonas metilases. Os miRNAs, como miR-146, miR-125a e miR-155 também apresentam níveis de expressão anormais. No diabetes tipo II também já foram identificados padrões de

metilação diferencial de genes como Tnfaip812 e AKT2 que são importantes em vias de sinalização de inflamação, metabolismo e receptor da insulina.

Nas doenças neurológicas, os padrões aberrantes de metilação de determinados genes, as modificações de histonas e expressão desregulada de miRNAs parecem ser relevantes. Um dos principais genes que apresenta um padrão desregulado em muitas doenças é o MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*), que é essencial para o bom funcionamento de células nervosas. A hipermetilação deste gene, ou seja, o aumento do padrão de citosinas metiladas, foi associada a patologias como Alzheimer, esquizofrenia, doença de Rett e até mesmo gliomas. Padrões de modificação de histonas aberrantes também têm sido encontradas em desordens neurológicas, como é o caso de histonas acetiladas e fosforiladas na doença de Huntington, histonas metiladas na esquizofrenia e histonas acetiladas e fosforiladas no Alzheimer. Alguns miRNAs também se encontram desregulados em diversas patologias como esquizofrenia, que apresenta desregulação do miR-219, miR-132 e miR-107, Alzheimer que apresenta desregulação do miR-34a ou epilepsia que apresenta expressões aberrantes de miRNAs como miR-139-5p, miR-124, miR-219, miR-204 e outros.

O conhecimento em todas essas áreas tem sido constantemente ampliado, no entanto, a maior parte dos estudos é direcionada na tentativa de compreender o papel desses fatores epigenéticos nos diversos tipos de câncer. Assim, nós optamos por esclarecer com mais detalhes os principais fatores epigenéticos relacionados a doenças tumorais.

## Câncer

O câncer é considerado uma doença genômica que afeta a população mundial e também que mais mata no mundo. Surge como resultado de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais que sofrem modificações até se transformar em células cancerosas.

Como resultado de mudanças genéticas, o câncer apresenta características como: independência de sinais de crescimento externo, insensibilidade a sinais externos anticrescimento, capacidade para evitar a apoptose; capacidade de replicar indefinidamente; predispõe a massa dessas

células a desencadear angiogênese e ainda, tem a habilidade de invadir tecidos e estabelecer tumores secundários.

Acredita-se que a carcinogênese é um processo complexo que envolve um número imenso de fatores desde mutações no genoma herdado dos pais, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo que os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA.

Os proto-oncogenes codificam componentes relevantes no controle do crescimento normal e diferenciação celular, porém, podem ser ativados a oncogenes (que são genes dominantes no nível celular) por mutação de ponto, translocação cromossômica ou amplificação gênica que contribui para o descontrole da divisão celular que é característico de câncer. Além desses genes, existe outro grupo de genes de atuação antagonica, cujos produtos inibem o crescimento celular, são os chamados genes supressores tumorais (genes recessivos no nível celular), que também podem ser inativados por mecanismos de substituição de base, deleção, não disjunção cromossômica, recombinação mitótica e outros. Assim, sua função pode ser perdida ou alterada, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento do câncer. A perda das proteínas supressoras desregula o crescimento celular, levando a formação de tumores.

Em relação aos genes de reparo do DNA, podemos dizer que os sistemas de reparo de DNA são fundamentais para a manutenção da integridade do genoma. Portanto, pode-se esperar que a desregulação dos genes de reparo, esteja associada a efeitos relevantes prejudiciais à saúde, que podem incluir defeitos congênitos, aumento do risco de tumores cancerígenos, como carcinomas (tecido epitelial), sarcomas (tecido conjuntivo), linfomas (tecido linfático), gliomas (células gliais do sistema nervoso central) e leucemias (hematopoiéticas), e taxa acelerada de envelhecimento. Embora as ideias originais sobre o reparo do DNA e os genes responsáveis tenham sido amplamente derivados de estudos com bactérias e leveduras, mais de 125 genes diretamente envolvidos no reparo do DNA já foram identificados em seres humanos e sua sequência de cDNA também já foi estabelecida. Esses genes funcionam em um conjunto diversificado de vias bioquímicas que envolvem o reconhecimento e remoção

de lesões de DNA, tolerância a danos no DNA e proteção contra erros de incorporação cometidos durante a replicação ou reparo da molécula do DNA.

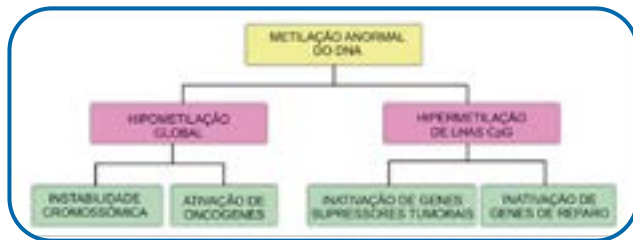
A iniciação e evolução do câncer, sempre vista como uma doença genética, é agora percebida como envolvendo anormalidades epigenéticas junto com alterações genéticas. Estudos no campo da epigenética do câncer, em rápida evolução, mostraram reprogramação extensiva de todos os componentes da maquinaria epigenética, incluindo metilação do DNA, modificações de histonas, posicionamento de nucleossomos e RNAs não codificantes, principalmente expressão de microRNA.

Antes de avançar para o entendimento da relação dos mecanismos epigenéticos com o desenvolvimento do câncer, faz-se necessário lembrar que os mecanismos epigenéticos, incluindo metilação do DNA, modificações covalentes de histonas (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, ribosilação e outros), posicionamento de nucleossomos e miRNAs são essenciais para o desenvolvimento normal dos mamíferos e para a regulação da expressão gênica. Essas modificações epigenéticas exibem propriedades únicas e padrões de distribuição em diferentes células de mamíferos. Os distintos padrões combinatórios dessas modificações, denominados epigenoma, são determinantes-chave do destino celular e da atividade gênica. Por outro lado, o epigenoma do tecido diferenciado exibe uma estrutura relativamente restrita que é mantida de forma estável através de múltiplas divisões celulares. Entretanto, o desenvolvimento das pesquisas no campo da epigenética mostraram que as células cancerígenas humanas abrigam anormalidades epigenéticas globais, além de numerosas alterações genéticas que interagem em todas as etapas da evolução do câncer, atuando juntas para promover a progressão dessa patologia. A origem genética do câncer é amplamente aceita, no entanto, estudos recentes sugerem que alterações epigenéticas podem ser os principais eventos iniciantes em algumas formas de câncer. Esses achados levaram a uma iniciativa global para entender o papel da epigenética na iniciação e propagação do câncer. Tendo em vista que as aberrações epigenéticas, diferentemente das mutações genéticas, são potencialmente reversíveis e podem ser restauradas ao seu estado normal, um campo promissor da terapia epigenética já está prosperando com aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) de drogas epigenéticas para o tratamento do câncer.

## Epigenética e câncer

A estrutura da cromatina determina o estado em que a informação genética na forma de DNA é organizada dentro de uma célula. Essa organização do genoma em uma estrutura compacta exata influencia bastante a ativação ou silenciamento dos genes. A epigenética, que inicialmente foi definida por C.H. Waddington como “as interações causais entre genes e seus produtos, que dirigem o fenótipo à existência”, envolve a compreensão da estrutura da cromatina e seu impacto na função do gene. A definição de Waddington, a princípio, se referia ao papel da epigenética no desenvolvimento embrionário; no entanto, a definição de epigenética evoluiu ao longo do tempo, tendo em vista que está implicada em uma ampla variedade de processos biológicos. Assim, a definição mais recente de epigenética é “o estudo de alterações hereditárias na expressão gênica que ocorrem independentemente das alterações na sequência primária de DNA”. A maioria dessa mudança herdável é estabelecida durante o processo de diferenciação e se mantém de forma estável por vários ciclos de divisão celular, permitindo dessa forma, que as células tenham identidades distintas enquanto contêm a mesma informação genética. Essa herdabilidade dos padrões de expressão gênica é mediada por modificações e mecanismos epigenéticos já descritos. O complemento dessas modificações, coletivamente chamado epigenoma, fornece um mecanismo para a diversidade celular, regulando quais informações genéticas podem ser acessadas por máquinas celulares. Dessa forma, podemos prever que falhas na manutenção adequada das marcas epigenéticas hereditárias podem resultar na ativação ou inibição inadequada de várias vias de sinalização e levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer.

O início e a progressão do câncer são acompanhados por profundas alterações na metilação do DNA, que foram as primeiras alterações epigenéticas identificadas no câncer. Um epigenoma do câncer é marcado por hipometilação em todo o genoma e por hipermetilação do promotor da ilha CpG específica do local (**Fig. 28**). Embora os mecanismos subjacentes que iniciam essas mudanças globais ainda estejam sendo investigados, vários estudos têm mostrado que algumas mudanças ocorrem muito cedo no desenvolvimento do câncer e podem contribuir para o seu início.



**Fig. 28.** Metilação de DNA e câncer.

Fonte :<https://slideplayer.com.br/slide/286882/>

A hipometilação global do DNA tem um papel preponderante na tumorigênese e ocorre em várias sequências genômicas, incluindo elementos repetitivos, retrotransposons, promotores deficientes em CpG, íntrons e desertos genéticos também conhecidos como “DNA-lixo”. A hipometilação do DNA em sequências repetidas leva ao aumento da instabilidade genômica, promovendo rearranjos cromossômicos. Também tem sido comprovado que a hipometilação dos retrotransposons pode resultar em sua ativação e translocação para outras regiões genômicas, aumentando assim a instabilidade dessas regiões. A indução da instabilidade genômica por hipometilação é exemplificada em pacientes com síndrome da imunodeficiência, instabilidade da região centromérica e anomalias faciais, que apresentam uma mutação na linha germinativa na enzima DNMT3b (DNA metiltransferase 3b), resultando em hipometilação e subsequente instabilidade cromossômica. Perda semelhante de metilação do DNA e instabilidade genômica está implicada em uma variedade de cânceres humanos. Além disso, a hipometilação do DNA pode levar à ativação de genes promotores de crescimento, como R-Ras e MAPSIN no câncer gástrico, S-100 no câncer de cólon e MAGE (antígeno associado ao melanoma) no melanoma. Assim, a hipometilação do DNA leva à ativação aberrante de genes e regiões não codificantes por meio de uma variedade de mecanismos que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer.

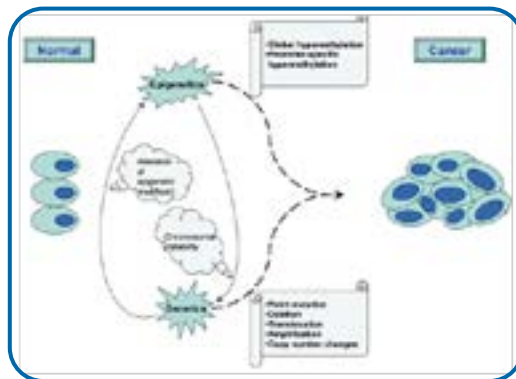
Apesar de saber que a capacidade da hipermetilação do DNA para silenciar os genes supressores de tumores no câncer esteja bem estabelecida, ainda não está bem esclarecido como os genes são direcionados para essa metilação aberrante do DNA. Uma possibilidade é que o silenciamento de genes específicos por hipermetilação forneça uma vantagem de crescimento às células, resultando em sua seleção e proliferação clonal. A metilação da ilha



CpG específica do tumor pode ocorrer através de um mecanismo instrutivo específico da sequência, pelo qual DNMTs são direcionados a genes específicos por sua associação com fatores de transcrição oncogênicos. A hipermetilação aberrante e o silenciamento de promotores de genes-alvo específicos pela proteína de fusão PML-RAR, na leucemia promielocítica aguda, é um exemplo desse mecanismo. Grandes extensões de DNA podem tornar-se anormalmente metiladas no câncer, fazendo com que algumas ilhas CpG sejam hipermetiladas como resultado de sua localização nessas regiões genômicas que foram submetidas a reprogramação epigenética em larga escala.

Assim, podemos concluir que a metilação anormal ou aberrante do DNA pode levar a uma variedade de cânceres por alterar a expressão de genes críticos por dois padrões de metilação: hipometilação generalizada do genoma e hipermetilação em áreas localizadas dentro da região promotora de genes nas ilhas CpG. Consequentemente, a hipermetilação destas ilhas levam ao silenciamento de genes supressores de tumor e de genes de reparo do DNA enquanto que a hipometilação global leva a instabilidade cromossômica e a ativação de oncogenes.

As células cancerígenas têm aberrações em todo o genoma no nível epigenético, incluindo hipometilação global, hipermetilação específica do promotor, desacetilação de histonas, regulação negativa global de miRNAs e



**Fig. 29.** Mecanismos tumorigênicos em células de mamíferos. As aberrações genéticas e epigenéticas estão envolvidas na transformação neoplásica. Essas duas vias alternativas da tumorigênese estão intrinsecamente ligadas e podem, individualmente ou em sinergia, levar ao desenvolvimento do fenótipo maligno.

Fonte: <http://cacancerjournal.org>

regulação positiva de certos fatores da maquinaria epigenética. Essas aberrações conferem vantagem seletiva de crescimento de células neoplásicas, levando a deficiência apoptótica, proliferação celular e tumorigenicidade (**Fig. 29**). A seguir, estudaremos os diferentes processos de regulação epigenética e seus funcionamentos aberrantes nas células cancerígenas.

## Metilação do DNA no câncer

Inicialmente, acreditava-se que a tumorigênese resultasse exclusivamente de eventos genéticos, como mutações, ampliações, rearranjos de genes ou deleções, porém atualmente já ficou claro que a metilação do DNA é uma maneira alternativa de silenciar genes supressores de tumores, de maneira equivalente a mutações genéticas. Assim, podemos dizer que a tumorigênese resulta da ativação da via oncogênica e/ou inativação das vias proapoptóticas ou supressoras de tumor envolvendo os mecanismos epigenéticos.

Exemplos do mecanismo de metilação aberrante do DNA de genes na tumorigênese são numerosos, notadamente a metilação do gene de reparo de incompatibilidade humano mutL homólogo 1 (MLH1) no câncer colorretal, o gene de reparo de DNA O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) em gliomas e câncer colorretal e o regulador do ciclo celular p16 (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A [CDKN2A]) em neoplasias colorretais e outras.

Além disso, a metilação aberrante do DNA foi mais frequente do que as alterações no número de cópias quando estudadas em um genoma inteiro. Também é o caso do câncer colorretal, no qual tumores individuais abrigam mais genes hipermetilados do que mutações genéticas e, nos genes individuais, a hipermetilação é mais frequente que as alterações genéticas. Semelhante às mutações, o silenciamento de genes supressores de tumor confere vantagem proliferativa às células, mediando a invasão e facilitando a metástase. Foi observado também, que a hipermetilação do DNA é um evento precoce na tumorigênese, provavelmente desempenhando um papel importante na iniciação e progressão do tumor e criando uma condição para o acúmulo de uma infinidade de aberrações genéticas e epigenéticas simultâneas em cânceres de colorretal, gástrico e de fígado. Outro exemplo é a hipermetilação do MGMT que desempenha um papel direto no acúmulo de mutações G/A no gene KRAS em tumores colorretais.

Vale salientar que padrões aberrantes de metilação do DNA no câncer têm variabilidade intra e interindividual significativa, representando não apenas a especificidade do tipo de tumor, mas também a variabilidade pessoal.

## **Modificações de histonas no câncer**

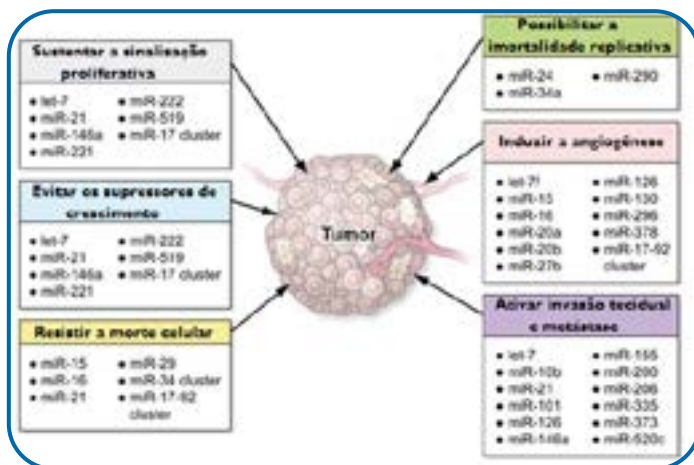
São limitadas as informações sobre o perfil global de modificação de histonas em linhas celulares de câncer e tumores primários. Estudos recentes reportam uma perda global da monoacetilação da histona H4 lisina 16 e da trimetilação da histona H4 lisina 20 no câncer. Essas modificações ocorreram em todo o genoma, sobrepondo-se especificamente às áreas de hipometilação do DNA em seqüências repetitivas. Por outro lado, a perda de acetilação da histona H3 lisina 9 e dimetilação ou trimetilação da lisina 4 e o ganho de dimetilação ou trimetilação da histona H3 lisina 9 e a trimetilação da lisina 27 podem ser encontrados em promotores de genes específicos e podem contribuir para a tumorigênese, silenciando genes críticos supressores de tumores.

Além das alterações nas histonas metilases/ HDMTs no câncer, inúmeras alterações na acetilação de histonas de genes específicos também foram reportadas. Por exemplo, o receptor quimérico da oncoproteína promielocítica-leucemia retinóica  $\alpha$  (PML-RAR $\alpha$ ) produzido pela translocação t(15;17) na leucemia promielocítica aguda tem como alvo promotores específicos através do recrutamento aberrante de HDACs e HMTs, levando ao silenciamento da expressão gênica.

## **Expressão de RNAs regulatórios no câncer**

A maioria dos miRNAs estão localizados em regiões gênicas e são desregulados quando sofrem alterações cromossômicas e gênicas comuns de ocorrerem em todos os tipos de câncer. Alguns exemplos de alterações que podem afetar a regulação de miRNAs são deleções, duplicações, mutações que afetam o processamento dos miRNAs e metilações que afetam a expressão destes. Os miRNAs podem ser oncomiR que estimulam a divisão e, se forem desregulados, fazem a célula proliferar indiscriminadamente. Ainda existem miRNAs supressores de tumor que atuam freando a divisão celular. Muitos miRNAs estão envolvidos com diferentes mecanismos de atuação

nas células cancerígenas, alguns podem atuar na sinalização da proliferação, imortalidade da célula, resistência à morte celular e, até mesmo, a metástase. Alguns miRNAs já foram bem caracterizados com diferentes funções, como mostra a **Fig. 30**. Outro fator interessante é que o mesmo miRNA pode ter funções de oncomiR ou supressor dependendo do contexto da célula e o tipo específico do câncer. Assim, cada tipo de câncer apresenta um perfil de expressão de miRNA característico e os estudos estão tentando identificar os miRNAs atuantes e definir melhor como esse processo ocorre.



**Fig. 30.** Atuação de miRNAs em diferentes vias em células cancerígenas. Fonte: Ross and Davis. “MicroRNA, nutrition, and cancer prevention.” *Advances in nutrition* 2.6 (2011): 472-485.

Um dos tipos de câncer melhor estudado é o câncer de mama, onde miRNAs como miR-21, miR-155 e miR-373 parecem agir como oncomiR, enquanto que o miR-125a, miR-125b, miR-101 e miR-207 parecem atuar como supressores de tumor. No câncer de pulmão, por sua vez, alguns dos oncomiR identificados são miR-21, miR-100, miR-135a, enquanto que os miRNAs supressores de tumor identificados são miR-101, miR-200b, miR-24. O aumento significativo no número de estudos também impacta significativamente o número de miRNAs identificados e como estes atuam nas rotas de cada doença.

Muitos estudos, atualmente, têm feito testes para que miRNAs ou anti-miRNAs (denominados antagomir) possam ser usados como tratamento

de alguns tipos de câncer, onde estes podem ser usados para induzir apoptose e ou parada do ciclo celular especificamente nestas células. Outros estudos também trabalham na busca por padrões de miRNAs específicos de células e tumores, para que testes não invasivos possam ser desenvolvidos e o câncer em seu estágio precoce possa ser detectado.

## **Epigenética, ambiente e estilo de vida**

Como já abordado anteriormente, os fatores ambientais podem influenciar significativamente o epigenoma de um indivíduo e, inclusive, aumentar o risco do indivíduo desenvolver alguma patologia. A epigenética começa a influenciar a vida do organismo desde o útero e marcas epigenéticas aberrantes no útero podem aumentar a susceptibilidade a doenças no adulto, como obesidade, aterosclerose, diabetes tipo II e outras doenças metabólicas e cardiovasculares. Além disso, o estilo de vida do indivíduo é fundamental para uma boa regulação epigenética e vale frisar, que alguns fatores importantes como o uso de cigarro, dieta e exercícios, modulam fatores epigenéticos e serão abordados a seguir.

O cigarro, que é uma droga lícita que tem cerca de 400 substâncias nocivas ao ser humano. Surpreendentemente, essas substâncias podem induzir alterações que geram consequências em até três gerações sucessivas. Isto é, uma mulher que fuma enquanto está grávida pode induzir modificações epigenéticas decorrentes do cigarro: nela mesma (primeira geração), no feto (segunda geração) e, caso o feto seja do sexo feminino (onde as células reprodutivas são formadas ainda no útero), podem ocorrer modificações epigenéticas nas células reprodutivas da filha (terceira geração). O cigarro pode promover várias modificações epigenéticas, entre elas, causar hipóxia no feto, uma vez que a nicotina induz uma perfusão uteroplacentar e diminui o oxigênio. Esse processo leva a ativação do HIF- $\alpha$  (fator de transcrição ativado quando há hipóxia) que aumenta a expressão de um gene *MAT2A* que, por sua vez, é a enzima responsável por produzir o SAM (S-adenosilmetionina), a molécula necessária a metilação do DNA. Em consequência, o padrão de metilação do indivíduo será alterado.

A alimentação também é outro fator que pode modular o epigenoma do indivíduo. Existe, inclusive, uma área das ciências dedicada apenas

a estudar as contribuições epigenéticas desencadeadas pela alimentação, é a nutriepigenômica. A alimentação do indivíduo afeta a epigenética principalmente porque, muitas vezes, os grupos metil para metilação do DNA são provenientes de alimentos ricos em metionina, ácido fólico, colina, vitamina B12 e B6. Alguns experimentos têm sido conduzidos a fim de entender as consequências da alimentação nas marcas epigenéticas. Um exemplo clássico dessa influência é um estudo com modelos murinos onde foi verificado a presença de metilação em um gene *Agouti*. Os pesquisadores observaram que a hipermetilação desse gene gerava prole magra e saudável, enquanto a hipometilação deste mesmo gene gerava ratos obesos, amarelados e predispostos a câncer e diabetes. Estes pesquisadores também avaliaram camundongos que estavam usando um suplemento de bisfenol, que altera o metabolismo e tende a deixar os ratos mais obesos. Estes pesquisadores perceberam que os ratos que usavam o bisfenol mas tinham uma dieta rica em vitamina B e ácido fólico não apresentavam obesidade e, de certa forma, protegeu os indivíduos.

A prática de exercícios também parece ser um fator muito importante na modulação de características epigenéticas. Estudos indicam que indivíduos que passam de uma situação inativa fisicamente para uma situação ativa passam a apresentar várias regiões gênicas desmetiladas. Essas regiões que mudam o padrão de metilação a depender do estado de atividade do indivíduo, parecem induzir a expressão de mRNAs benéficos para prevenir o risco de doenças e aumentam o fenótipo metabólico do indivíduo. Além disso, crianças com pais obesos tem predisposição à síndrome metabólica e exercícios realizados durante a gravidez podem mitigar essa predisposição. O efeito do exercício foi testado em camundongos fêmeas gestantes modificadas geneticamente, e que apresentavam uma predisposição aumentada para diabetes e também mostrava uma hipermetilação em um gene chamado *Pgc-1alfa* (envolvido na biogênese mitocondrial e associado a metabolismo celular). Quando a fêmea fazia corridas voluntárias, o exercício levava ao bloqueio da metilação deste gene, consequentemente o gene era transcrito e tinha sua função na manutenção da mitocôndria mantida, o que bloqueava a disfunção metabólica no feto.

Em suma, o epigenoma pode ser modulado por características ambientais e, deve-se tentar manter os hábitos saudáveis para evitar complicações futuras. O conhecimento do epigenoma e de como o ambiente pode influenciá-lo está em constante crescimento e tende a ser cada vez mais presente nas nossas vidas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Processos epigenéticos respondem prontamente às condições ambientais e permitem rápidas modificações à ambientes hostis. Já é bastante evidenciado o impacto do meio ambiente sobre nosso genoma e epigenoma. Há evidências de que os poluentes ambientais têm causado várias doenças ao induzir mudanças no nosso epigenoma, alterando as atividades de genes específicos. Por exemplo, o arsênio em águas contaminadas afeta a metilação do genoma gerando tumor de bexiga e, também, a exposição do indivíduo a altos níveis de outros metais pesados como, níquel, mercúrio, crômio, chumbo e cádmio, na alimentação e na água, também podem causar mudanças na metilação do gene, modificações químicas nas histonas e a expressão de RNAs regulatórios, levando a câncer de pulmão, fígado e outros. A poluição do ar, em especial, as partículas em suspensão que saem do escapamento de veículos, também causam mudanças epigenéticas que levam inflamação a todo o corpo. O benzeno da gasolina e outros combustíveis a base de petróleo induzem a metilação do DNA e está associada a leucemia. Muitas outras substâncias químicas estão associadas aos desequilíbrios dos mecanismos epigenéticos causando diversas enfermidades. Doenças complexas, incluindo distúrbios psiquiátricos, metabólicos e cardiovasculares, estão relacionadas à herança epigenética de respostas mal adaptadas ao stress ambiental. A regulação epigenética pode programar a informação genética e o destino de uma célula, influenciando assim sua funcionalidade e, por consequência, a do órgão em questão. De acordo com as experiências vividas (estilo de vida ou influências do meio ambiente), tanto a expressão diferencial de miRNAs quanto a metilação do DNA atuam em sinergia afetando a programação de doenças neurológicas e psiquiátricas na vida adulta, ou em futuras gerações, através de imprinting genômico (carimbo genômico).

Os avanços no campo da epigenética do câncer levaram à percepção de que o empacotamento do genoma é potencialmente tão importante quanto o próprio genoma na regulação dos processos celulares essenciais necessários para preservar a identidade celular e também no surgimento de doenças, como o câncer. Uma abordagem combinatória utilizando diferentes enfoques terapêuticos epigenéticos, juntamente com a quimioterapia padrão, mantém uma promessa significativa para o sucesso do tratamento do câncer no futuro.

Muitas doenças humanas estão ligadas a modificações epigenéticas inapropriadas; assim, os pesquisadores estão tentando identificar medicamentos relevantes para reverter essas modificações. Por exemplo, vários inibidores contra HDACs indesejados (HDACi), foram analisados em experiências com animais, células saudáveis normais e ensaios clínicos com nenhum ou poucos efeitos colaterais dentro de uma faixa terapêutica. Semelhante à acetilação, muitos inibidores de metilação, incluindo 5-azacitidina, 5-aza-2-desoxicitidina, zebularina e procainamida, demonstraram ser eficazes contra a metilação inadequada. Além do uso de miRNAs e anti-miRNAs, os antagomirs também conhecidos como anti-miRs, são capazes de regular a expressão de vários genes e também estão em ensaios clínicos para uso na medicina personalizada.

A epigenética também deixa claro que o estresse causado pelas guerras, conflitos, preconceitos e outras formas de adversidade na fase da infância, podem trazer prejuízos tanto para os indivíduos afetados quanto para suas futuras gerações, isso porque, existe a possibilidade de que marcações epigenéticas sejam passadas às futuras gerações. Há evidências experimentais comprovando esses efeitos em seres humanos e animais. É como se, de fato, a alimentação do seu pai ou da sua mãe afetasse o metabolismo dos seus netos. Um estudo emblemático demonstrou como esse processo afetou netos de holandeses que passaram fome durante a Segunda Guerra Mundial, levando-os à obesidade, doenças cardiovasculares, pressão alta, doenças psicológicas, entre outras. Também há estudos que mostram que pessoas que passaram por um determinado trauma podem ter descendentes naturalmente estressados em virtude desse fato. Ou seja, a herança que trazemos dos nossos ancestrais vai além do DNA que recebemos deles.



## REFERÊNCIAS

- ALSHARAFI, W. A. et al. MicroRNA in glutamate receptor-dependent neurological diseases. **Clinical Science**, v. 131, n. 14, p. 1591–1604, 15 jul. 2017.
- ASLLANAJ E. et al. Chromatin landscape and epigenetic biomarkers for clinical diagnosis and prognosis of type 2 diabetes mellitus. In: **Prognostic Epigenetics**. Academic Press, 2019. p. 289-324.
- BANERJEE, T.; CHAKRAVARTI, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, v. 31, n. 24, p. 4858-4873, 2011.
- BALLESTAR, E. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 5, p. 263–271, maio 2011.
- BARR, M. L.; BERTRAM, E. G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 676-677, 1949.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669-681, 2007.
- BIRD, Adrian. DNA methylation de novo. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2287-2288, 1999.
- BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. *Genética Humana*. Artmed. **Porto Alegre**, 2001.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, fev. 2009.
- CHANG, S. C. et al. Mechanisms of X-chromosome inactivation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 11, p. 852-866, 2006.
- COX, M. M.; DOUDA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. 1. ed. [s.l.] Jones & Bartlett, 2012.

- DESHMUKH, S. et al. Levels of DNA cytosine methylation in the *Drosophila* genome. **PeerJ**, v. 6, p. e5119, 2 jul. 2018.
- DI CROCE, L. et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1079-1082, 2002.
- DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. In: **Seminars in reproductive medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2009. p. 351-357.
- EDEN, A. et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science**, v. 300, n. 5618, p. 455-455, 2003.
- EHRlich, M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. **Clinical immunology**, v. 109, n. 1, p. 17-28, 2003.
- Epigenetics: The Evolution Revolution. (2018, June 8). Retrieved from <https://www.madinamerica.com/2018/06/epigenetics-evolution-revolution/>. Acessado em 12/03/2020
- FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 42-54, fev. 2016.
- FEINBERG, A. P.; OHLSSON, Rolf; HENIKOFF, Steven. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature reviews genetics**, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.
- FLORCZUK, M; SZPEHCINSKI, A; CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, J. miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in non-small cell lung cancer: Current perspectives. **Targeted oncology**, v. 12, n. 2, p. 179-200, 2017.

FRIGOLA, J. et al. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. **Nature genetics**, v. 38, n. 5, p. 540-549, 2006.

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA Methylation and Demethylation in Arabidopsis. **The Arabidopsis Book**, v. 6, p. e0102, jan. 2008.

Genomic Imprinting: Definition and Examples. (2014, September 8). Retrieved from <https://study.com/academy/lesson/genomic-imprinting-definition-and-examples.html>. Acessado em 30/03/2020.

German, R.; Miguel, L. Impronta Genômica y Desarrollo Embrionario Genomic Imprinting and Embryonic Development. **Int. J. Morphol**, v.30(4):1453-1457, 2012.

GIACONE, F. et al. Epigenetics of male fertility: effects on assisted reproductive techniques. **The world journal of men's health**, v. 37, n. 2, p. 148-156, 2019.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4-13, 2010.

GILBERT, Walter. Origin of life: The RNA world. **nature**, v. 319, n. 6055, p. 618-618, 1986.

GODDARD, M. E.; WHITELAW, E. The use of epigenetic phenomena for the improvement of sheep and cattle. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 247, 2014.

GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. Chromatin modifiers and carcinogenesis. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 12, p. 695-702, 2004.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. Introdução à Genética. 10. Ed. **Rio de Janeiro: Guanabara**, 2013.

GUO, S. Epigenetics of endometriosis. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 10, p. 587-607, 2009.

- HA, T. MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. **Immune network**, v. 11, n. 3, p. 135-154, 2011.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 509–524, ago. 2014.
- HAN, B. W.; ZAMORE, P. D. piRNAs. **Current Biology**, v. 24, n. 16, p. R730–R733, ago. 2014.
- HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006.
- HOWARD, G. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 404-408, 2008.
- HUGHES, T.; SAWALHA, A. H. The role of epigenetic variation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 5, p. 245, 2011.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 229-249, 2009.
- IIZUKA, M.; SMITH, M. M. Functional consequences of histone modifications. **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 2, p. 154-160, 2003.
- ILLINGWORTH, R. S.; BIRD, A. P. CpG islands - 'A rough guide'. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1713–1720, 5 jun. 2009.
- JIANG, C.; PUGH, B. F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 3, p. 161-172, 2009.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-692, 2007.

- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews genetics**, v. 3, n. 6, p. 415-428, 2002.
- JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer-epigenetics comes of age. **Nature genetics**, v. 21, n. 2, p. 163-167, 1999.
- JONES, P. A.; MARTIENSSEN, R. A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop. *Cancer research*, v. 65, n. 24, p. 11241-11246, 2005.
- KAMTHAN, A. et al. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 06, 2 abr. 2015.
- LAKER, R. C. et al. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1 $\alpha$  gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1605-1611, 2014.
- LAM, J. K. W. et al. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 4, p. e252, 2015.
- LEGUBE, G.; TROUCHE, D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. **EMBO reports**, v. 4, n. 10, p. 944-947, 2003.
- LIU, N.; PAN, T. RNA epigenetics. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 28-35, jan. 2015.
- LYON, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **nature**, v. 190, n. 4773, p. 372-373, 1961.
- MARQUES, C. J. et al. Alteração transmissível do Imprinting Genômico em pacientes inférteis por Oligozoospermia e Azoospermia. **Arquivos de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 41-45, 2007.
- MELLOR, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in genetics**, v. 22, n. 6, p. 320-329, 2006.

- MOHAPATRA, S. S.; BIONDI, E. G. DNA Methylation in Prokaryotes: Regulation and Function. In: KRELL, T. (Ed.). **Cellular Ecophysiology of Microbe**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–21.
- NAGALAKSHMI, B.; SAGARKAR, S.; SAKHARKAR, A. J. Epigenetic mechanisms of traumatic brain injuries. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2018. p. 263-298.
- O'BRIEN, J. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 402, 2018.
- PAIVA, J. T. et al. Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. **Archivos de zootecnia**, v. 68, n. 262, p. 304-311, 2019.
- PETERSON, C. L.; LANIEL, M.-A. Histones and histone modifications. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. R546–R551, jul. 2004.
- Pons, D. et al. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. **Eur Heart J**, v. 30, n.3, p.266–277, 2009.
- RAINIER, S. et al. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, v.362, n. 6422, p. 747-749, 1993.
- RAMOS, P. M. M. Avaliação do padrão de metilação da DMR (Differentially Methylated Region) dos genes IGF2 e H19 em carcinomas uroteliais. Dissertação Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. 2010.
- REIG, G.; CONCHA, M. L. Impronta genómica y desarrollo embrionario. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 4, p. 1453-1457, 2012.
- RODRIGUEZ, J. et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. **Cancer research**, v. 66, n. 17, p. 8462-9468, 2006.
- RONEN, A.; GLICKMAN, B. W. Human DNA repair genes. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 37, n. 3, p. 241-283, 2001.

ROSS, S. A.; DAVIS, C. D. MicroRNA, Nutrition, and Cancer Prevention. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 6, p. 472–485, 1 nov. 2011.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. A brief history of RNAi: the silence of the genes. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1293–1299, jul. 2006.

SHAMSI, M. B. et al. Epigenetics of human diseases and scope in future therapeutics. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 205–211, jun. 2017.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010.

SHARP, A. J. et al. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. **Genome research**, v. 21, n. 10, p. 1592-1600, 2011.

SIVOLOB, A.; PRUNELL, A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. **Journal of molecular biology**, v. 331, n. 5, p. 1025-1040, 2003.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J.; MOTTA, P. A. **Fundamentos de Genética**. 4ed Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2008.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 13, p. 3666–3670, 1 jul. 2016.

TANG, Y. et al. Widespread Existence of Cytosine Methylation in Yeast DNA Measured by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 7249–7255, 21 ago. 2012.

TARASWI, B.; DEBABRATA, C.A. Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation. **Molecular and Cellular Biology**. v.31, n. 24, p. 4858–4873, Dec. 2011.

TORAÑO, Estela G. et al. Role of epigenetics in neural differentiation: implications for health and disease. In: **Molecular mechanisms and physiology of disease**. Springer, New York, NY, 2014. p. 63-79.

VANYUSHIN, B. F. DNA Methylation in Plants. p. 56, [s.d.].

VERHOEVEN, K. J. F.; VONHOLDT, B. M.; SORK, V. L. Epigenetics in ecology and evolution: what we know and what we need to know. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 8, p. 1631-1638, 2016.

WATSON, James D. et al. **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015.

WEI, J.-W. et al. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 3–9, jan. 2017.

WILSON, A. S.; POWER, B. E.; MOLLOY, P. L. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1775, n. 1, p. 138-162, 2007.

ZAMPIERI, M. et al. Reconfiguration of DNA methylation in aging. **Mechanisms of ageing and development**, v. 151, p. 60-70, 2015.

ZOGHBI, H. Y.; BEAUDET, A. L. Epigenetics and Human Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 2, p. a019497, fev. 2016.





