

Epigenética nos Animais

J.H.R. Dias Correia
e
A. A. Dias Correia

1 – Organização espacial do genoma

2 – Introdução à epigenética nos animais

2.1 – Introdução

2.2 – Epigenética e hereditariedade soft

2.3 – Hereditariedade de estados epigenéticos através das gerações

2.4 – Autonomia das marcações epigenéticas

2.5 – Resumo das modificações químicas do DNA que não alteram a sua sequência nucleotídica

3 – Diferentes mecanismos biológicos que interferem na maquinaria epigenética

3.1 – Metilação do DNA

3.2 – Modificações das histonas

3.2.1 – Biotinilação das histonas

3.2.2 – Poli (ADP – ribosilação) das histonas

3.3 – Estrutura da cromatina, diversidade funcional das variantes de histonas e ocupação por nucleossomas

3.4 – Proteínas dos grupos Polycomb e Trithorax na regulação da expressão de genes

3.5 – nc RNA na regulação dos genes

- Moléculas de RNA como sinais reguladores de célula para célula.

4 – Alguns exemplos de regulação epigenética e seu impacto nos animais.

4.1 – Introdução

4.2 – Reprogramação epigenética nos mamíferos

4.3 – Epigenética e imprintings

4.4 – Transmissão de estados epigenéticos

4.5 – Interações dos factores epigenéticos com o DNA cromatínico

4.6 – Regulação epigenética

4.6.1 – Regulação epigenética durante o desenvolvimento dos mamíferos

4.6.2 – Regulação epigenética e patologias

- Alelos Agouti em ratinho

- Alelo murino Axin^{fu}

4.6.3 – Regulação epigenética, etologia e manejo

- Programação epigenética e cuidados maternos

- 4.6.4 – Regulação epigenética e produção animal
 - Genes “imprinting”
 - Callypyge em ovinos
 - Nesp 55 em bovinos
- 4.6.5 – Regulação epigenética e domesticação de animais
 - Comportamento de aves e sua transmissão à descendência
- 4.6.6 – Epigenética e ncRNAs. Regulação epigenética e transferência através do zigoto de moléculas de RNA
 - miRNAs como reguladores da expressão dos genes.
- 4.6.7 – Conclusão sinoptica

Bibliografia

Dias Correia, J. H. R.: CIISA, Departamento de Morfologia e Função, Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Alameda da Universidade Técnica. Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal e-mail jhrdcorreia@fmv.utl.pt

Dias Correia, A. A. : Professor Jubilado. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Alameda da Universidade Técnica. Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal

1 – Organização espacial do genoma

A organização espacial do genoma é fundamental na coordenação da regulação do funcionamento dos genes. (Williams e Flavell, 2008).

Como vimos em trabalhos anteriores, os cromossomas no interior do núcleo não ocupam aqui posições ao acaso mas sim determinadas posições de uns em relação a outros pelo menos em certos tipos celulares.

Por outro lado a activação ou silenciamento dos genes cromossomais é frequentemente acompanhada por uma relocalização de cada locus dentro do núcleo.

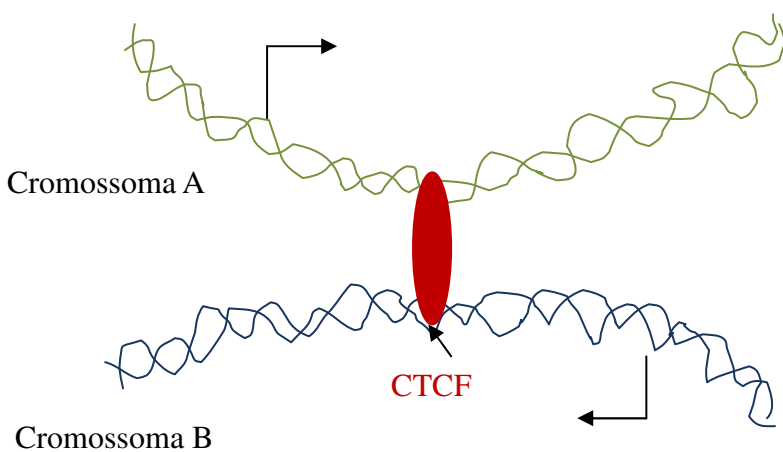
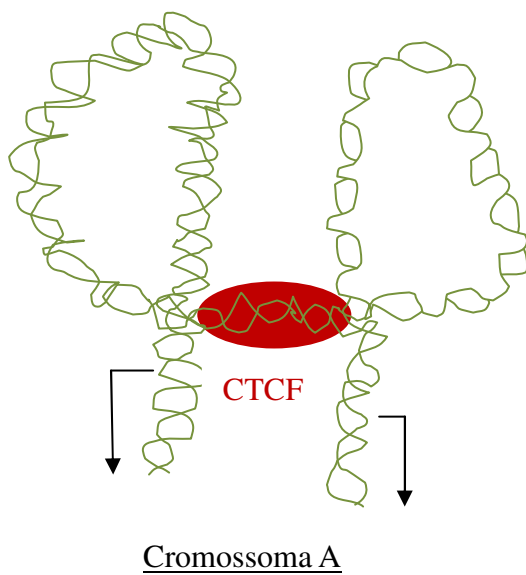
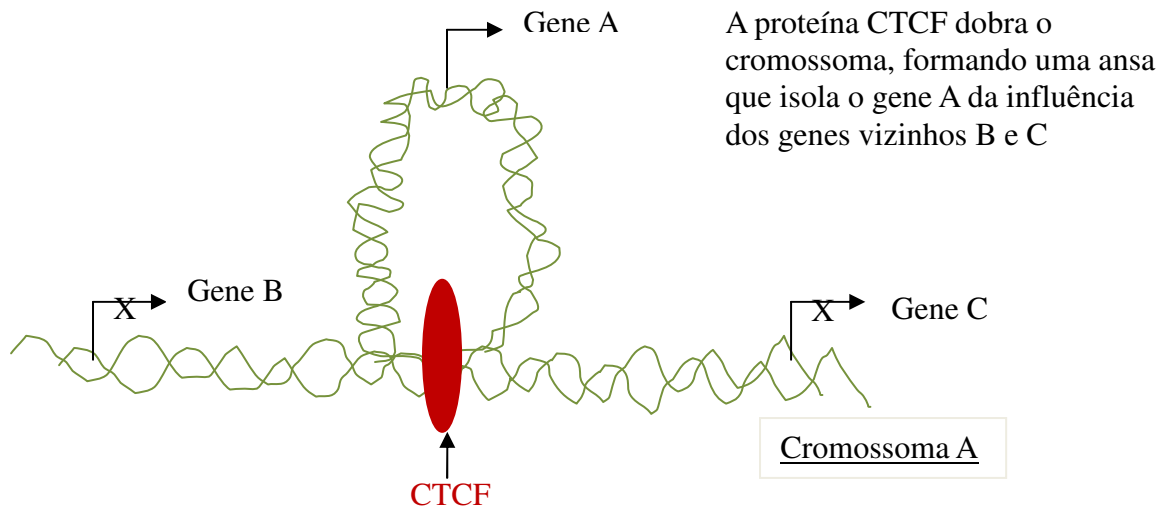
É conhecido que associações intracromossomais e intercromossomais regulam e coordenam a expressão de muitos genes.

Por outro lado elementos reguladores distais podem fisicamente interactuar em cis e em trans com genes que eles controlam e inclusivamente elementos reguladores de um cromossoma podem também directamente regular a expressão de genes noutros cromossomas (ref.8, 11, 12, citadas em Williams e Flavell, 2008).

Neste contexto há uma proteína a CTCF (CCCTC – binding factor) que é uma proteína factor de transcrição em “dedo de zinco” (zinc finger) muito versátil e que possui diversas funções reguladoras mediando interacções de gama ampla intracromossomais e intercromossomais, determinando dessa forma a estrutura tridimensional do genoma.

A CTCF pode interactuar com elementos de “fronteira” em ordem a evitar a “abertura” da heterocromatina, podendo actuar a CTCF como um activador da transcrição ou um silenciador da transcrição, funcionando pois através da organização topológica do genoma tal como se esquematiza seguidamente (Figura 1).

Figura 1- Possível Organização do Genoma
Mediada pelo Factor de Transcrição CTCF



O CTCF pode formar dímeros e mesmo oligómeros podendo levar a formação de ansas ou interações intercromossomais, podendo inclusive socorrer-se do recrutamento de outras proteínas para locais específicos do genoma.

O número de locais nos genomas que podem interagir com CTCF é calculado em cerca de 14.000 e 15.000 no ratinho e nos seres humanos (ref. 26, 27 citadas em Williams e Flavell, 2008).

Como referem Branco e Pombo, 2006, após a mitose, os cromossomas das células dos mamíferos descondensam-se parcialmente e ocupam territórios distintos dentro do espaço do núcleo.

Nos modelos clássicos que procuram descrever a topografia dentro do núcleo dos seus componentes, nos espaços que separam os diversos territórios cromossomais, ou sejam os domínios intercromatínicos, ocorreriam variadíssimas populações moleculares solúveis, ocorrendo apenas raras interações entre os cromossomas através de ansas cromatínicas que se expandiriam para esses espaços.

Contudo hoje há provas (Branco e Pombo, 2006) de ocorrerem significativas misturas sobretudo nas suas periferias entre diversos cromossomas devidas a movimentos difusivos com inegáveis reflexos no funcionamento do genoma e na sua estabilidade.

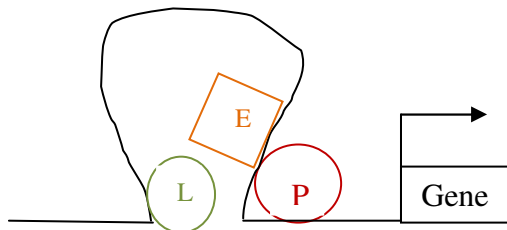
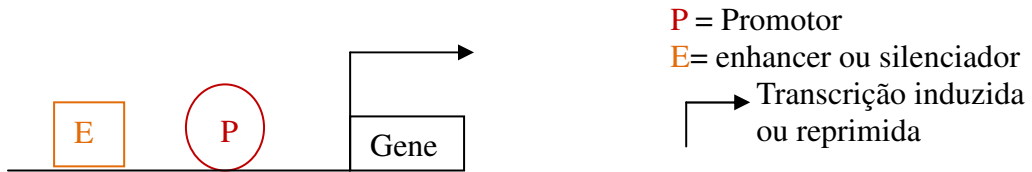
Esse grau de mistura entre pares de cromossomas específicos, parece correlacionado com a frequência de translocações cromossomais implicando que as cisões das duas cadeias de DNA formadas dentro dessas áreas em que ocorrem misturas dos territórios cromossomais, participem nos rearranjos intercromossomais.

A organização do genoma no interior do núcleo é pois muito complexa e dinâmica.

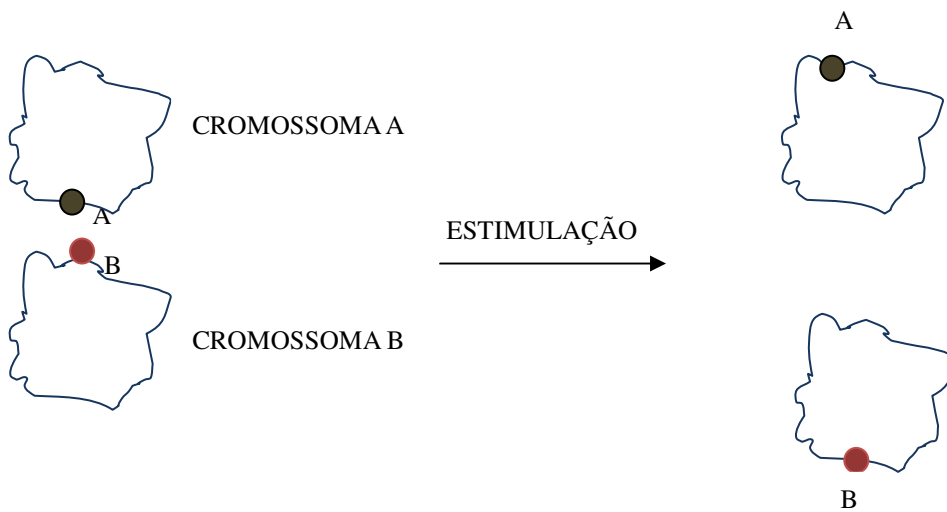
As sequências reguladoras do DNA actuando em Cis ou em Trans não são os únicos meios para regular a expressão dos genes, pois também são muito importantes neste contexto, a posição genómica dos genes, a localização dentro do núcleo das sequências de DNA, e ainda todo um complexo jogo de interações do genoma com outras particularidades da arquitectura nuclear. (Schneider Grosschedl, 2007).

A localização espacial de um gene dentro do núcleo e dentro do cromossoma determina se ele é expresso ou não. De uma maneira geral genes localizados na heterocromatina são silenciados, genes na eucromatina são transcritos (Fig.2).

Fig.2
Regulação de um gene
(Transcrição ou Repressão)



Formação de uma ansa em que a região L que regula diversos genes; rastreia toda a sequência até encontrar um gene que regula.



Dois cromossomas distintos com genes de um e de outro, próximos

Os genes afastam-se em virtude de estímulos que alteram a topografia estrutural dos cromossomas, com formas de ansas.
 Um gene pode deslocar-se para uma região heterocromatina reprimida e o outro gene pode deslocar-se para uma

Estudos efectuados ao nível do núcleo de células HeLa, revelaram aglomerados não homogêneos de locais de transcrição (de cerca de 80nm de diâmetro) da ordem de cerca de 10.000, dos quais cerca de 8.000 correspondiam a actividades da RNA polimerase II e a restante à RNA polimerase III (Pombo et. al. 1999, citados em Schneider Grosschedl, 2007), variando este número de locais de transcrição consoante as diferentes células.

Foi também possível verificar que estes locais de transcrição com os complexos de RNA polimerases e aglomerado de factores de transcrição formariam uma “nuvem” com até 20 ansas de DNA à volta dela, parecendo que a polimerase seria relativamente imóvel, mas as ansas de DNA apareciam e desapareciam consoante as fases de transcrição.

Na organização dos cromossomas é conhecido que cada cromossoma ocupa um território específico no núcleo e que nas células dos mamíferos estes não tendem a sobrepor-se, não sendo por outro lado os cromossomas homólogos, adjacentes. As regiões ricas em genes dos cromossomas tendem a encontrar-se mais para o interior do núcleo, enquanto os pobres em genes se situam mais à periferia.

Nos cromossomas as ansas de cromatina “descondensadas” tendem a situar-se nas margens ou bordas dos territórios cromossomais “misturando-se” um tanto com territórios de cromossomas vizinhos.

Os territórios cromossomais afiguram uma arquitectura como que esponjosa, o que faz com que os compartimentos nucleares intercromatínicos sejam muito sinuosos, com algumas ansas de genes expandindo-se para fora do respectivo território e misturando-se com território diferente,

Numerosas modificações das histonas são hoje conhecidas estando envolvidas na arquitectura cromossomal.

2 – Introdução à epigenética nos animais

2.1 – Introdução

A variância fenotípica nos mamíferos não pode ser atribuída aos efeitos de um único gene, havendo outras causas para essa variância, tais como, efeitos devidos a vários genes, influências ambientais, interferências (“noise”) e efeitos epigenéticos.

“Os efeitos epigenéticos são devidos a modificações químicas do DNA que não alteram a sequência nucleotídica deste, mas que alteram a probabilidade da transcrição dos genes.” (Peaston e Whitelaw, 2006)

O epigenoma varia de acordo com

- O ciclo celular
- O tipo celular, tecido e órgão
- A idade do ser vivo
- A espécie
- Em função dos factores ambientais (por ex: nutrição)

A variação do epigenoma é frequente nos genomas dos mamíferos.

Tem sido observado em populações isogénicas diferentes características epigenéticas, sobretudo quanto mais idosas forem essas populações isogénicas ou com estilos de vida mais dispares.

A hereditariedade epigenética através das gerações está bem documentada em diversos seres

eucariotas mas as provas existentes nos mamíferos são escassas (Peaston e Whitelaw, 2006). Estão assinalados casos em que as anormalidades epigenéticas são corrigidas nas células germinativas (ref. Wells, 2005, citado em Peaston e Whitelaw, 2006), ao lado de outros casos (gene A^{VY} e Axin^{fu} em ratinho), (ref. Rakyan et. al., 2003, citados em Peaston e Whitelaw) que revelam a transmissão hereditária da metilação dos alelos destes genes, feita através da linha germinativa materna ou paterna.

Há também algumas provas (ref. Weaver et. al. 2004, citados em Peaston e Whitelaw, 2006) da hereditariedade epigenética induzida pelo ambiente condicionar o fenotipo da descendência.

Variações nos epigenotipos entre indivíduos geneticamente idênticos parecem associadas com diferenças nos respectivos fenotipos (Whitelaw e Whitelaw, 2006).

O epigenoma parece ser influenciado pelo meio ambiente envolvente (Whitelaw e Whitelaw, 2006).

O epigenoma revela instabilidade dentro de cada geração e de geração para geração (Whitelaw e Whitelaw, 2006).

Quando os fenótipos dos genes são herdados, e surgem fenotipos alternativos de um locus estes são designados como epialelos (Jablonka, Eva and Lamb Marion J., 1995).

Os epialelos correspondem pois a marcas epigenéticas dos alelos.

Kermicle cunhou este termo em 1978 para referir diferentes formas epigenéticas que um gene adquire durante a gametogenese nos machos e fêmeas.

Jablonka e Lamb utilizam esta expressão para referir todas as variantes cromatinicas hereditárias e não apenas as marcas específicas do sexo.

As variantes epialélicas são consequência de mudanças da cromatina normal que ocorrem durante a diferenciação somática.

Os epialelos também podem surgir através de processo estocásticos (Ref. Holliday, 1987, citado em Jablonka e Lamb, 1995).

Teoricamente o número de epialelos de um locus é enorme. Num organismo multicelular diplóide o número máximo de epialelos é o número de células desse organismo multiplicado por dois (o número de cópias de cada gene na célula). É verdade que o número actual ou real é muito menor.

Em diferentes organismos individuais com idênticas sequências de DNA, o mesmo tipo celular pode ter diferentes epialelos.

Os diferentes estados epigenéticos estabelecem-se durante as primeiras etapas do desenvolvimento dos animais e são herdados estavelmente durante a vida desses animais, contudo e de uma maneira geral são erosionados de geração para geração, embora em alguns casos, quando se trata de epialelos metastáveis, não sejam completamente erosionados de uma geração para a geração, originando o fenómeno designado como a transmissão epigenetica transgeracional. (Encyclopedia of Genetic, Genomics, Proteomics and Bioinformatics – parte 1 Genetics – 1.3. Epigenetics. 2005 – Jonh Wiley e Sons).

À medida que a idade dos animais avança aumenta o numero de mutações pontuais, assim como outros erros ocorrem como é o caso do número de cópias repetidas no DNA e a quebra dos próprios

cromossomas.

Também à medida que a idade avança se admite que se altera a regulação epigenética.

Repete-se que a epigenética refere-se a mudanças na expressão genética não atribuíveis a alterações na sequência do respectivo DNA e que podem ser transmitidas durante as divisões celulares e por vezes de geração em geração.

As causas envolvidas parecem ser factores envolventes do ambiente ou meio em que se encontram essas moléculas de DNA, sendo a sua base molecular traduzida em modificações do DNA (embora não na sua sequência nucleotídica) e das proteínas integrando a cromatina que o envolve.

Os estados epigenéticos são herdados quando as células se dividem, apesar da maioria destes estados serem dinâmicos ao longo do desenvolvimento dos seres pluricelulares e alguns desses estados epigenéticos transmitem-se de geração para geração de forma não Mendeliana (non-Mendelian Inheritance).

A hereditariedade não-Mendeliana refere-se a qualquer tipo de hereditariedade em que as características não são segregadas de acordo com as leis de Mendel

Na hereditariedade Mendeliana cada progenitor contribui com um dos dois alelos possíveis de uma dada característica de acordo com a 1ª lei de Mendel ou da segregação e ainda de acordo com a lei da variação independente (as leis de Mendel).

A maioria dos genes dos eucariotas seguem um desenho de transmissão Mendeliana de geração para geração.

As modificações epigenéticas do DNA e da cromatina regulam o funcionamento do genoma durante o desenvolvimento dos animais e no seu estado adulto (Reik, et. al., 2003)

Nas linhas de células somáticas, as modificações epigenéticas são geralmente estáveis sendo características para cada um dos diferentes tipos de tecidos especializados.

Nos embriões em início nas suas células germinativas o genoma mamífero sofre reprogramações importantes, sendo as metiltransferases muito importantes neste contexto.

Esta reprogramação epigenética é contudo deficiente nos animais clonados e daí a baixa eficiência destas clonagens.

As modificações epigenéticas podem ser alteradas por factores ambientais que podem desencadear ainda fenótipos estáveis.

Como já referimos em trabalhos anteriores e veremos adiante em 3.2 as porções ou caudas amino-terminais das histonas expandem-se a partir do ângulo central das histonas, sendo por isso mais facilmente modificáveis (após a sua tradução), por modificações covalentes e reversíveis, embora também alguns ácidos aminados do próprio ângulo das histonas possa ser modificado também por covalência.

As enzimas envolvidas nestas modificações das histonas podem ser específicas para um certo tipo de ácidos aminados ou específicas para determinadas histonas.

Este conjunto de modificações operadas sobre as histonas tem sido postulado como constituindo um “código das histonas” que caracterizaria assim milhares de isoformas das histonas e determinando conseqüentemente quais as proteínas que poderiam interagir com as seqüências de DNA que se encontram nas “vizinhanças” dessas regiões.

Como vimos em trabalhos anteriores (e veremos oportunamente em 3.1) a metilação das citosinas no DNA altera a estrutura da cromatina local, uma vez que nestas circunstâncias a 5 metilcitosina (5mC) recruta determinado tipo de proteínas como por ex: as desacetilases das histonas.

A conseqüente modificação das histonas por seu turno altera a interação com proteínas envolvidas na transcrição podendo também alterar as interações dos nucleossomas com a fibra de cromatina, e daí a expressão dos genes modificada tal como o respectivo fenótipo.

O código das histonas, em conjunto com as metilações do DNA, e os micro RNA de interferência constituem uma assinatura epigenética hereditável que pode ser replicada nas células filhas após a divisão celular por mecanismos ainda relativamente ignorados, e através de uma hereditariedade não Mendeliana e com características genéticas metastáveis (Richards, 2006).

Uma vez adquiridas estas marcas epigenéticas que caracterizam por exemplo uma zona de cromatina silenciada, esta pode ser propagada através de diversos mecanismos, como sucede quando as citosinas do DNA são metiladas na hélice molde (template) e permanecendo nesta as enzimas metiltransferases, estas metiltransferases após a passagem da forquilha da replicação do DNA vão restaurar a metilação plena nos resíduos de citosinas da hélice biosintetizada de novo tendo como guia a metilação na hélice molde. Há provas experimentais que referem que a fidelidade da manutenção da metilação é da ordem dos 95 – 99% (Ref. 13 e 14 citadas em Richards, 2006).

Também no que se refere a marcações nas histonas estão assinaladas estratégias que indicam como as marcações pré-existentes nas histonas guiam a adição de novas marcações. (Richards, 2006).

É o caso das isoformas da Histona H3 que estando metiladas na lisina 9 (marcação envolvida no silenciamento da cromatina nessa região) recrutam metiltransferases para a lisina 9 dessas histonas através de proteínas intermediárias, como é o caso da HP1 (proteína heterocromatina 1) (Ref. 17 citada em Richards, 2006). Este mecanismo vai permitir que nos nucleossomas formados e assemblados de novo (que se distribuem em conjunto com os nucleossomas parentais nas hélices de DNA filhas) sejam efectuadas marcações apropriadas dessas novas histonas há medida que a forquilha da replicação do DNA avança.

Estes mecanismos da metilação do DNA e da metilação das histonas em conjunto explicam como os estados epigenéticos de silenciamento da transcrição podem ser propagados através das mitoses.

Esta hereditariedade epigenética através das mitoses é responsável por diversos fenómenos epigenéticos todos eles com a característica fundamental de que um único genotipo pode originar fenótipos alternativos devido ao estado epigenético de um ou mais loci dentro do genoma (Richards, 2006).

Os fenómenos epigenéticos melhor conhecidos referem-se seguidamente e são:

- Actividade de transposões “changes in phase”.
- Variação efeito de posição
- Inactivação do cromossoma X
- Paramutação

- Imprinting parental
- Silenciamento transgene
- Cancro

No entanto para afectar a hereditariedade nos animais é necessário que os estados epigenéticos sejam transmitidos, através da meiose, nas células germinativas, não sendo portanto suficiente para esse efeito as mitoses simples.

2.2 – Epigenetica e hereditariedade soft

(Richards, 2006)

A expressão hereditariedade “soft” proposta por Mayr (Ref. 64 e 65 citadas em Richards, 2006) referia que” a base genética dos caracteres pode ser modificada quer por indução directa pelo ambiente, quer por uso ou desuso, ou por uma falha intrinseca da constância, e este genotipo modificado é então transmitido à geração seguinte” (Ref. 64 citado em Richards, 2006).

A hereditariedade “hard” é caracterizada por material hereditário que permanece constante, excepto por mutação estocastica , ao acaso, e passa de uma geração para a seguinte.

Um conjunto de provas cada vez mais numerosas aponta para que os estados epigenéticos são influenciados pelo seu meio ambiente envolvente como já referimos.

Temperaturas baixas, agentes mutagénicos, manejo, etc são exemplos de agentes de modelação dos estados epigenéticos, tal como a influência de regimes dietéticos podem estar envolvidos na alteração da metilação do DNA nos roedores.

No caso do epialelo *AVY* no ratinho, a abordar adiante em 4.6.2, os suplementos alimentares como por ex: o ácido fólico e vitamina B12 podem estar envolvidos na metilação do DNA do gene *Agouti* aumentando esta no elemento IAP acima e suprimindo assim a superexpressão *Agouti* (Ref.44-46, citadas em Richards, 2006).

O alelo “*Agouti viable yellow*” (*Avy*) no qual uma partícula intracisternal A ou IAP,(é um retrotransposão abundante nos genomas mamíferos) está integrada estavelmente acima do gene *Agouti*, quando esta sequência IAP está desmetilada um promotor dentro dela leva à expressão ectópica do gene *Agouti* e o ratinho tem uma pelagem amarela e predisposição para diabetes mas se o IAP está metilado a expressão *Agouti* reverte os ratinhos para um fenótipo normal (pelagem castanha).

Vão no mesmo sentido a formação de epialelos mitoticamente estáveis em ratinhos com cuidados maternos adequados levando à remodelação postnascimento do estado epigenético do gene receptor glucocorticóide no hipocampo (GR) originando um epialelo hipometilado que persiste nos ratinhos após crescerem. Ratinhas mães que não dispensem estes cuidados maternos à sua prole originão nesta um epialelo alternativo GR silenciado. (vide adiante 4.6.3)

Os exemplos anteriores revelam que os epigenótipos respondem a factores físicos, nutricionais e mesmo comportamentais no seu meio envolvente, e embora estes exemplos não envolvam transmissão meiótica, há publicações recentes que assinalam que ratinhas gestantes tratadas com químicos que rompem o delicado sistema endócrino podem originar defeitos na fertilidade dos

machos das gerações subsequentes (F1 a F4) que se encontram correlacionados com alteração da metilação do DNA (Ref. 48, citada em Richards, 2006).

A propensão de “inputs” do meio envolvente originarem alelos epigenéticos alternativos, a estabilidade e propagação mitótica dos epialelos, a ausência ou incompleta erosão dos epialelos, e a transmissão meiótica, todos eles podendo recair naquilo que designamos por hereditariedade “soft” induzem o sentimento de que os epialelos modificados podem ser herdados (Richards, 2006).

Contudo, estas situações nos mamíferos ocorrem com pouca frequência o que provavelmente será consequência da erosão das marcas epigenéticas e da precoce separação das células germinativas das células somáticas o que assegura que as alterações epigenéticas nestas células somáticas não são transmitidas através das células germinativas (Richards, 2006).

No entanto formas pouco severas de hereditariedade Soft podem ser geradas em células germinativas por epialelos, desencadeados pelo meio envolvente.

2.3 – Hereditariedade de estados epigenéticos através das gerações

(Rakyan e Beck, 2006)

Em princípio, os epialelos não devem passar de uma geração para a geração seguinte, pois o genoma deve reprogramar as marcas epigenéticas desenvolvidas estocasticamente que interfiram com o estado totipotente indispensável para o desenvolvimento inicial do zigoto e embrião.

Com efeito, é sabido que nos mamíferos durante a gametogenese e após a fertilização do óvulo decorre uma reprogramação dos perfis epigenéticos respectivos.

Pode no entanto suceder que acidentalmente, epialelos não sejam reprogramados durante a gametogénese nos ascendentes e durante a embriogénese inicial gerada, e como tal, passarem e persistindo essas marcas epigenéticas nas células somáticas do ser resultante (ver figura 3 seguinte). A probabilidade de passagem do epialelo para a geração seguinte não é de 100% (no caso do alelo Δ vy se a mãe tem o alelo metilado, só cerca de 20% da descendência terá alelos Δ vy não metilados. (Ref.12-24 citadas em Rakyan e Beck, 2006), e por vezes o epialelo é reprogramado durante a gametogenese ou embriogénese.

A hereditariedade epigenética é menos estável que a hereditariedade baseada na sequência do DNA (genética), e como a hereditariedade epigenética é de natureza probabilística, os fenótipos com ela associados parecem pertencer àquela que se engloba na hereditariedade não Mendeliana como já referimos.

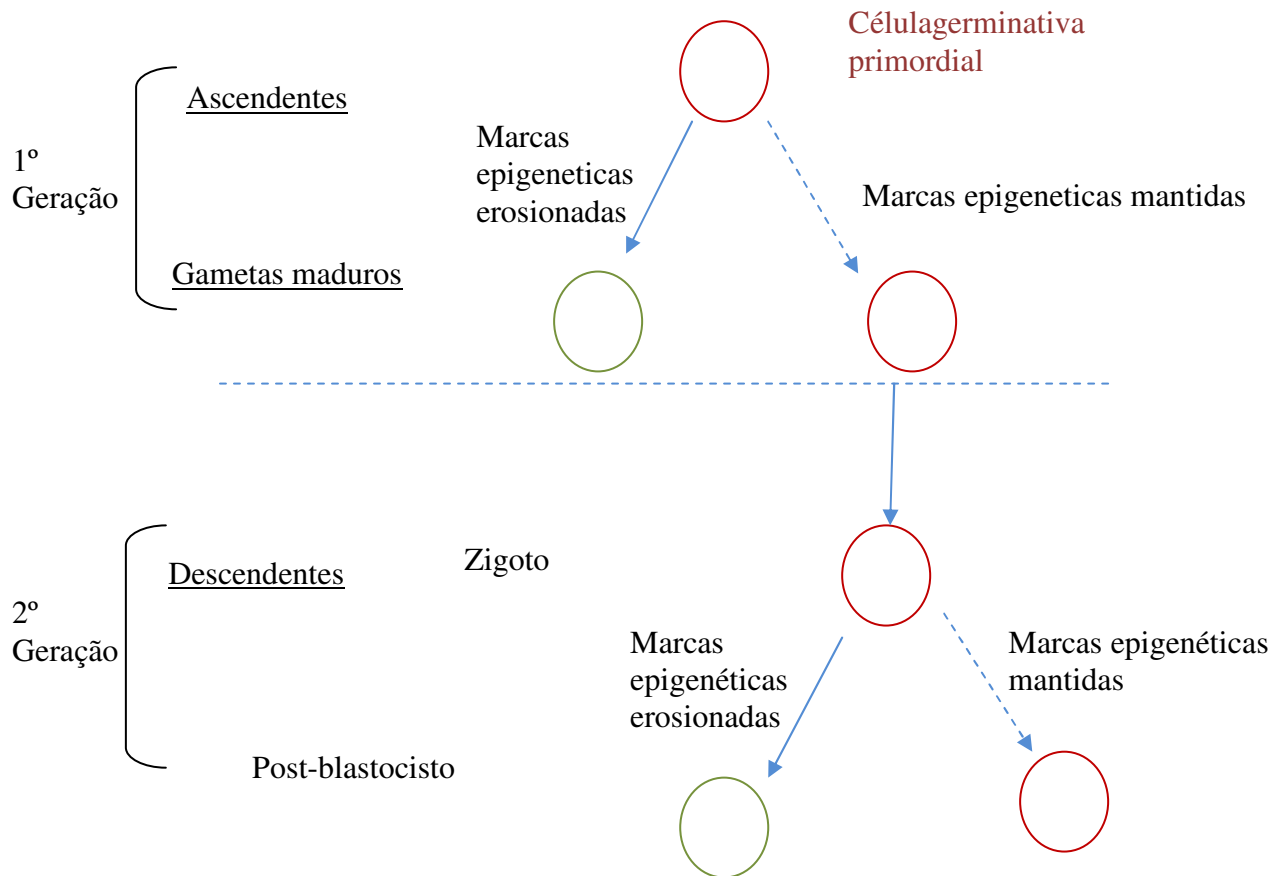
Admite-se que para que um estado epigenético seja transmitido à geração seguinte são provavelmente necessários, uma combinação de metilação do DNA, modificação das histonas, possivelmente substituição de protaminas nos espermatozóides e proteínas não conhecidas associadas com o DNA, sendo possível ainda o envolvimento de moléculas de RNA.

Por outro lado, muitos epialelos encontram-se associados com elementos repetitivos do DNA e como cerca de 40% dos genomas dos mamíferos são de elementos deste tipo repetitivo, o potencial para a formação de epialelos é enorme.

Contudo há epialelos também associados com sequências de cópia única.

Os epialelos são provavelmente produzidos ao longo de toda a vida de todos os animais desde as fases iniciais do seu desenvolvimento (mesmo antes da segregação das linhas germinativas) podendo não só condicionar o fenótipo de cada ser vivo mas passarem também à geração seguinte (Figura 3)..

Figura 3
 Modelo de Marcas Epi-
 genéticas Hereditáveis
 de Geração para Geração
 (adaptado Rakyan e Beck, 2006)



Legenda

A marca epigenética na célula germinativa primordial do ascendente pode ser erodida durante a reprogramação epigenética conduzida pelo genoma durante a gametogênese, e os gametas maduros resultantes não transportam esta marca genética. (○)

Ocasionalmente pode não suceder assim e a marca epigenética manter-se nos gametas maduros resultantes (○). Estas marcas epigenéticas são transmitidas à descendência (2ª geração), e durante a formação do blastocisto algumas marcas epigenéticas podem ser erodidas (○), ou, pelo contrário, subsistir influenciando o fenótipo desta descendência (○), sendo a erosão decorrente durante esta reprogramação muito mais provável que a manutenção das marcas epigenéticas.

2.4 – Autonomia das marcações epigenéticas

A transmissão meiótica dos diferentes estados epigenéticos depende da relação entre os estados epigenéticos e o contexto genotípico em que estão integrados, havendo que considerar três classes de variantes epigenéticas (Richards, 2006).

1ª A variante epigenética obrigatória

2ª A variante epigenética facilitada

3ª A variante epigenética pura

Na 1ª, na variante epigenética obrigatória, a variação epigenética está completamente dependente da variação genética, havendo uma correspondência estreita entre o epigenótipo e a variação genética. Os estados epigenéticos são pois determinados pelo genótipo, sendo portanto o epigenótipo um fenótipo obrigatório dos genótipos possíveis.

Na 2ª classe, na variante epigenética facilitada, o genótipo dirige ou potencia o epigenótipo de uma forma probabilística. O genótipo só por si não explica o fenótipo.

Na 3ª classe, na variante epigenética pura, há uma separação efectiva entre o epigenótipo e o genótipo, sendo a variação epigenética pura independente da variação genética e produzida por acontecimentos ao acaso que geram epialélos alternativos com baixa frequência e independentemente do genótipo.

Há diversos exemplos de cada uma das classes anteriores.

Assim, na variação epigenética obrigatória estão referidos alelos associados com transposões em que a presença do transposão está estreitamente associada com o silenciamento epigenético de uma sequência codificante próxima (Ref. 28 e 29. citadas em Richards, 2006).

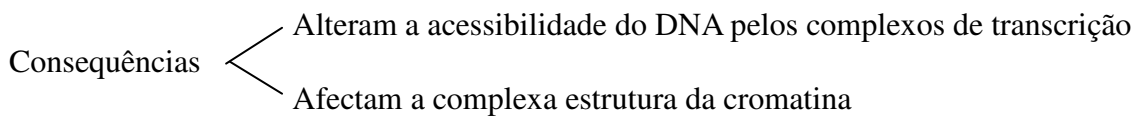
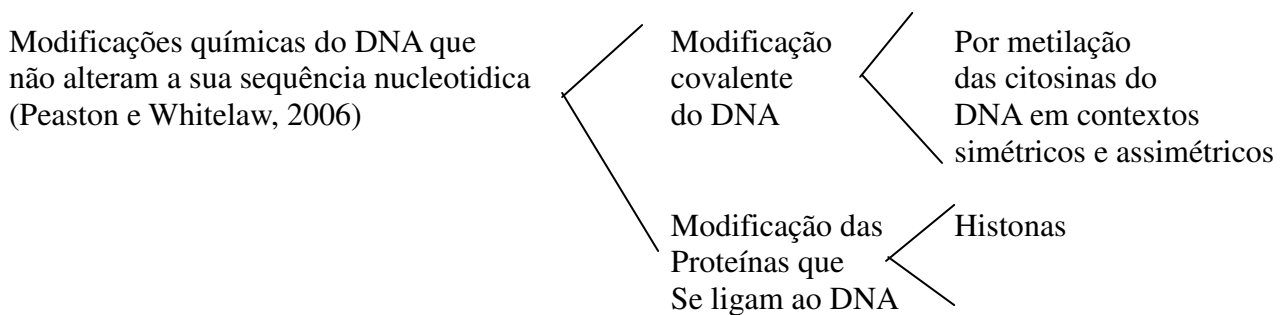
Na variação epigenética facilitada são exemplo os epialélos do ratinho Agouti amarelo viável (AVY) e Aiapy.

A variação genética na forma de um transposão (uma partícula A intracisternal (IAP) retroelemento) inserida acima da sequência codificadora Agouti origina a superexpressão do gene Agouti, dependendo do estado epigenético do elemento IAP.

Na ausência de transposão não há variação epigenética do locus Agouti.

Na 3ª classe, na variação epigenética pura desencadeada por acontecimentos ao acaso (stochastic), incluem-se erros ocasionais na propagação de estados genéticos silenciados após a replicação do DNA, como por exemplo: epigenótipos divergentes durante o envelhecimento de genes monozigotos humanos (Ref. 35 citada em Richards, 2006), ou a formação de epialelos aberrantes supressores de tumores frequentemente observados em cânceros em seres humanos (Ref. 36, citado em Richards, 2006), em consequência de uma redistribuição de metilação de citosinas.

2.5 – Resumo das modificações químicas do DNA que não alteram a sua sequência nucleotídica



Os estados epigenéticos ao nível dos loci cromossomais são reversíveis e mudanças do estado epigenético ocorrem regularmente durante o desenvolvimento das células à medida que ocorre a sua diferenciação, e dependem ainda da idade dos animais adultos (Ref. Bennett – Baker et. al., 2003, citados em Peaston e Whitelaw, 2006).

As modificações epigenéticas (epigenótipo) do DNA são mitoticamente hereditárias havendo também provas da sua transmissão transgeracional através da meiose.

No entanto a extensão em que o epigenótipo contribui para a variação do fenótipo é um assunto muito controverso, pois a reprogramação epigenética é fundamental nas primeiras fases da embriogénese dos mamíferos e a alteração da reprogramação epigenética normal tem graves implicações no desenvolvimento dos embriões (Ref. Li, 2002, citado em Peaston e Whitelaw, 2006).

3 – Diferentes mecanismos biológicos que interferem com a “maquinaria” epigenética

3.1 – Metilação do DNA

3.2 – Modificação das histonas

3.3 – Estrutura da cromatina, diversidade funcional das variante histonas e ocupação pelos nucleossomas

3.4 – Proteínas dos grupos Polycomb e Trithorax na regulação da expressão de genes

3.5 – nc RNA na regulação dos genes

3.1 – Metilação do DNA

A melhor conhecida marca epigenética refere-se à metilação do DNA. A metilação do DNA ou seja a adição covalente de um grupo metilo à posição 5 da citosina origina a metilcitosina que se encontra quase exclusivamente nos genomas mamíferos nos dinucleótidos Cp G e numa percentagem de 2 a 5% sobretudo nas regiões 5' reguladoras dos genes (Ref. 1, citada em Application note: applied Biosystems).

Os dinucleótidos Cp G nos genomas encontram-se ou formando “clusters” de grandes sequências repetidas, ou em curtas zonas do DNA ricas em Cp G formando neste caso ilhas Cp G.

A metilação do DNA é mantida pela metiltransferase DNMT 1 que reconhece especificamente o DNA semi-metilado e depois vai metilar a outra hélice do DNA.

A metilação do DNA interacciona com outras marcações ocorridas ao nível das histonas.

No entanto ocorrem mecanismos separados para a transmissão hereditária do DNA metilado e das histonas modificadas.

No caso da transmissão hereditária das histonas modificadas os nucleossomas, durante a replicação, não são distribuídos de uma forma semi-conservativa.

A metilação da citosina nos “locais” Cp G da sequência do DNA, sobretudo nas regiões ricas em Cp G constituindo as ilhas Cp G, está bem assinalada sobretudo nas regiões promotoras dos genes.

A ausência de metilação do DNA proporciona uma cromatina com estrutura aberta facilitadora do início da transcrição.

A metilação do DNA regula por seu lado a transcrição dos genes, inclusivamente silenciando genes repetitivos que parecem ser importantes para manter a estabilidade do genoma dos mamíferos.

A metilação do DNA através da 5 – metilcitosina, é uma modificação epigenética que regula a estrutura da cromatina, o “imprinting” genómico, a inactivação do cromossoma X, a transcrição, e o silenciamento de retrotransposições.

Esta metilação é efectuada por metiltransferases do DNA, e é depois lida e interpretada por proteínas que se ligam às metil-Cp G.

Com efeito, as DNA metiltransferases interaccionam por seu turno com outras proteínas que reprimem

a transcrição e modificam a estrutura da cromatina.

Nas metiltransferases são conhecidas as famílias DNMT 1, DNMT 2, e DNMT 3 e nas proteínas que se ligam às metil- Cp G são conhecidas as MeCP2, MBD 1, MBD2, MBD3, e MBD4.

Recorda-se no entanto que no DNA ocorrem ilhas de CpG metiladas e não metiladas.

Os estados metilados ou não metilados das ilhotas Cp G são copiados do DNA parental para o DNA filial e funcionam como uma memória celular. (Usnijima et. al., 2003).

Contudo o estado metilado ou não metilado das ilhotas CpG é herdado, sendo o estado metilado mantido quando da replicação do DNA através da acção de uma metilase ou seja uma metiltransferase I do DNA, localizada nas forquilhas da replicação e que metilam os locais CpG hemimetilados, em locais CpG completamente metilados (Ref. Hsu et. al., 1999 citados em Ushijima et. al., 2003).

O estado não metilado de uma ilhota CpG é herdado não sendo metilado quando da replicação do DNA ou em qualquer outra ocasião.

Os locais CpG não metilados geralmente aglomeram-se em cluster para formar ilhas (CGI) e a maioria destas CGI são mantidas não metiladas.

Contudo estão descritas situações em que ocorre metilação de CGI em regiões promotoras originando o silenciamento da transcrição dos genes que se situam abaixo (downstream) ao alterar as estruturas da cromatina e ao bloquear o início da transcrição.

Há um número limitado de ilhas CGI que podem ser normalmente metiladas.

Os locais CpG fora das ilhas CGI sobretudo aquelas em sequências repetitivas são normalmente metiladas (Ref. Bird, 2002, citados em Ushijima, 2003).

As ilhas CGI fora das regiões promotoras são mais frequentemente metiladas do que as que se encontram nas regiões promotoras. A metilação das CGI nas regiões promotoras leva quase sempre ao silenciamento da transcrição o que não sucede quando isso ocorre fora das regiões promotoras.

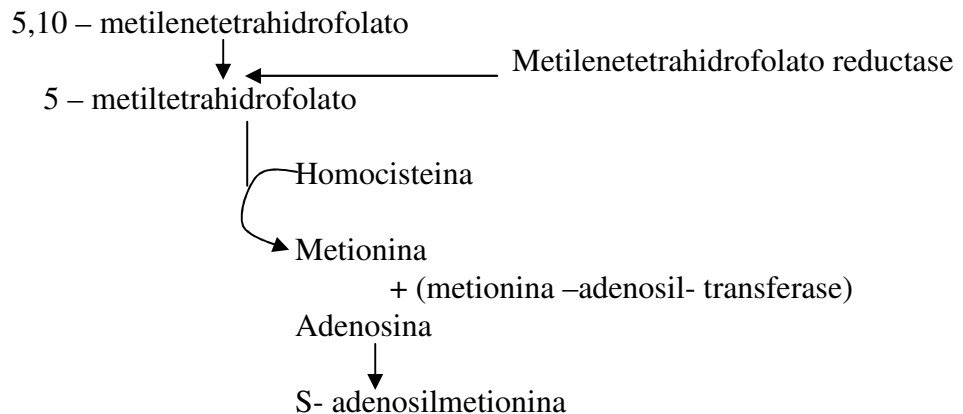
Em muitos genes, as respectivas regiões promotoras são ricas em CpG. e susceptíveis a metilação do DNA (Oommen, et. al., 2005),

Repete-se que a citosina destes dinucleótidos, através do seu carbono 5, é alvo da metilação por metiltransferases do DNA (DNMT), das quais se conhecem as DNMT1, DNMT2a, DNMT3b e DNMT3L.

Consoante os tecidos, e os tipos celulares cerca de 3 – 4% de todas as citosinas do DNA dos vertebrados encontram-se metiladas, e nos dinucleótidos CpG cerca de 70% das citosinas encontram-se metiladas.

A metilação das citosinas no DNA é uma característica hereditária, embora sejam conhecidos in vivo mecanismos para a remoção dessa metilação, quer através de sistemas enzimáticos adequados, quer através da replicação se porventura a metilação não é mantida durante esta etapa.

O dador para o DNMT de grupos metilo é a S-adenosilmetionina como se esquematiza seguidamente.



O folato, colina e metionina, são fontes de grupos metilo, enquanto as vitaminas B6, B12, riboflavina e zinco são coenzimas e cofactores do metabolismo dos grupos metilo.

O grupo metilo da metilcitosina acaba por se situar na ansa ou depressão maior (major groove) do DNA inibindo a transcrição e interferindo com as proteínas envolvidas nessa transcrição, acabando por afectar modificações nas histonas e a compactação da cromatina. (Dolinoy et. al., 2007)

A condensação da cromatina e a organização do núcleo sobretudo ao nível dos locais da heterocromatina constitutiva envolve a metilação do DNA, que compactando a estrutura da cromatina silencia a expressão dos genes nela contidos.

O impacto da metilação do DNA sobre a modificação das histonas nas células dos mamíferos não está bem estabelecido.

No entanto está assinalado que a ablação da DNA metiltransferase DNMT1 origina uma redução da metilação do DNA sobretudo em regiões com sequências repetitivas o que parece ser consequência da depleção de di (H3K9 me2) e trimetilação (H3K9 me3) nas histonas H3K9 e de um aumento da acetilação H3K9 (H3K9 ac;Ref. Espada et. al., 2004 citados em Gilbert et. al., 2007).

Cerca de metade de todos os genes têm ilhas CpG envolvendo o local do promotor e o local de início da transcrição (Strathdee et. al., 2008).

Normalmente, em todos os tecidos e independentemente do nível de expressão de cada gene associado, a maioria destas ilhas CpG associadas ao respectivo promotor não estão metiladas.

Para que ocorra o desenvolvimento normal desses tecidos com os respectivos figurinos de transcrição é necessário que se desenvolva um desenho apropriado de metilação desse DNA.

Tem sido observado em situações de cancro metilações aberrantes dessas ilhas CpG com o silenciamento dos genes que lhes correspondem.

3.2 – Modificação das histonas

(Spivakov e Fisher, 2007)

As moléculas das histonas, sobretudo nas suas extremidades aminadas podem sofrer diversas modificações tais como metilações, acetilações, fosforilações, ubiquitinações, sumoilações, citrulinações e ADP ribosilações, sendo alguns tipos dessas modificações covalentes reversíveis, como é o caso das acetilações das lisinas. No entanto outras modificações podem subsistir como é o caso da substituição das histonas por variantes alternativas dessas histonas.

As modificações das histonas estão correlacionadas com porções de cromatina activas, inactivas, ou em equilíbrio bivalente podendo pender para activação ou para inactivação.

Algumas modificações das histonas estão também correlacionadas, com determinados processos celulares, inclusive mitose, meiose e reparação do DNA.

Algumas modificações das histonas são susceptíveis de desencadear interacções com proteínas específicas como se refere seguidamente:

- A histona H3 com a lisina 9 metilada interactua com a proteína HP1
- A H3 com lisina 27 metilada interactua com a proteína PRC1
- As acetilações de vários ácidos aminados das histonas têm um papel sobre as estruturas tornando as histonas mais acessíveis a diversos factores de transcrição.

As modificações das histonas tendem a ser perdidas durante a duplicação dos cromossomas (Thon, 2008), tendendo as marcas nucleossomais a “diluírem-se” durante essa duplicação dos cromossomas, enquanto os nucleossomas formados de novo são depositados no DNA replicado de novo.

Algumas variantes das histonas, condicionam o assembly ou montagem dos nucleossomas e a hereditariedade epigenética (Henikoff et. al., 2004).

Diferentes variantes das histonas têm sido encontradas distinguindo estados alternativos da cromatina ao nível dos centromeros, ou associados com cromossomas X inactivos nos mamíferos ou em loci activos transcripcionalmente.

Durante a replicação as histonas velhas ou parentais são distribuídas um tanto ao acaso entre as moléculas de DNA e os espaços vazios são preenchidos com histonas recém sintetizadas não modificadas, o que leva a uma diluição das marcações nas cromatinas.

No entanto, tem sido sugerido que as marcações na cromatina de novo sintetizada podem ser restabelecidas como nas velhas através do recrutamento de modificadores adequados para esses locais a reconstruir.

A manutenção das modificações ocorridas nas histonas, após a replicação de cada molécula de DNA, é ainda mal conhecida (Feng et. al., 2006), embora se saiba que certas estruturas cromatínicas silenciadas se transmitem através das divisões celulares ocorridas na ausência de um sinal responsável por isso (Ref. 15 e 10, citado em Feng et. al., 2006).

A metilação do DNA propaga-se epigeneticamente ocorrendo nos mamíferos nas citosinas dos

deoxinucleótidos, inibindo a transcrição por duas vias, ou evitando a ligação de factores de transcrição a esse DNA e / ou então interagindo com proteínas específicas que por seu turno recrutam factores que modificam as histonas e remodelam a cromatina.

Também as actividades de pequenos RNA interferentes (siRNAs) têm propriedades epigenéticas e constituem um outro regulador epigenético além da metilação do DNA e modificações das histonas que referimos anteriormente.

Todas estas marcas epigenéticas são propagadas (copiadas) na fase S do ciclo celular, podendo essa informação epigenética ser transmitida através da série de divisões celulares.

Com efeito apesar da quasi totalidade das células somáticas de animais possuírem idêntica informação genética, os perfis de expressão desses genes difere consoante o tipo celular sendo esses perfis determinados pela informação epigenética residente na cromatina sobretudo através das histonas modificadas e suas variantes e de diversos factores tais como as proteínas HP1 e proteínas do grupo Polycomb que organizam a cromatina em estruturas de ordem superior (Nakatani et. al., 2006).

Em cada região heterocromática diferentes combinações de diversos factores atraem para essas regiões sistemas enzimáticos com capacidade para modificar as histonas. Um desses factores que actua na região centromérica dos cromossomas é o RNA i (Thon, 2008).

Como temos vindo a referir as histonas são passíveis de diversas modificações covalentes após a sua tradução participando por essa forma na regulação de transcrição.

Os domínios da cromatina activa e inactiva podem ser caracterizados pela presença de modificações específicas das histonas ocorridas após a sua tradução.

As principais modificações em alguns ácidos aminados das histonas referem-se seguidamente.

- Metilações nas argininas (R) ou lisinas (K)
- Fosfatações nas serinas e lisinas
- Acetilação das lisinas
- Sumoilações e ubiquitinações das lisinas e ADP ribosilação

As histonas podem ser metiladas nas argininas ou lisinas, fosforiladas nas serinas e lisinas, acetiladas nas lisinas, sumoiladas e ubiquilinas nas lisinas e ADP- ribosiladas.

O número de grupos metilo adicionada a cada lisina ou arginina pode variar.

As lisinas podem ser mono -, di – ou trimetiladas, as argininas podem ser monometiladas e, simetricamente ou assimetricamente dimetiladas, e conseqüentemente influenciar diferentemente o estado de transcrição (Ref. Schneider, et. al., 2004, citados em Schneider e Grosschedl, 2007).

Todas estas modificações covalentes das histonas condicionam a estrutura da cromatina, que pode depois ser lida por diferentes proteínas em consonância com as modificações operadas, constituindo aquilo que alguns autores denominam o “código das histonas”.

A acetilação das histonas é reversível com a intervenção de enzimas adequadas, mas a metilação das lisinas é muito estável, embora recentemente tenha sido assinalada a existência de desmetilases da lisina (Ref. Shi, et. al., 2004 citados em Schneider e Grosschedl, 2007).

A cromatina activa é geralmente rica em histonas acetiladas H3, H4, H2A, e histona H3 na lisina 4 (H3/K4).

H3/K4 di e trimetilada e H3 acetilada estão correlacionadas com cromatina aberta (The Encode Project Consortium, 2007).

A Cromatina inactiva é geralmente caracterizada por uma hipoacetilação e metilação da histona H3 Lisina 9(H3/K9).

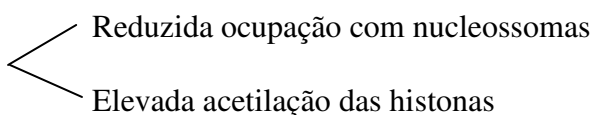
Esta metilação H3/K9 parece ser uma marca característica da heterocromatina e é reconhecida esta “marca” pela HP1 (heterocromatina protein 1) uma componente estrutural da cromatina condensada e com a qual interactua tal como com a enzima que metila H3/K9 o que vai permitir que a heterocromatina se expanda ao longo de grandes regiões cromossomais até que surja um impedimento por um elemento adequado do cromossoma.

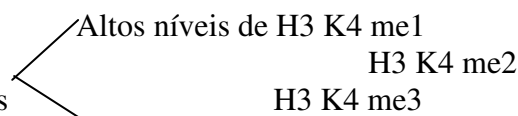
Detalhando um pouco mais refere-se que as regiões da cromatina activamente transcritas são ricas em H3/K4 mono-, di- ou trimetilada, em H3/K36 trimetilada e H3/K9, H3/K27 e H4/K20 monometiladas, sendo a distribuição destas marcas ao longo das regiões dos genes transcritos, desigual, com a extremidade 5’ deste enriquecida em H3/K4 trimetilada enquanto a extremidade 3’ é rica em H3/K36 metilada.

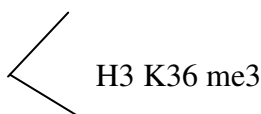
A repressão da transcrição revela as marcas H3/K9, H3/K27 e H3/K79 trimetiladas.

Os promotores activos e enhancers estão associados com H3/K4 metiladas e H3/K9 monometiladas. No caso dos promotores activos podem estar ligados com a presença de outras marcas como por ex H3/K36 metiladas, a juzante da região transcrita do gene (ver Quadros 1 , 2, 2 A e 3).

Quadro 1
-Algumas características das histonas de certas regiões dos genomas
(Barski et. al., 2007)

Regiões promotoras de genes activos 

Locais em redor do local do início da transcrição de genes estruturais activos 

Extremidades 3’ dos genes estruturais 

Repressão de genes 

Enhancers funcionais $\left\{ \begin{array}{l} \text{H3 acetilação} \\ \text{H3 K4 me 1} \end{array} \right.$

Em domínios genómicos bivalentes podem encontrar-se marcas opostas como $\left\{ \begin{array}{l} \text{H3 K4 me3} \\ \text{H3 K27 me3} \end{array} \right.$

Formação de heterocromatina e silenciamento dos genes $\left\langle \text{H3 K9 metilação} \right.$

Quadro2

- Desenho das modificações por metilação das histonas em diversas situações.
As histonas sobretudo nas suas caudas N-terminais são sujeitas a diversas modificações após a sua tradução. (Barki et. al., 2007)

- Na activação de genes

Monometilação das $\left\{ \begin{array}{l} \text{H3 K27} \\ \text{H3 K9} \\ \text{H4 K20} \\ \text{H3 K79} \\ \text{H2B K9} \end{array} \right.$

- Na repressão dos genes

Trimetilação $\left\{ \begin{array}{l} \text{H3 K27} \\ \text{H3 K9} \\ \text{H3 K79} \end{array} \right.$

- Relacionadas com elementos reguladores funcionais

H2A. 2

- Marcas nas fronteiras dos domínios de histonas metiladas

CTCF

- Os desenhos das bandas dos cromossomas

Estão correlacionados com modificações únicas das histonas

- As cisões nos cromossomas

Residem normalmente em regiões de cromatina associadas com metilação das H3 K4

Ao contrário da acetilação das histonas, a metilação das lisinas é muito estável, embora em 2004 (Shi et. al., citados em Schneider e Grosschedl, 2007), tenham descoberto a existência de desmetilases.

Quadro 2 A

<u>Cromatina activa</u>	— rica em	H3 H4 H2A H3 metilado na lisina 4 (H3/K4)	acetiladas
<u>Cromatina aberta</u>		H3/K4 di – e trimetilada H3 acetilada	
<u>Cromatina inactiva</u>		Hipoacetilação de histonas Metilação da H3 Lys 9 (H3 /K9)	

Quadro3 (No final do texto)

3.2.1 – Biotinilação das histonas

(Oommen et. al., 2005)

Nas histonas há que considerar um domínio C- terminal globular e uma cauda N- terminal flexível, projectando-se esta última a partir da superfície dos nucleossomas, encontrando-se nessa cauda N-terminal flexível, lisinas, argininas, serinas e glutamatos passíveis de após a sua respectiva tradução ser acetilados, metilados, fosfatados, ubiquitinados, poli (ADP-ribosilados), sumoilados e biotinilados.

Esta última modificação das histonas a biotinilação ocorre nos resíduos lisina (K) estando identificados em histonas humanas biotinilação em K9 e K13 nas histonas H2A, K4, K9 e K18 em histonas H3 e K8 e K12 em histonas H 4.

Esta biotinilação é feita pela biotinidase (Ref. 9 citada em Oommen et. al., 2005) e holocarboxilase sintetase (Ref.10 citada em Oommen,2005) contribuindo para o silenciamento de genes, proliferação celular e reparação do DNA ou apoptose (Ref. 11 citada em Oommen, 2005).

Cisões na última cadeia de DNA diminuem a biotinilação das histonas (Ref. 12 citada em Oommen et. al., 2005). A formação de dímeros de timina no DNA aumenta a biotinilação das histonas (Ref. 13 – citada em Oommen, 2005).

3.2.2 – Poli (ADP-ribosilação) das histonas

(Oommen, 2005)

Na reparação do DNA e na apoptose a modificação covalente de proteínas que se ligam ao DNA

tem um papel muito importante.

Para reparação das cisões das duplas cadeias de DNA, uma Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) liga-se com esse DNA próximo dos locais onde este foi quebrado, o que desencadeia a activação dessa polimerase, que vai promover a ligação covalente de cadeias lineares e ramificadas de poli (ADP – ribose) sobre a própria polimerase e sobre outras proteínas com que interacciona (Ref. 14, citada em Oommen, 2005), como pode ser o caso de histonas H2A e H2B.

As cadeias de Poli (ADP-ribose) podem conter mais de 200 resíduos de ADP-ribose (Ref. 14 citada em Oommen, 2005).

Esta ribosilação das proteínas pode ser reversível por ex: pela poli (ADP-ribose) glicohidrolase (Ref. 14 idem) sendo a semi-vida das poli (ADP-ribose) em resposta a alterações do DNA de menos de 1 minuto (Ref. 16 citada em Oommen, 2005).

A enzima PARP é importante para a reparação do DNA, recombinação, apoptose e estabilidade genómica (Ref. 14, 16 citadas em Oommen, 2005).

Esta enzima utiliza NAD para produzir as cadeias de Poli (ADP-ribose) sendo esse NAD nos mamíferos biosintetizado a partir da niacina ou do triptofano (Ref. 17 e 18, citadas em Oommen, 2005).

3.3 – Estrutura da cromatina , diversidade funcional das variantes de histonas e ocupação pelos nucleossomas

(Pusarla e Bhargava, 2005)

Domínios de cromatina compacta podem encontrar-se em alguns locais da heterocromatina (C-bandas) e na eucromatina (G-bandas).

A cromatina aberta normalmente é rica em regiões de genes, mas alguns desses genes podem ser inactivos. (Gilbert et al., 2004).

Nas fibras de cromatina compacta em regiões de baixa densidade em genes podem no entanto encontrar-se genes activos.

As macromoléculas citoplásmicas encontram-se estabilizadas electrostaticamente pelas suas atmosferas iónicas e estes gradientes electroquímicos são muito variáveis, de local para local, e influenciados pelos fluxos de iões através do citoplasma desencadeados pelas reacções celulares bioquímicas e pelos estímulos extracelulares (Spitzer e Poolman, 2005). É bem provável que o mesmo suceda no interior dos nucleos das células eucariotas

Com baixas concentrações de sais os conjuntos de nucleossomas podem formar fibras de 10nm que sofrem uma modificação para 30nm se se aumentar a concentração de sais.

Estes conjuntos de situações influenciam notavelmente o funcionamento do DNA.

Os três mecanismos reconhecidos como modificadores da estrutura cromatina, são os mecanismos remodeladores da cromatina e dependentes de ATP, a modificação covalente das histonas e a incorporação de variantes das histonas.

As variantes das histonas (com consequências diferentes), interferem em diversos processos metabólicos do DNA, tais como a transcrição, a replicação e a reparação do DNA.

As variantes das histonas mais estudadas são a H3.1, H3.2, H3.3, CenH3s, H2A.2, ganna H2.A,

Macro H2A, H2A.Bbd, variante H1, e variantes específicas do testis.

Quadro 4- Variantes das chamadas histonas canónicas

Histona	Variante nos mamíferos	Função associada
H3	H3.1	Subtipos da fase S
	H3.2	do ciclo celular
	H3.3	Regiões activas para transcrição
	Cenp – A	Nucleossomas centroméricos
H2A	H2A-2	Diversas funções: Manutenção da heterocromatina pericent e telomérica, activação da transcrição e viabilidade.
	H2A.X	“sex body” nos mamíferos. Local de cisão da dupla hélice de DNA. Condensação e silenciamento de cromossomas do sexo masculino.
	Macro H2A	Inactivação do cromossoma X, interfere com o factor de transcrição que se liga, e com o remodelante SWI/ SNF.
	H2A. Bbd	Espaço fechado dos nucleossomas

Mudanças mínimas na sequência primária das histonas conservadas são decisivas para a regulação da estrutura da cromatina e para a expressão dos genes.

Também as variantes das histonas estão implicadas na demarcação das regiões funcionais da cromatina como se refere no quadro 4 anterior (Pusarla e Bhargava, 2005).

Estão referidas diversas variantes das chamadas histonas canónicas que referimos no quadro 4 anterior.

Não são conhecidas variantes da H4, sendo no entanto conhecidas algumas variantes da H2B e H1 que desempenham papéis importantes na espermatogénese.

As variantes das histonas H3 A e H2 A não são formas não alélicas das principais histonas, sendo codificadas (em genes localizados fora do cluster de genes canónicos das histonas) como simples cópias e com intrões ao contrário dos genes canónicos das histonas.

3.4 – Proteínas dos grupos Polycomb e Trithorax na regulação da expressão de genes

(Schuettengruber et. al. 2007)

As proteínas do grupo Polycomb (PcG) e do grupo Trithorax (trxG) são reguladores críticos de numerosos genes envolvidos no desenvolvimento dos animais, no controlo do ciclo celular, na polimerização da actina, na senescência celular, na inactivação do cromossoma X, no imprinting genómico e na hematopoiese (ref. 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50 citadas em Rajasekhar e Begemann, 2007).

Estas proteínas PcG e trxG silenciam ou activam a expressão de diversos genes quando interactuam com regiões específicas do DNA e dirigem a modificação post tradução das histonas.

As proteínas PcG regulam, ao nível dos genes alvo a organização nuclear e o silenciamento da expressão de genes por essas proteínas, envolvendo também nc RNA e RNA i.

Os elementos de DNA que respondem às proteínas PcG e TrxG ou sejam os elementos PRE e TRE respectivamente, medeiam a transmissão epigenética hereditária de estados da cromatina activados ou reprimidos ao longo do desenvolvimento.

As proteínas PcG e trxG estão implicadas como já referimos na proliferação celular, identificação de células estaminais e cancros, imprinting genómico e inactivação do cromossoma X.

Algumas destas proteínas PcG e trxG têm actividade de metiltransferases actuando sobre lisinas nas histonas H3, enquanto outras proteínas PcG e trxG interpretam estas marcações sobre as histonas.

As proteínas PcG e trxG formam diferentes classes de complexos para alvejar os alvos cromatínicos, com características diversas consoante os tipos de complexos formados.

Os complexos repressivos proteicos Polycomb (PcG) são compostos por dois outros complexos múltimeros distintos o PCR1 e PCR2.

No complexo PCR1 existem diferentes subunidades tais como as BM1/MEL18, e outras; no complexo PCR2 as subunidades E2H2, SUZ12 e Eed.

Os componentes destes complexos PCR1 e PCR2 contêm actividades modificadoras das histonas como por exemplo a ubiquitinação da lisina 119 da histona H2A (H2A K119 ub), e a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3 K27 me3). Mais, a PRC2 também activa a lisina 26 da histona H1.

Em geral a repressão da transcrição pelas PcG é iniciada pela PRC2 que inibe o início da transcrição, enquanto a PRC1 mantém estas condições repressivas (vide figura 4 seguinte).

Figura 4 (Ver no final do Texto)

Legenda:

A interacção inicial de alguns factores com o DNA facilita o recrutamento do complexo PRC2 que com a sua subunidade E2H2 forma uma trimetilação na H3 K27 (H3K27 me 3) que serve como um sinal para o recrutamento do complexo PRC1. Este por seu turno interactua com outros factores que se ligam ao DNA e PRC2.

Assim a monoubiquitinação da H2A é realizada pela subunidade RING da PRC1.

A PRC2 e PRC1 induzem a compactação da cromatina, a primeira iniciando a repressão da transcrição e a segunda mantendo-a.

Como perduram as memórias celulares de célula para célula em gerações sucessivas é por hora um mistério.

Assim não se conhece, por exemplo, como as memórias devidas às proteínas PcG e Tr x G (que trabalham para manter reprimidas ou activadas as transcrições de genes importantes no desenvolvimento) sobrevivem nas células, à replicação do DNA e à mitose.

O facto de se saber que proteínas do grupo PcG e Tr x G possuem actividades enzimáticas, metilando ou ubiquinando histonas específicas, parece levar a aceitar que provavelmente as marcas epigenéticas propagam a memória transcriptional de geração em geração celular, o que constitui hoje quasi um dogma, havendo estudos que indicam que também RNA não codificante entram neste jogo da memoria transcriptional (Ringrose e Paro, 2007).

Como temos vindo a referir ao longo do desenvolvimento dos seres vivos multicelulares, as diferentes células e tecidos adquirem diferentes programas de expressão dos genes, cada tipo de célula com a sua própria assinatura epigenética.

Para a maioria dos tipos celulares, estas marcas epigenéticas mantêm-se fixadas uma vez diferenciadas essas células ou quando saiem do seu ciclo celular.

Contudo durante o desenvolvimento normal ou em situações patológicas, algumas células podem ser reprogramadas através da remoção no núcleo de marcas epigenéticas e sua substituição por outros tipos de marcas epigenéticas.

Estas proteínas Polycomb e Trithorax são reguladores epigenéticos importantes na regulação dos genes homeóticos importantes nos primeiros desenvolvimentos embrionários (eixo anterior - posterior e identidade de segmentos, (H Ref. Homeotic gene- Wikipedia) e na diferenciação celular controlando centenas de factores de transcrição e proteínas sinalizantes e morfogénios.

As proteínas Polycomb (PcG) são pois silenciadoras através da modificação das histonas sendo contrabalançadas pelas proteínas Trithorax com uma acção antagónica.

Talvez como referimos as proteínas PcG são recrutadas para a cromatina através de sequências de DNA (elementos de resposta polycomb ou PRE) que se encontram na vizinhança dos genes alvo PcG.

3.5 – nc RNA na regulação dos genes

Um grande número de ncRNA são transcritos nas células eucariotas estando envolvidos na proliferação, diferenciação e desenvolvimento, funcionando como reguladores da expressão dos genes a diversos níveis, inclusive na modificação da cromatina, na transcrição, na modificação do

RNA, splicing, estabilidade e tradução.

Ambos os siRNA e miRNA regulam a expressão dos genes, através da interferência (Correia e Correia, REDVET).

Moléculas de RNA como sinais reguladores de célula para célula nos animais?
(Dinger et. al., 2008)

Há sugestões baseadas em diversas evidências (Dinger et. al. 2008) de que moléculas de RNA podem funcionar como moléculas sinalizantes extracelulares que complementarizam as sinalizações endócrinas e parácrinas desencadeadas por pequenas moléculas e proteínas.

Admite-se que essas moléculas de RNA poderão ter um papel central na ontogenia multicelular na homeostase e na memória épigenética transmitida (Dinger et. al. 2008).

“Contudo não há por ora evidência directa de que RNA sistémico sinalizante ocorra nos mamíferos nem que redes de RNA extracelular sinalizante participem nos processos fisiológicos normais”(Dinger et. al. 2008).

Além do modelo de sinalização intracelular atribuído às moléculas de RNA admite-se que também elas sejam sinalizantes extracelulares utilizando infraestruturas genéricas para o seu transporte envolvendo receptores de superfície celular e vesículas transportadoras que podem transmitir diferentes moléculas de RNA independentemente da sua sequência precisa (Dinger et. al. 2008).

Seriam assim transmitidas uma soma de RNA sinais para outras células (vide Figura 5).

Há evidências de que moléculas de RNA podem funcionar como sinais extracelulares nas plantas e também nos animais. Moléculas de RNA extracelular encontram-se e circulam no sistema vascular dos mamíferos (Ref. Tsang e Le 2007, citados em Dinger et. al., 2008) e mRNA fetal tem sido encontrado no sangue de mulheres grávidas (Ref. Lo, 2005, citados em Dinger et. al. 2008). Haveria pois uma sinalização por RNA, sistémica, nos animais.

No transporte de RNA através das membranas celulares é conhecido que a membrana fosfolipídica nas células eucariotas é uma forte barreira à difusão passiva de ácidos nucleicos, o que implica a necessidade de vias para a importação do RNA a partir de outras células e do meio extracelular.

È conhecido que moléculas de RNA penetram em células mamíferas em cultura, por processos naturais, inclusive por contacto directo célula a célula, através de receptores membranários e canais (Ref. Valiunas et. Al. , 2005 citados em Dinger et. al. 2008).

As moléculas de ncRNA regulam a arquitectura da cromatina (Ref. Rinn et. al. 2007, Dinger et. al. 2008). O tráfego extracelular dessas moléculas de ncRNA podem transmitir modificações epigenéticas hereditáveis, para células recipientes, e estes sinais extracelulares podem eles próprios ser potencialmente herdados através das gerações, quer nas plantas quer nos animais (Dinger et. al. 2008).

O RNA sinalizante pode também ser envolvido nas linhas de células germinativas.

O transporte de RNA pode ser mediado por vesículas pois o RNA é labil no sistema circulatório dos mamíferos, tal como se comprova com a rápida degradação do RNA exógeno no sangue.

No entanto há formas de RNA endógeno em circulação que parecem estáveis e protegidas da

degradação durante este transporte sistémico (Ref. Tsui et. al. 2002, in Dinger et. al. 2008), havendo sugestões de que o RNA está associado e protegido por lípidos e/ou proteínas quando se encontra na circulação sistémica.

Há formação de microvesículas que são fragmentos esféricos da plasma membrana que são emitidos por uma grande gama de células (Ref. Fevrier e Raposo, 2004, in Dinger et. al. 2008) que podem conter RNA e estar envolvidas em comunicações de célula com célula (Ref. Baj-Kraywazeka et. al. 2006 citados em Dinger et. al. 2008).

Na resposta do sistema imunitário ao RNA, sabe-se que RNA sintético não modificado é imunostimulador, mas o RNA hospedeiro natural já não o é.

Figura 5 (Ver no final do texto)

Modelo esquemático de vias de sinalização extracelular desencadeando mRNA e ncRNA, siRNA e miRNA

(adaptado de Dinger et. al. 2008)

4 –Alguns exemplos da regulação epigenética e seu impacto nos animais.

4.1-Introdução

O estudo da epigenética procura compreender a regulação genética hereditável (mitótica e meioticamente) não directamente codificada na sequência do DNA genómico (Bock et Lengauer, 2008).

A domesticação dos animais, a exploração de determinadas vocações em certas espécies e/ou raças de animais, bem como a diferenciação celular, e a génese de tecidos e órgãos parecem partilhar aspectos comuns que podem ser catalogados dentro da epigénese.

Isto qualquer que seja a espécie animal considerada.

Com efeito em cada indivíduo de uma dada espécie animal a quasi totalidade das células que o compõem possui um genoma idêntico no que se refere à sua sequência nucleotídica.

Deixamos de lado aqueles casos especiais de algumas células em que pode não existir núcleo celular, ou em que a sequência nucleotídica é desenhada com certas particularidades como sucede por exemplo nas células envolvidas nas imunidades.

Também deixamos de lado o DNA mitocondrial sobretudo envolvido na cadeia respiratória que representa uma ínfima parte do genoma total celular, embora saibamos que os diversos segmentos de DNA de cada uma das mitocôndrias dentro de uma célula são susceptíveis de variados tipos de mutação com consequências fisiológicas e até patológicas hoje já conhecidas.

Na franca maioria das células que compõem um dado indivíduo, apesar do genoma na sua sequência nucleotídica ser praticamente idêntico em todas elas, as suas origens, determinismos, vocações e fenótipos podem ser completamente distintos.

Estas últimas características filiam-se sobretudo numa diferente distribuição, ou partilha de nutrientes quando das respectivas divisões celulares assimétricas e simétricas, e ainda numa multiplicidade de factores físicos, químicos e biológicos, provenientes do seu meio envolvente que interagem com essas populações celulares desencadeando nelas diversíssimas expressões fenotípicas em consequência de se estabelecerem diversos desenhos epigenéticos que se sobrepoem e regulam todos os genomas celulares.

Esses desenhos epigenéticos correspondem a modificações bioquímicas resultantes dos factores envolventes antes referidos, sendo bem conhecidas as metilações do DNA, as modificações covalentes post-tradução das histonas, dos nucleossomas, a introdução de variantes das histonas e ainda os nc RNA como por ex: os microRNA de interferência.

Estas modificações pontuais imprimidas aos genomas podem ser da ordem dos milhares, e o consequente desenho fenotípico resultante no indivíduo em que se operou é específico desse indivíduo.

Este desenho epigenético na franca maioria das vezes é reversível (havendo portanto sistemas enzimáticos ou outros meios que promovem esses efeitos reversíveis), havendo no entanto situações em que se desencadeia uma situação irreversível.

As células envolvidas nestas situações podem transmitir através da mitose o respectivo desenho epigenético, ou parte dele, mas no que se refere à meiose estas situações são muito mais complexas, embora na literatura científica vão abundando os casos em que isso parece suceder no reino animal.

Acontece portanto que parece ser o epigenoma o responsável pela regulação da expressão fenotípica do genoma dos animais e daí as particularidades fenotípicas de cada animal.

Rakyan, e Beck (2006) referem que uma das mais excitantes observações no campo da epigenética em tempos recentes foi a descoberta da variação epigenética de indivíduo para indivíduo, podendo em certos casos estas variações epigenéticas ser herdadas pela descendência, hereditariedade biológica esta não baseada no DNA.

Veremos adiante com maior detalhe alguns exemplos da forma como pode operar o desenho epigenómico nos animais em situação de:

1 – Diferenciação celular no desenvolvimento dos mamíferos

- 2 – Gênese de tecidos e órgãos
- 3 – Exploração e potenciação de determinadas vocações (em ratinhos)
- 4 – Domesticação dos animais (em galinhas)

Pode afirmar-se que a regulação epigenética desenha o desenvolvimento e fisiologia normal e patológica dos mamíferos (Wagner et. al., 2008).

As características fenotípicas são pois determinadas não só por mutações genéticas e recombinações mas também pela epigenética.

Na epigenética, reafirma-se, ocorrem alterações hereditáveis da expressão dos genes sem que a sequência do DNA se tenha modificado (Dolinoy et. al. 2007).

Há uma série de acontecimentos epigenéticos, dependentes do meio nutritivo em que se situa esse material genético, havendo ainda uma série de factores físicos e químicos que podem alterar a expressão dos genes e afectar o seu fenótipo.

Essas alterações epigenéticas hereditáveis podem ter sede ao nível da dobragem e compactação da cromatina e sua interacção com a matrix nuclear, “empacotamento” do DNA à volta dos nucleossomas, nas modificações das histonas e na metilação do DNA, constituindo o seu desenho no seu conjunto, o que se designa por epigenoma.

O epigenoma é mais sensível a modificações durante as etapas da gestação, de desenvolvimento neonatal, puberdade e idades avançadas.

Alelos de indivíduos geneticamente idênticos mas que se exprimem de uma forma diferente, são denominados epialelos metastáveis, o que é devido a modificações epigenéticas estabelecidas durante as primeiras etapas do desenvolvimento, etapas em que este desenvolvimento é particularmente sensível às influências de todo o meio envolvente.

O termo metastável refere a natureza lábil do estado epigenético destes alelos, e o termo epialelo define o seu potencial para manter as marcas epigenéticas através das gerações.

As modificações epigenéticas podem pois ser herdadas não só mitoticamente mas também através das gerações (Ref. 3, 4, 10, citadas em Dolinoy et. al. 2007).

Há três alvos epigenéticos potenciais susceptíveis de ser influenciados por todo o seu meio envolvente e que são: (Dolinoy et. al. 2007)

- Os elementos transposáveis
- As regiões promotoras dos genes “housekeeping”
- E os elementos reguladores cis-actantes dos genes imprinting.

As marcas epigenéticas, inclusive a metilação do CpG são geralmente estáveis nas células somáticas, havendo no entanto durante os períodos de desenvolvimento dos mamíferos, períodos em que ocorre uma extensa reprogramação do epigenoma, e que são a gametogénese, a fertilização e o início da pré-implantação dos embriões (Dolinoy et. al. 2007).

Após a fertilização, os genomas herdados dos espermatozoides e dos oocitos sofrem uma erosão da maioria da metilação ocorrida sobre o DNA, ocorrendo depois durante ou após a gastrulação uma metilação “de novo” com um desenho específico consoante a linhagem celular (Allegrucci et. al., 2005).

É possível que as modificações epigenéticas sejam não só mitoticamente hereditáveis, mas também hereditáveis através das gerações devido a uma deficiente erosão das marcas epigenéticas durante a gametogénese.

4.2 – Reprogramação epigenética nos mamíferos

(Dolinoy et. al., 2007)

As marcações epigenéticas, inclusive a metilação do DNA, são geralmente estáveis nas células somáticas, havendo no entanto uma extensa reprogramação de epigenomas durante a gametogénese e a pré-implantação dos embriões.

Na gametogénese ocorre uma ampla desmetilação do genoma durante a formação das células germinativas primordiais havendo depois uma remetilação diferente das células germinativas femininas e masculinas. Estes ciclos de desmetilação remetilação envolvem uma erosão prévia dos imprinting parentais e depois um restabelecimento desses imprinting específicos de cada sexo.

Na fertilização ambos os genomas parentais sofrem modificações epigenéticas, o genoma paterno com uma só cópia permuta protaminas por histonas e sofre uma activa desmetilação antes da replicação do DNA (Ref. 48 citada em Dolinoy et. al. 2007).

O genoma materno com duas cópias é parado na metáfase II, completa a meiose, e sofre uma desmetilação passiva após diversas divisões (Ref.47 citada em Dolinoy et. al. 2007), restaurando a sua totipotência.

Contudo nesta reprogramação epigenética na fertilização são protegidas da desmetilação as sequências de DNA que regulam a expressão monoalélica dos genes imprinting, as sequências repetidas tais como IAP, e a heterocromatina próxima dos centrómeros dos cromossomas (Ref. 10, 46, 49, citadas em Dolinoy et. al. 2007).

A metilação de novo de ambos os genomas parentais ocorre quando da implantação.

Assinala-se ainda que alguns loci genómicos escapam de todo ou em parte a esta reprogramação epigenética durante o desenvolvimento in útero (Dolinoy et. al. 2007).

Como já referimos as modificações epigenéticas são não só hereditáveis mitoticamente, mas admite-se que também o sejam de geração em geração dada a insuficiente erosão das marcas epigenéticas durante a gametogénese.

É conhecido hoje que influências do meio envolvente que podem afectar uma geração, podem condicionar o fenótipo de gerações subsequentes: Estes efeitos não têm uma transmissão Mendeliana mas sim uma transmissão epigenética sendo os mecanismos envolvidos nesta transmissão epigenética a metilação do DNA, a modificação das histonas da cromatina e processos mediados por pequenos nc RNA.

A forma como esta memória epigenética pode ser transmitida através das gerações não está bem esclarecida (Dinger et. al., 2008).

O epigenoma é particularmente susceptível a ser desregulado durante a gestação, desenvolvimento

neonatal, puberdade e velhice.

Há alelos dos mamíferos que exprimem características variáveis (epialelos) apesar de não evidenciarem heterogeneidade genética, sendo isto devido ao seu estado epigenético.

Os epialelos metastáveis são alelos que se exprimem diferentemente em indivíduos geneticamente idênticos, devido a modificações epigenéticas ocorridas nos primeiros estádios do desenvolvimento sendo muito vulneráveis às influências do meio ambiente (Rakyan et. al., 2002).

Este estado epigenético é um tanto lábil, podendo originar um mosaicismo fenotípico entre as células (variegation ou variegação) e também entre os indivíduos (expressividade variável). (Rakyan et. al., 2002)

Este estado epigenético normalmente instala-se durante o início da embriogênese, sendo um acontecimento probabilístico que é influenciado consoante o alelo é transportado pelo alelo paterno ou pelo alelo materno.

4.3 – Epigenética e Imprinting

(Genes Imprinting)

Genes “imprinting” são genes cuja expressão é determinada por um dos progenitores, paterno ou materno, não sendo ambos os seus alelos igualmente expressos.

O “imprinting” genómico é um mecanismo epigenético que resulta pois da expressão éonoalelica de genes dependendo da origem parental do alelo (Khatib et. al., 2007).

Nas espécies mamíferas está assinalada a conservação do imprinting genómico de muitos genes, embora hoje se vá referindo que alguns genes escapam a esta conservação (Khatib et. al., 2007)

A maioria dos genes imprinting tem sido identificada em ratinhos, seres humanos., e alguns também em bovinos.

Em bovinos está assinalado que os genes “imprinting” têm mais alto teor de G+C e mais ilhas Cp G e repetições em tandem e menos SINES do que os genes não “imprinted”.

Também nos genes imprinted os LINES e LTR são pouco frequentes relativamente aos genes não imprinted ao contrário do que se assinala em ratinhos e seres humanos (Khatib et. al., 2007).

Nos mamíferos um pequeno número de genes (cerca de 50) parecem ser genes imprinting, sendo a maioria deles reprimidos na sua expressão. Assim um alelo herdado da mãe pode ser expresso exclusivamente, uma vez que o alelo herdado do pai é “imprinted” ou vice-versa.

O processo de um gene imprinting, começa durante a formação dos gâmetas, no desenvolvimento do espermatozóide ou do óvulo. No ser vivo resultante todas as células terão o mesmo conjunto de genes “imprinting” quer da mãe quer do pai excepto as células que originarão os gâmetas onde todos os imprints maternos e paternos são removidos e restabelecidos depois nas linhas de células germinativas (Sirard, M-A. 2003).

Para explicitar o mecanismo do “imprinting” dos progenitores servimo-nos dos exemplos a) e b) seguintes:

- a) O processo de imprinting começa nos gâmetas onde o alelo destinado a ser inactivo no embrião derivado desse gâmeta (quer da mãe quer do pai, conforme) é marcado através da metilação das citosinas na sequência de DNA promotoras do gene em causa (Figura 6)

Figura 6 (Ver final do texto)

As metilações anteriores evitam que os factores de transcrição interactuem com o promotor e daí a não expressão do gene em causa.

Enquanto a metilação é o sinal do “imprinting” a repressão da expressão do gene pode necessitar da produção de RNA.

- b) O exemplo que se segue corresponde ao gene Igf2 (receptor para o insulin-like growth factor-2) (Ref. Wutz et. al., citados em Imprinting genes), um exemplo de gene imprinting em que no ratinho o alelo herdado da mãe é aquele que é expresso.

Os genes imprinting Igf – 2r são diferentemente metilados consoante a sua origem materna ou paterna (Li et. al. 1993).

Figura 7 (Ver final do texto)

No gene materno anterior a hélice de DNA superior tem á esquerda o respectivo promotor não metilado e ocorre portanto a transcrição activa do gene com expressão do Igf 2r mRNA.(Figura 7)

No mesmo gene materno mas na hélice inferior existe um conjunto de ilhotas CpG no promotor que são metilados e como tal a transcrição é reprimida.

Logo há expressão do gene materno Igf 2r.

No gene paterno esquematizado a seguir (Figura 8) as coisas passam-se diferentemente

Figura 8 (Ver final do Texto)

No gene paterno anterior o promotor da hélice superior do DNA está metilado e inactivo não havendo expressão de proteína.

No mesmo gene a hélice inferior do duplex de DNA o promotor não está metilado e é activo e a transcrição desta hélice antisense do DNA produz um RNA antisense que pode participar também na repressão deste gene.

Logo não há de todo expressão do gene paterno Igf2r.

Os genes imprinting nos mamíferos não obedecem às leis genéticas Mendelianas normais pois os mamíferos apesar de possuírem os dois conjuntos completos de cromossomas, herdados do pai e da mãe, sendo expressos ambos os alelos de um dado gene de cada cromossoma, do pai e da mãe, no caso dos genes imprinting apenas são expressos de um cromossoma de um dos progenitores. Isto decorre de mecanismos epigenéticos que restringem a expressão em causa.

A regulação epigenética pode activar ou inactivar a função dos genes nas células estando assinalados como proteínas responsáveis por esta regulação epigenética, metiltransferases, proteínas que interactivam com metil CpG, enzimas que modificam histonas, factores que remodelam a cromatina e seus complexos multicelulares (Nakao, 2001).

O imprinting genómico é pois uma forma epigenética de regulação de um gene, cuja expressão depende especificamente da origem progenitora (Killian et. al., 2001).

Durante a divisão celular somática o imprinting genómico é herdado estavelmente, mas é revertido quando transmitido através de indivíduos do sexo oposto (Killian et. al., 2000).

No imprinting a expressão de um alelo genético numa dada geração depende de quando ele reside no macho ou na fêmea da geração anterior.

O imprinting genómico reduz a expressão de um gene, de um estado de expressão bialélica para monoalélica (Morison et. al., 2005), mas para diversos genes a silenciamento é apenas parcial.

Nos genomas mamíferos diploides, o imprinting genómico, ou seja o silenciamento específico da origem parental de uma pequena proporção de genes introduz uma vulnerabilidade paradoxal de hemizigotia (Morison et. al., 2005).

Uma elevada proporção de genes imprinting são nc RNA (não codificante RNA) ou genes derivados por retrotransposição.

Durante o desenvolvimento dos gâmetas dos mamíferos, “imprints” hereditáveis são formados em cada genoma haplóide, actuando para suprimir, atenuar ou activar a expressão de um pequeno número de genes de uma forma específica consoante a sua origem parental (Morison et. al., 2005).

Este imprint é mantido nas células somáticas, sendo o desenho da sua expressão por vezes específico dos tecidos ou do estado do desenvolvimento. (Morison et. al. 2005)

Esta pseudohemizigotia imposta pelo imprinting origina vulnerabilidade genética e contribui para diversas doenças, (Morison et. al. 2005).

Para se poder averiguar se a expressão de um gene é monoalélica ou bialélica (recorda-se que os genes imprinted são expressos monoalélicamente) deve existir um polimorfismo expresso, polimorfismo no mRNA ou nas proteínas expressas em ordem a distinguir qual dos alelos, paterno ou materno, é transcrito. Por outro lado é necessário que os animais a estudar sejam heterozigotos para o gene/polimorfismo que se está a estudar (Zhang et. al., 2004).

Nos genomas mamíferos os polimorfismos mais frequentes são os ocorridos num único nucleótido (SNP) ou sejam mutações pontuais no DNA (troca entre pares de bases ou inserções/delecções).

Perturbações no estado de imprinting dos genes podem ser devidas por exemplo à expressão

bialélica destes genes imprinting os quais podem ser responsáveis por diversas situações anormais (por ex: LOS e variadíssimas doenças nos seres humanos).

Admite-se que estejam referenciados até hoje 83 genes imprinting nos mamíferos.

Dos componentes “imprinted” 63 são codificadores de proteínas, 35 nos humanos e 54 nos ratinhos, apenas 26 genes codificadores de proteínas são imprinted em ambas as espécies.

nc RNA constituem 30% (25/83) dos genes imprinting, incluindo-se neles transcritos antisense, pequenos RNAs nucleolares (Sno RNA), microRNAs, pseudogenes e outros RNA desconhecidos.

4.4 – Transmissão de estados epigenéticos.

Teoricamente a transmissão dos estados epigenéticos através da meiose tem dois argumentos gerais em seu desfavor (Richards, 2006).

Num deles evoca-se a evidência da erosão das marcas epigenéticas no contexto do desenvolvimento dos animais (Ref.22 citada em Richards, 2006). É o caso da maioria das metilações do DNA que são removidas durante as divisões iniciais da formação e desenvolvimento dos embriões dos mamíferos. Também a restauração dos estados de expressão mono-alélico que são estabelecidos pelo imprinting parental nos mamíferos é outro exemplo de erosão das marcações epigenéticas embora neste caso, as marcações sejam transmitidas estavelmente através da meiose e depois erosionadas e restauradas mais tarde durante o desenvolvimento.

O outro argumento em desfavor da transmissão dos estados epigenéticos através da meiose apoia-se na teoria de que a informação epigenética é limitada a uma única geração, uma vez que haveria erosão específica das marcas epigenéticas de determinadas linhas celulares num contexto coordenado entre os diversos tipos celulares durante o desenvolvimento dos animais (Ref. 23, citada em Richards, 2006). Seria portanto necessário a erosão destas marcações em determinados tipos celulares para fazer retroceder estas linhas celulares para trás para o mesmo estado que se encontrava no genótipo, eliminando assim a perturbação que poderia ocorrer durante o desenvolvimento em consequência de uma assemblagem mal efectuada de diferentes epigenótipos.

Saliente-se contudo que nos mamíferos a erosão das marcas epigenéticas não é um acontecimento universal no ciclo da vida dos organismos multicelulares sendo clássico o exemplo da metilação do DNA que não é restaurada nas primeiras fases do desenvolvimento dos Zebrafish (Ref. 24, citada em Richards, 2006).

Mesmo nos mamíferos a erosão das marcas da 5-metilcitosina não é absoluta (Ref. 25 e 26, citados em Richards, 2006).

Portanto a erosão epigenética é incompleta havendo numerosos casos nos seres eucariotas de transmissão meiótica de alelos epigenéticos (epialelos) como se refere no quadro 5 seguinte em ratinhos e seres humanos.

Quadro 5 (Ver final do texto)

4.5 – Interações dos factores epigenéticos com o DNA cromatínico

Na genómica funcional e na epigenómica, as interacções entre os factores de transcrição ou outros cofactores e o DNA, na sua totalidade, são fundamentais para que se possa fazer uma apreciação global dos fenótipos dos animais.

Como se compreende nos grandes genomas é muito difícil estabelecer um mapa de cada local individual de todo o DNA em que ocorreram interacções gene-factores diversos. (Jasny, 2007).

Nos últimos anos foram desenvolvidas metodologias para esse efeito em que se combinam a imunoprecipitação da cromatina em que ocorre interacção proteína- DNA e posterior sequenciação altamente específica do segmento de DNA que interactuou e com um grau de resolução de 50 pares de bases (ChIP Seq.) (Johnson et. al., 2007).

Necessita-se pois primeiramente de detectar as interacções proteína – DNA. Estas interacções protegem estas porções da cromatina da cisão por uma endonuclease ou de uma modificação por um agente químico ao contrário das porções do DNA que não interactuaram.

Na imuno precipitação da cromatina ou ChIP, determina-se primeiramente quando uma dada proteína se liga ou está localizada (Chromatin immunoprecipitation) na sequência específica do DNA.

Para isso as proteínas que se ligam ao DNA são crosslinked ao DNA com formaldeído Depois isola-se a cromatina crosslinked (DNA-proteína) cortando todo o DNA, obtendo os pequenos fragmentos de DNA inclusive os complexos com as proteínas ligadas.

Com anticorpos específicos que se ligam no complexo DNA-proteína ligada, precipita-se este complexo e isola-se.

Depois reverte-se a operação de cross-linking para libertar o DNA e digerir a proteína.

Por PCR amplifica-se a sequência específica de DNA que tinha interactuado com a proteína. Neste método ChIP necessita-se de anticorpos altamente específicos para cada proteína a ser estudada o que pode ser ultrapassado com a construção de proteínas fundidas com epitopes (como HÁ ou c-myc) reconhecida por anticorpos disponíveis ou por outras metodologias.

Na metodologia ChIP-on-ChIP combina-se a imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com a tecnologia microarray (chip).

Numa metodologia mais recente chip-sequencing (ChIP seq.) é utilizada a imunoprecipitação da cromatina para “crosslink” as proteínas de interesse com o DNA, mas em vez de se utilizar o microarray, utiliza-se um método mais preciso de sequenciação dos pontos dessa interacção.

O lay-out de trabalho desta última metodologia (Chip-Seq) refere-se seguidamente.

- 1- Crosslink das proteínas com o DNA, e corte de todo o DNA.
- 2- Junção de anticorpos específicos da proteína.
- 3- Imunoprecipitação e purificação dos complexos (DNA- proteína interactuante).
- 4- Reversão do cross-links dos complexos, purificação do DNA e sua preparação para sequenciação.
- 5- Sequenciação do fragmento de DNA e seu mapeamento no genoma total.

4.6 – Regulação epigenética

O impacto, nos animais, resultante da regulação epigenética depende dos animais, dos genes envolvidos e do tipo de factores do meio envolvente intervenientes.

Durante o desenvolvimento dos mamíferos, partindo de células pluripotentes estas vão-se progressivamente diferenciando em diversos tipos de células através de marcações epigenéticas que estão pois envolvidas na determinação de cada célula e na sua orientação. Nestas marcações epigenéticas estão assinaladas modificações nas histonas e metilação do DNA.

É conhecido que factores nutritivos podem influenciar a regulação epigenética ao interactuar por ex. com o gene *agouti* (*Avy*) nos ratinhos e condicionando a pigmentação desses animais ou a sua tendência para obesidade ou diabetes.

No entanto outro tipo de factores interactuando com o gene *Axin Fu* pode regular o fenótipo dos animais induzindo modificações por exemplo no desenvolvimento esquelético dos animais envolvidos.

Práticas de comportamento da parte materna (etologia) ou manejo da descendência resultante podem regular epigeneticamente genes receptores GR com todas as consequências inerentes, podendo essa regulação com certos tipos de intervenções, ser revertida.

Mudanças do fenótipo muscular e hipertrofias consideráveis de determinadas regiões anatómicas estão assinaladas em ovinos em consequência de modificações epigenéticas de histonas, não estando descritos os factores do meio envolvente possivelmente envolvidos nesta situação.

Mas também os nc RNA podem desencadear uma diversidade de efeitos epigenéticos fisiológicos e patológicos de diversos tipos.

Também em aves domesticadas comparativamente a aves não domesticadas, quando sujeitas a determinadas regras ou aprendizagens, ocorre uma regulação genética hereditável comprovada através da expressão diferenciada de uma série de genes de umas aves em relação a outras, sendo essas características transmitidas às gerações seguintes.

Numa apreciação global de tudo o que acabamos de referir parece aceitável sugerir que os diversos fenótipos animais podem ser regulados através de factores externos do meio envolvente como por exemplo, (alimentação, comportamento, manejo, ensino, etc) que interviriam marcando epigeneticamente o genoma desses animais (ao nível do DNA, histonas e ncRNA), sendo hereditáveis mitoticamente, e em alguns casos essa marcação poderia ser transmitida meioticamente às gerações subsequentes.

Resultam pois profundas implicações em todos os campos da medicina veterinária, dos animais de companhia às espécies pecuárias com profundas potencialidades no campo das clínicas, e produção animal.

4.6.1- Regulação epigenética durante o desenvolvimento dos mamíferos

Durante o desenvolvimento dos animais (mamíferos) parte-se de células pluripotentes que progressivamente se vão diferenciando em diversos tipos celulares com potenciais cada vez mais reduzidos.

Nas células pluripotentes são expressos uma série de genes que codificam factores de transcrição básicos para essa fase do desenvolvimento enquanto os genes que apenas são necessários mais tarde

estão reprimidos através de histonas adequadas, que lhe conferem um silenciamento epigenético flexível e a curto termo.

Por outro lado a metilação do DNA origina um silenciamento epigenético a longo termo, como sucede nos transposões, nos genes imprinting e nos genes associados com a pluripotência nas células somáticas (Quadro 6).

Quadro 6 (Ver final do texto)

No entanto desconhecem-se as marcas epigenéticas que estão implicadas na determinação (determining) de cada célula e na orientação (commitment) de cada linhagem celular ao longo do desenvolvimento dos animais embora se saiba que este desenvolvimento é epigenético, e que apenas um pequeno sub-conjunto dos cerca de 30.000 genes da totalidade do genoma são activos nos diferentes tecidos e órgãos que constituem os animais, mas sendo essa actividade diferentemente regulada por diversas combinações de factores epigenéticos, já que a sequência do DNA desses genomas é praticamente idêntica.

A clonagem dos animais é deficiente dados os defeitos epigenéticos, sobretudo na metilação do DNA, ocorridas durante ela.

As proteínas do grupo Polycomb e Trithorax são proteínas não nucleossomais, associadas com a cromatina e que regulam epigeneticamente a memória celular (Reik, 2007).

Refira-se ainda que as marcas epigenéticas acumuladas nas células diferenciadas diferem daquelas marcas epigenéticas que ocorrem nas células pluripotentes, e aquelas marcas epigenéticas das células diferenciadas diferem ainda consoante as linhagens celulares.

Há marcas epigenéticas de curto termo que podem ser removidas antes da célula se dividir ou após apenas algumas divisões celulares.

As marcas epigenéticas de longo termo são mantidas durante várias divisões celulares.

Durante os primeiros estádios do desenvolvimento, os genes que são necessários mais tarde são mantidos transitoriamente reprimidos através da modificação de histonas, mas esta situação é facilmente revertida quando a expressão desses genes for necessária.

Quando a diferenciação celular evolui os genes envolvidos na pluripotência das células são reprimidos quer através da metilação de histonas quer da metilação do DNA.

Os gâmetas apresentam uma evolução curiosa destas marcas epigenéticas, removendo umas e mantendo outras através de diversas gerações.

Há uma inactivação temporária dos genes envolvidos na diferenciação das células pluripotentes.

Nas células pluripotentes, genes que são precisos mais tarde no seu desenvolvimento são reprimidos por um sistema complexo (PRC) que envolve proteínas PcG. Estes genes são reprimidos através da metilação H3K27 e da metilação H3K4, sendo desreprimidos após a perda de repressão devida aos complexos PRC contendo proteínas PcG. Não se conhece se a desmetilação da H3K27 é devida a uma desmetilase. Admite-se que um aumento da metilação da H3K4 seja necessária para a expressão de proteínas necessárias para o desenvolvimento.

Na figura 9 seguinte representa-se a repressão temporária dos genes envolvidos no desenvolvimento pelo complexo proteico Polycomb PcG.

Figura 9 (Ver final do texto)

O silenciamento epigenético imposto pelo complexo PRC contendo proteínas PcG pode ser hereditário através das mitoses (por mecanismos desconhecidos) mas admite-se que estas marcações possam ser rapidamente removidas por desmetilação da H3K27.

A metilação H3K27 ocorre fora do contexto da metilação do DNA.

Para que a diferenciação celular se inicie torna-se necessário remover as marcas de inativação desencadeadas pelo complexo PRC que silenciam os genes envolvidos no desenvolvimento.

Na figura 10 seguinte representa-se a repressão de genes associados com a pluripotência, através da metilação de histonas e do DNA.

Figura 10 (Ver final do texto)

Durante a diferenciação celular os genes associados com a pluripotência celular são silenciados estavelmente, através da metilação de histonas e do DNA. Dá-se o exemplo dos genes Oct4 e Nanog que durante a diferenciação de células ES são silenciados através da metilação de histonas (por ex: H3K9 pelo G9A ou seja EH MT2,- euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2) e do DNA.

Para a formação de células germinativas é necessário manter nestas células no início da sua formação, a repressão de genes somáticos o que envolve a metilação de arginina em histonas pela PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5), Figura 11.

Figura 11 Ver final do texto)

“Os genes envolvidos no desenvolvimento dos animais necessitam ser regulados epigeneticamente com uma certa flexibilidade enquanto as transposões necessitam ser completamente silenciados e estavelmente numa perspectiva do hospedeiro, para evitar que se movam ao longo do genoma e desencadeiem potencialmente mutações” (Ref. 22 citada em Reik, 2007).

Este silenciamento de transposões pode ser alcançado por se metilarem a si próprios ou por modificação das histonas como por ex: H3K9.

Nos genes imprinting a metilação de ilhas CpG nos seus promotores pode desencadear o seu silenciamento.

As células das linhas germinativas embora tenham a mesma sequência de DNA que as células somáticas no mesmo indivíduo, são no entanto processadas, sobre a sua cromatina, de forma diferente das células somáticas (Ooi e Henikoff, 2007).

Nos genes imprinting e nos transposões a metilação do DNA é realizada durante a oogenese ou espermatogénese, pela de novo metiltransferase DNA 3A (DNMT3A) e pelo seu cofactor DN MT3-like (DNMT3L).

Aquisição de metilação do DNA nas células germinativas

Durante o desenvolvimento das células germinativas, os genes imprinting e os transposões são metilados pela de novo metiltransferase DNMT3 e pelo seu cofactor.

É possível que esta marcação necessite da metilação de arginina nas histonas a cargo da PRMT7 (Figura 12)

Figura 12 (Ver final do texto)

Os gâmetas masculinos maduros tem na cromatina protaminas em vez de histonas o que altera a superestrutura do DNA.

Após a fertilização a metilação dos genes imprinting é mantida.

No silenciamento do cromossoma X nas fêmeas e dos genes imprinting, a expressão do ncRNA “in cis” pode desencadear o silenciamento de genes adjacentes em virtude da exclusão da polimerase II (Pol II) e da modificação de histonas e/ou metilação do DNA consoante a linhagem embrionica ou extra-embrionica tal como se esquematiza seguidamente (Figura 13).

Figura 13 (Ver final do texto)

A metilação do DNA estabiliza o silenciamento de genes nos tecidos embrionicos mas nos extra embrionicos é menos importante pois aqui predomina o silenciamento mediado pelo PRC.

O ncRNA reveste a região a ser inactivada impedindo a Pol II de actuar e consequentemente silenciando a expressão dos genes.

As metilações de DNA ocorridas durante o desenvolvimento dos animais são estáveis nas células somáticas e durante a vida adulta . Esta característica hereditária deve-se à acção do DNMT1 a metiltransferase de manutenção.

A metilação das ilhotas CpG nunca é erosionada durante o desenvolvimento normal. Pelo contrário a metilação destas mesmas ilhotas CpG nos genes “imprinting” necessitam ser erosionados nas linhas germinativas para subsequentemente ocorrer depois nova metilação durante o desenvolvimento das linhas germinativas, tal como se esquematiza seguidamente (Figura 14).

Figura14 (Ver final do texto)

Ocorre portanto perda da metilação do DNA, assim como da metilação do H3K9. Posteriormente durante a oogénese e espermatogénese, ocorre metilação de novo.

Uma reprogramação diferente do genoma ocorre logo após a fertilização e durante o início da pré-implantação como se esquematiza seguidamente (Figura 15)

Figura 15 (Ver final do texto)

Diversos genes metilados dos gâmetas maduros são desmetilados no embrião em início, ocorrendo esta desmetilação sem replicação do DNA admitindo-se que seja devido à acção de uma desmetilase.

Esta desmetilação é importante para a expressão de genes envolvidos na pluripotência, tal como certas marcas que activam histonas.

Em gâmetas maduros, algum DNA metilado é protegido da desmetilação durante ou após a fertilização, sobretudo genes imprinting e alguns transposões. (vide esquema seguinte na Figura 16)

Figura 16 (Ver final do texto)

Certas proteínas como a proteína stella podem proteger o DNA da desmetilação.

Diversas das marcações epigenéticas que são herdadas e adquiridas pelas células germinativas são depois erosionadas nas células PGC e nos embriões em início.

Contudo há informação epigenética que pode sobrar para a geração seguinte como sucede com genes imprinting de células somáticas.

Nos quadros 7 e 8 seguintes faz-se um sumario da evolução das etapas epigenéticas ao nível do DNA e histonas durante o desenvolvimento dos mamíferos e ainda a evolução das etapas epigenéticas básicas durante o desenvolvimento.

Quadro 7 (Ver final do texto)

Quadro 8 (Ver final do texto)

4.6.2 – Regulação epigenética e patologias

Alelo Agouti em ratinho

A pigmentação cutânea na pele dos mamíferos é controlada por um complexo genético regulado por mais de 150 alelos disseminados por mais de 90 loci (Ref. 262, 263, 328, 385, 515, 673, 708 citadas em Slominski, et. al., 2004).

Em 2003 Bennet e Lamoreux, referiam que os loci da cor ou pigmentação nos mamíferos eram loci genéticos onde as mutações podiam afectar a pigmentação da pelagem, pele e/ou olhos, referindo ainda que no caso do ratinho eram conhecidos mais de 800 alelos fenotipos em 127 loci de pigmentação identificados.

Diversos mamíferos dotados de pelagem como é o caso do ratinho, perderam os melanócitos activos melanogenicamente na sua epiderme principal adulta e em vez disso a melanina é produzida no bulbo do fólculo do pelo (hair follicle bulb).

Contudo há uma notável variação nas suas pigmentações e pelagens.

No caso dos murinos esta grande diversidade de pelagens reflete a variação na copolimerização das eumelaninas (pigmentos preto - castanho) e feomelaninas (phaemelaninas pigmentos vermelho – amarelo), que originam cores, pretas, castanhas, amarelas, cinzentas ou brancas (Slominski et. al., 2004).

A enzima tirosinase é uma enzima básica na melanogénese, com altos níveis desta enzima produzindo eumelanina, enquanto baixas concentrações desta enzima originam feomelaninas (Ref. 2 e 3 citadas em Gutiérrez – Gil, et. al., 2007).

A actividade das tirosinases é regulada pelo receptor melanocortina 1 (Mc1-r ou α -MSHR) cuja estimulação pela hormona α - MSH leva a produção de eumelanina, enquanto a feomelanina é produzida na ausência da estimulação α - MSH quer por falha de receptor Mc1-r ou pela presença da proteína agouti, que é segregada por células adjacentes aos melanocitos.

A pigmentação das pelagens depende das proporções entre as eumelaninas e feomelaninas, aumento das concentrações de eumelaninas favorecem a cor preta, aumento das concentrações de feomelaninas aumentam a cor amarelada ou avermelhada. (Seo et. al., 2007)

A proteína sinalizante Agouti (ASIP) funciona regulando a pigmentação nos ratinhos enquanto noutros animais e nos seres humanos não é bem conhecida a sua função.

Em condições normais a síntese da melanina nos melanocitos decorre nos melanossomas. A estrutura dos melanossomas que produzem eumelaninas é elíptica e contém uma matriz fibrilar enquanto os pheomelanossomas são arredondados e contém uma matriz vesiculoglobular.

Os melanossomas desenvolvem-se em 4 etapas de I a IV (Slominski et. al., 2004).

As células estaminais melanocíticas podem ser evidenciadas na região “bulge” do folículo piloso, portanto distintas dos melanocitos diferenciados no bulbo (bulb) do pêlo. Como parte do ciclo do folículo piloso, os melanócitos diferenciados migram do “bulge” para o “bulb” onde eles exportam pigmentos para os ceratinocitos geradores dos pelos.

Em situações anormais em virtude de mutações este ciclo pode ser alterado com as consequências respectivas (Lin e Fisher, 2007).

Em diversas espécies mutações no gene Mc1-r (receptor 1 da melanocortina) são motivo da expressão dominante do pigmento preto.

Uma função conhecida do gene agouti nos ratinhos de tipo selvagem é regular a produção de pigmentos dos pêlos pelos melanocitos, de uma forma que origina a produção de uma cor agouti na pelagem .

No principal tipo de pelagens nos ratinhos de tipo selvagem (Wild-type) agouti, os dendritos dos melanocitos, têm uma extremidade preta contendo eumelanina, depois uma banda amarela contendo feomelanina e depois uma base preta. Estas “riscas” são geradas pela deslocação ou melhor, pela oscilação do tipo de melanina produzida pelos melanocitos nos folículos pilosos.

Esta oscilação é controlada por uma série de produtos de diversos genes, sobretudo pelo receptor 1 da melanocortina (Mc1r) expresso pelos melanocitos e pelos seus dois ligandos, a hormona melanocito-estimuladora (MSH) e pela proteína sinal agouti (ASP) antagonista competitiva da

MSH (Ref. 61 e 62 citadas em Bennet e Lamoreux, 2003).

O gene *Mc1r* é o velho *e* ou locus recessivo amarelo no qual a mutação com perda de função dá uma cor predominantemente amarela aos ratinhos, enquanto o ganho de função produz uma pelagem preta.

A proteína sinal Agouti (ASP) é codificada pelo gene *agouti* no qual mutações dominantes (há duas mutações dominantes neste gene *agouti*, a *Ay*- amarelo letal - e *Avy* - amarelo viável, além das *Asy* e *Aiy* todas causando uma pelagem predominantemente amarela) com ganho de função como a *Ay* produz ratinhos amarelos (Bennet e Lamoreux, 2003).

Diversas mutações dominantes do gene pigmentante *agouti* do ratinho têm efeitos pleiotróficos que incluem a obesidade e pelagem amarela.

O gene *Ay* é produzido por uma grande deleção que afecta a expressão de diversos genes contíguos: Três outras mutações *agouti* associadas com a obesidade, *Aiy*, *Asy* e *Avy* resultam de diferentes alterações moleculares. Os alelos *Aiy* e *Avy* são causados por inserção de um elemento partícula intracisternal A (retrotransposões das cisternas do retículo endoplasmico semelhantes a retrovirus que codificam partículas semelhantes a vírus, IAP) de 1Kb ou 100 Kb respectivamente, acima das sequências codificantes *agouti* (Duhl, et. al., 1994).

-ALELO AGOUTI VIABLE YELLOW (*Avy*) EM RATINHO (Epialelo murino metastavel)
(Rakyan e Beck, 2006).

Neste alelo *Avy* está integrado estavelmente acima do gene *agouti* uma partícula intracisternal A (IAP) que é abundante nos genomas mamíferos.

Quando esta sequência IAP é desmetilada, um promotor oculto dentro dela origina a expressão ectópica do gene *agouti* e o ratinho expressa pelagens amarelas e predisposição para diabetes.

Quando a sequência IAP é metilada, a expressão *agouti* reverte para o perfil de tipo selvagem e o ratinho é fenotipicamente normal. (pelagem castanha).

Este fenómeno é observado em ratinhos geneticamente idênticos criados em ambientes controlados (Ref. 12 citada em Rakyan e Beck, 2006).

A cor da pelagem do fenotipo *Avy* do ratinho está associada a diferentes “epialelos” do gene *Avy*. (Rakyan e Beck, 2006)

A expressão deste alelo *agouti* está pois correlacionada com a diferente metilação do DNA, no promotor obscuro dentro da repetição terminal longa (LTR) do IAP. A hipometilação está associada com a expressão ectópica *agouti* e daí a pelagem completamente amarela dos ratinhos, enquanto a hipermetilação está correlacionada com a expressão normal *agouti* e daí uma pelagem *agouti* castanha .

O gene murino *agouti* (Dolinoy et. al., 2007) codifica uma molécula parácrinica assinalante que promove nos melanocitos foliculares a produção do pigmento feomelamina amarela mais do que o pigmento eumelanina preto. Recordando os ratinhos amarelos são hipometilados no elemento transposável acima do gene *Agouti* permitindo a máxima expressão ectópica, enquanto a hipermetilação deste local silencia a expressão ectópica *Agouti*.

Os ratinhos predominantemente amarelos tendem também a ser mais obesos que os castanhos.

A dieta pode influenciar o epigenótipo como foi demonstrado em ratinhos Avy (ref. 19 citada em Rakyan e Beck, 2006). Assim ratinhos fêmeas grávidas Avy alimentadas com uma dieta rica em folato (que é um dador do grupo metilo para a metionina) alteram a gama dos fenótipos, das cores da pelagem, alterando também a metilação do DNA dos Avy da descendência que possua Avy.

Ocorre portanto a modificação epigenética nas células das linhas germinativas, dos alelos Avy murinos, pela suplementação nutricional (Cropley et. al. 2006).

As ratinhas mães pseudoagouti Avy, mas não os ratinhos machos, produzem mais descendência pseudoagouti (Dolinoy et. al., 2007).

A exposição a uma suplementação dietética de grupos metilo durante o meio da gestação (midgestation) desloca os fenótipos Avy não só das ratinhas expostas e dos fetos mas também na sua descendência, e a mudança do estado epigenético do alelo Avy na linha germinativa, sendo este estado alterado, mantido através da reprogramação epigenética que ocorre na gametogénese e embriogénese, com a dieta das mães influenciando as gerações descendentes, independentemente de outras modificações nas dietas o que demonstra que um gene mamífero específico pode ser sujeito a modificação epigenética da sua linha germinativa.

Alelo murino Axin Fu
Hereditariedade do alelo murino Axin Fu
(Rakyan et. al., 2003)

O fenótipo característico deste alelo no ratinho, a cauda dobrada, pode estar presente ou ausente consoante a diferente metilação do DNA de um retrotransposição dentro do gene Axin Fu e a identidade da mutante transcrita adjacente no retrotransposição LTR que se supõe ser a causa do fenótipo.

O estado epigenético do gene Axin Fu pode ser transmitido para a geração seguinte após a transmissão materna ou paterna, o que contrasta com a hereditariedade epigenética do alelo murino agouti-viable yellow (Avy) que é transmitido apenas pela fêmea.

O alelo Axin Fu tem um retrotransposição (subtipo IA1), intracisternal – A – particle de 5,1 Kb (IAP), inserido numa orientação antisense (em relação ao locus axin) no intrão 6 (Ref. 3, citada em Rakyan et. al., 2003).

Recorda-se que na embriologia dos mamíferos o cilindro do ovo dá origem a um embrião com uma polaridade axial anterior-posterior (A-P).

O controlo molecular da formação deste eixo nos embriões de mamíferos é conhecido por estudos feitos em ratinhos mutantes em que se observou que o locus Fused (Fused gene ou Fu gene) é extraordinariamente importante tal como os seus alelos espontâneos através da proteína Axin expressa.

O Fu gene passou a ser designado axin (axin Fu) para o distinguir de outros fused genes na *Drosophila* (Zeng e tal., 1997).

Mutações deste gene originam efeitos pleotrópicos inclusive duplicações axiais nos embriões de

ratinhos provocando letalidade embrionária nos homocigóticos.

O produto deste locus *Fused*, a Axin é um inibidor da via assinalante Wnt e regula as etapas iniciais da formação do eixo embrionário nos mamíferos (Low e Lin, 2004). Esta proteína Axin possui diversos multidoínios que interatuam com múltiplas proteínas e funciona como um regulador negativo da via assinalante Wnt regulando negativamente as concentrações de beta-catenina.

No epialelo murino metastável Axin Fu, o gene Axin do tipo “selvagem” codifica uma proteína axina que inibe a sinalização Wnt estando assim envolvida na formação do eixo embrionário nos mamíferos (Ref. 28, citada em Dolinoy et. al. 2007).

Este gene Axin é expresso ubiquamente durante a embriogénese e nos adultos (Ref. 28, citada em Dolinoy et. al., 2007).

Como referimos o alelo Axin Fu contém uma inserção IAP espontânea dentro do intrão 6 deste gene e daí a expressão de um transcrito de Axin 3' truncado mas activo biologicamente originado dentro do elemento transposável e que origina duplicações axiais durante o desenvolvimento (Ref. 28, 29, citadas em Dolinoy et. al., 2007).

Os ratinhos Axin Fu têm caudas dobradas com graus variáveis desta dobragem. O grau desta dobragem da cauda está inversamente relacionado com o grau de metilação do IAP do locus Axin Fu (Ref. 4, citada em Dolinoy et. al., 2007).

Caudas muito dobradas e menor metilação do IAP dos Axin Fu, caudas normais não dobradas e maior metilação do IAP da Axin Fu.

Este epialelo metastável é pois similar ao Avy (agouti) mas a localização do IAP dentro do gene é diferente.

As mães Axin Fu e os machos Axin Fu produzem mais descendência com caudas dobradas.

4.6.3 – Regulação epigenética, etologia e manejo.

(Cuidados maternos das ratinhas para com a sua descendência)

(Rakyan e Beck, 2006)

Weaver e col. num estudo hoje clássico (Ref.18, citada em Rakyan e Beck, 2006), verificaram que diminuição dos cuidados maternos pelas ratinhas mães originam uma metilação do DNA e acetilação das histonas no gene promotor do receptor glucocorticóide no hipocampo da descendência dessas ratinhas, originando mais tarde na vida dessas crias uma resposta aumentada ao stress.

O meio envolvente além de induzir a formação de epialelos pode também reverter o estado epigenético, consoante o tipo de condicionalismos actuantes a partir desse meio envolvente.

A resposta ao stress fisiológico é feita através da mobilização das reservas energéticas do organismo, na conversão destas em formas apropriadas para transporte e utilização, aumento do O₂ nos locais em que é necessário para respostas comportamentais e limitação da utilização da energia desnecessária.

Os principais reguladores do stress residem no cérebro, no hipotálamo, hipocampo e amígdala e na medula oblongata, glândula pituitária e glândulas suprarrenais.

O stress fisiológico (que engloba injurias, cirurgias, falhas renais, queimaduras e infeções) é caracterizado por subidas no sangue do cortisol, glucagina, catecolaminas e hormona do crescimento, desencadeando também resistência à insulina.

O metabolismo basal, glicémia e taxa de ácidos gordos livres no sangue também são elevados. Ocorre ainda reduzida biossíntese proteica e catabolismo proteico aumentado o que talvez se deva à ação de interleucinas de monocitos e linfócitos que estimulam a síntese hepática de proteínas reagentes de fase aguda.

Nas respostas neurais ao stress a segregação de epinefrina formada a partir da tirosina e fenilalanina, está assinalada a partir de células cromafínicas da medular da suprarrenal.

A síntese, armazenagem e libertação da epinefrina a partir da medular da suprarrenal é regulada por controlos neuronais e também pelas hormonas glucocorticoides sintetizadas e segregadas pelas suprarrenais em resposta ao stress.

Em termos bioquímicos a resposta ao stress ao nível do córtex da suprarrenal assegura a produção de epinefrina pela medular da suprarrenal.

O stress origina ao nível do hipotálamo a libertação da hormona peptídica corticotrofina (CRH também designada inicialmente por CRF) que vai desencadear ao nível da pituitária anterior a libertação da hormona polipeptídica ACTH (adrenocorticotrofina) a qual através dos vasos sanguíneos vai induzir na cortical da suprarrenal a secreção de glucocorticóides (GC) e mineralocorticóides enquanto a medular da suprarrenal induzida por neurotransmissores segrega epinefrina (E) e norepinefrina (NE) tudo isto com as respostas correspondentes (Figura 17).

Figura 17 (Ver final do texto)

Programação epigenética e cuidados maternos nos animais

(Weaver et. al., 2004)

Estudos pioneiros de Meaney et. al. (Ref. Zhang,1998; Strahle et. al., 1992; Breslin et. al., 2001; Maltier, J.S., 2001; citados em Weaver et. al., 2004), em ratinhos assinalaram que cuidados maternos de alto nível das ratinhas mães, modificam o epigenoma da respectiva descendência ao nível do hipocampo no gene promotor de um receptor glucocorticóide (GR).

A expressão aumentada deste gene GR aumenta a actividade da serotonina (5-HT) ao nível dos receptores 5-HT com a subsequente activação do cAMP e da actividade da proteína cinase dependente do cAMP. Daqui resulta um aumento da expressão no hipocampo da proteína A indutora do factor de crescimento dos nervos (NGF1A) que é um factor de transcrição

A região do exão 1 não codificante do GR do hipocampo inclui uma região promotora o exão 1(7) que contem um local para ligação com o NGF1A (Ref.16 in Weaver et al.,2004)

No cérebro dos ratinhos descendentes, que receberam altos níveis de cuidados maternos a expressão do mRNA do GR contendo o exão 1(7) está aumentada, o que sugere que este promotor é um favorecedor da actividade dos cuidados maternos..

Esta descendência revelava diferenças no grau de metilação do DNA relativamente à descendência de ratinhas com baixos níveis de cuidados maternos, tal como apresentavam uma acetilação das histonas alterada e ligação do factor de transcrição NGF1-A ao promotor do GR.

Estas diferenças surgiam ao longo da primeira semana de vida dessa descendência, e era revertida se a descendência de ratinhos com baixos níveis de cuidados maternos fosse adoptada por ratinhas com altos níveis de cuidados maternos ou vice-versa.

A infusão central (intracerebroventricular) nessa descendência já com os ratos adultos, de um inibidor da deacetilase das histonas, removeu as diferenças que ocorriam entre os descendentes com baixos e altos níveis de cuidados maternos, ao nível da acetilação das histonas, metilação do DNA, ligação do NGF1-A, expressão do GR e efeitos dos cuidados maternos na descendência às respostas ao stress.

Concluíram estes investigadores que o estado epigenómico de um gene pode ser estabelecido ou regulado pelo meio envolvente e é potencialmente reversível.

No promotor do gene GR, posições CpG, sobretudo naquelas regiões onde se liga o NGF1-A, na descendência de ratinhos pouco cuidados pelas mães, estão metiladas, enquanto se encontram não metilados nos grupos de ratinhos descendentes de mães que lhes dispensam altos cuidados maternos. A metilação deste DNA está ligada ainda com modificações ao nível das histonas.

Demonstrou-se que o comportamento dos animais pode induzir mudanças no estado epigenómico do genoma. Será portanto a expressão dos genes programada pelo meio envolvente sendo essas mudanças estavelmente impressas (imprinted) ao longo da vida dos animais.

A magnitude da resposta do eixo HPA (eixo hipotalâmico – pituitária- supra-renal) ao stress agudo é função ou depende da libertação do factor libertador de corticotrofina hipotalâmica (CRF) que vai activar o sistema pituitária-suprarrenal.

Ratinhas que dispensam altos níveis de cuidados maternos à sua descendência na primeira semana de vida destes, exibem uma resposta HPA mais modesta ao stress do que aquelas que não dispensam esses níveis altos de cuidados maternos.

O eixo HPA, em resposta ao stress nos animais que receberam bons cuidados maternos nos primeiros 10 dias de vida em comparação com animais sem cuidados maternos adequados, revela uma redução da hormona ACTH na pituitária e no plasma sanguíneo e também da corticoesterona da suprarrenal e no plasma sanguíneo -a principal hormona glucocorticóide no rato- enquanto a expressão do mRNA para a GRH (receptor glicocorticóide no hipocampo) aumenta tal como o mecanismo de feedback glucocorticóide (Figura 18).

Este efeito parece persistir ao longo da vida dos animais (Liu e tal.,1997).

Os receptores glucocorticóides (GR) são os principais mediadores da ação dos glucocorticóides no cérebro.

Quando interactivam com hormonas, os complexos GR-hormonas dimerizam-se e ligam-se com o DNA modelando a transcrição de uma série de genes.

O hipocampo possui as maiores concentrações no cérebro de GR e do seu mRNA.

O GR do hipocampo além de diversas funções está também implicado na inibição por feedback negativo, no eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA).

O stress ou excesso de glucocorticóides, ou altas concentrações de glucocorticóides exógenos promovem a “down” regulação do GR no hipocampo.

Ratinhos com bons cuidados maternos, revelam uma sensibilidade favorecida para o feedback negativo por glucocorticóides e assim diminuem a expressão do mRNA para o CRH e consequentemente diminuem também o CRH:

Isto parece devido ao aumento da expressão do GR no hipocampo região esta fortemente implicada na regulação por glucocorticóides por feedback negativo.

O aumento da expressão do gene GR do hipocampo origina um aumento da inibição por feedback da síntese de CRH e de AVP e uma diminuição da libertação da ACTH da pituitária durante o stress.

Figura 18 (Ver final do texto)

Altos níveis destes cuidados maternos afectam portanto o sistema neural da descendência que os recebe, inibindo a síntese e libertação do factor libertador de corticotrofina (CRF) no hipotálamo e amígdala.

Este factor CRF serve para activar centralmente noradrenalina em resposta ao stress. A noradrenalina aumentada por seu turno regula a actividade HPA através da regulação dinâmica do CRF hipotalâmico e respostas comportamentais ao stress.

Os glucocorticóides iniciam por feedback negativo a inibição da síntese e libertação do CRF e assim diminuem as respostas HPA ao stress.

O feedback negativo glucocorticóide é em parte mediado pela ligação do glucocorticóide aos receptores glucocorticóides (GR) numa série de regiões do cérebro, inclusive no hipocampo.

Os animais adultos correspondentes à descendência de ratinhas que dispensaram altos níveis de cuidados maternos à sua descendência, revelam uma expressão aumentada de GR no hipocampo e uma sensibilidade feedback glucocorticóide favorecida, em comparação com outros animais adultos que não receberam tão altos níveis de cuidados maternos, revelando os animais com altos níveis de cuidados maternos a expressão CRF hipotalâmica diminuída e mais modestas respostas HPA ao stress.

Nos ratinhos, o aumento de pavor em resposta ao stress está também associado com uma diminuição da éurogenese no hipocampo e com a densidade sináptica (Ref.8,9 in Weaver et al.,2004).

Resumindo, o aumento nos cuidados maternos durante a primeira semana de vida dos ratinhos, origina desmetilação do DNA, acetilação diminuída das histonas e ligação de NGFI-A (nerve growth factor-inducible protein A) um factor de transcrição que se liga no promotor GR específico do cérebro (Ref.13 in Weaver et al. 2004)) e um aumento da expressão GR no hipocampo (Ref. 14 in Weaver e tal.,2004).

Ocorrem pois também influências moduladoras, como é o caso do feedback negativo glucocorticóide que inibe a síntese e libertação de CRF diminuindo assim as respostas HPA ao stress.

Refere-se que o gene promotor do receptor glucocorticóide (GR) no hipocampo pode pois ser alterado epigeneticamente. Assim na descendência de ratinhas que dispensam altos ou baixos níveis de cuidados maternos LG – ABN (licking/grooming and arched-back nursing) às suas crias, nas que recebem altos níveis comparativamente às que recebem baixos níveis, ocorre um aumento da expressão do GR do hipocampo e é favorecida a sensibilidade glucocorticóide por feedback (Ref 7e 9 in Weaver e tal.,2004)).

A descendência já adulta destas ratinhas com altos níveis de LG – ABN, revelam pois uma expressão diminuída da CRF hipotalâmica e respostas HPA ao stress, mais modestas.

Há sugestões no sentido de que as diferenças na expressão do GR do hipocampo servirem como um mecanismo para diferentes tipos de resposta HPA ao stress.

Portanto o estado de metilação de determinados locais alvo como por exemplo do promotor GR pode modificar-se consoante os cuidados maternos dispensados pelas ratinhas à sua descendência.

Admite-se que os cuidados maternos alteram a metilação do DNA do exão promotor 1(7) GR do hipocampo e estas modificações podem ser mantidas estavelmente na idade adulta e associadas com diferenças na expressão do GR e nas suas respostas HPA ao stress.

A hipometilação de dinucleótidos CpG de regiões reguladoras de genes está associada com uma estrutura de cromatina activa e com actividade transcripcional. (Ref. 18 – 20 in Weaver et al., 2004)).

O perfil de metilação é pois uma “assinatura” estável do estado epigenómico de uma sequência de DNA reguladora.

Influências do meio ambiente exercidas durante a juventude dos animais podem pois afectar mais tarde os respectivos fenótipos desses animais através das ocorrências epigenéticas em epialelos (Rakyan e Beck, 2006).

Estes epialelos podem surgir em consequência de acontecimentos estocásticos (induzidos durante o desenvolvimento dos animais ou por condicionalismos ambientais) inclusive podem ser devidos a flutuações naturais de proteínas implicadas no estabelecimento de um dado estado epigenético.

Se o epialelo é produzido nos primeiros estádios do desenvolvimento dos animais e se propaga depois a todo o organismo em formação, o impacto no fenótipo resultante pode ser muito notório, denominando-se esses epialelos, epialelos metastáveis pois podem existir em estados epialelicos mas a sua produção não é determinística (Rakyan e Beck, 2006) podendo ser probabilística e influenciada por factores genéticos ou ambientais.

A principal diferença entre variação genética e variação epigenética encontra-se na possibilidade de esta reverter por manipulações apropriadas como sugere Weaver et. al. (2006) . Os dados destes autores demonstram os profundos efeitos que o meio envolvente dos seres vivos durante os primórdios da vida destes, podem ter sobre o funcionamento do genoma e as suas consequências ao longo da vida no que se refere aos comportamentos na idade adulta.

A expressão dos genes é pois significativamente alterada no hipocampo dos ratinhos adultos em função dos cuidados maternos que receberam nos primeiros dias de vida.

Weaver e al. (2006) identificaram em ratinhos mais de 900 genes no transcriptoma do hipocampo que são estavelmente regulados pelos cuidados maternos.

Por outro lado a maioria dos transcritos mRNA que apresentavam diferenças de expressão foram aqueles relacionados com as proteínas transductoras de sinais envolvidos nas vias que regulam a formação e funcionamento do cérebro.

4.6.4-Regulação epigenética e produção animal.

Genes imprinting

(Dolinoy et. al., 2007)

A vasta maioria dos genes autosomais são expressos a partir dos alelos de ambos os pais, no entanto alguns genes reguladores do crescimento são controlados por um processo epigenético denominado

“imprinting” genómico (Ref. 13, 30 citadas em Dolinoy et. al., 2007), forma de hereditariedade não mendeliana que como já referimos não envolve alterações na sequência do DNA, mas sim alterações na metilação desse DNA, e modificação nas histonas, que são transmissíveis através da divisão celular.

Como vimos o imprinting genómico constitui um fenómeno epigenético no qual apenas um alelo de um dado gene é expresso, dependendo portanto o fenotipo da sua origem parental (Ref. 1 e 2 citadas em O’Sullivan et. al., 2007).

Expressão de um simples alelo funcional de um gene imprinting está pois dependente da origem do seu ascendente (pai ou mãe).

Nestas circunstâncias não ocorre a normal protecção permitida pela diplóidia contra mutações recessivas, e por outro lado a funcionalidade destes genes haplóides pode ser desregulada por factores ambientais não genotóxicos (Dolinoy et. al., 2007).

Nestas circunstâncias genes “imprinting” são mais susceptíveis ao desenvolvimento de perturbações patológicas.

Genes imprimidos (Thomsen, P.D., 2007)

Os genes imprimidos (imprinted) constituem uma classe especial de genes epigeneticamente modificados (Thomsen, 2007).

Os genes imprinted são expressos preferencialmente quer do alelo herdado da mãe, quer do alelo herdado do pai (Khatib, H., 2004).

Nos mamíferos os genes imprinted regulam o crescimento fetal, o seu desenvolvimento o funcionamento da placenta e o comportamento postnascimento (Ref. Reik e al., 2003 citados em Khatib, 2004).

Variações no estado “imprinting” dos genes imprinted podem ser responsáveis por variações genéticas, dificuldades nos partos e mortalidade perinatal.

Também diferentes níveis de metilação do DNA (uma das formas de regulação epigenética) de genes importantes estão relacionados com distintas características dos animais experimentais podendo contribuir para a sua resistência ou susceptibilidade às doenças (Epigenetic case studies in agricultural animals).

Este “imprinting” dos genes interfere com a ligação a estes de proteínas reguladoras regulando dessa forma a transcrição dessa região genómica.

A diferença da expressão nos genes imprinted das duas cópias do gene é determinada pelo sexo do ascendente. Assim em alguns destes genes imprinted é a cópia paterna que é silenciada. (o gene paterno está imprinted) e em alguns genes é a cópia materna que está imprinted.

Apenas um pequeno conjunto de cerca de 90 genes (no ratinho e ser humano) dos cerca de 30.000 genes dos mamíferos são imprinted (<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>).

O imprinting dos genes constitui pois um caso especial de modificação epigenética e como

referimos os genes imprinting estão sobretudo envolvidos no desenvolvimento fetal e do cérebro.

Nos animais das espécies pecuárias existem diversos exemplos dos efeitos dos genes imprinting, como é o caso do LOS (síndrome da descendência grande) caracterizada por um aumento de peso à nascença de 8% a 50%, aumento do tempo de gestação, problemas respiratórios à nascença e mais mortalidade perinatal, e que têm sido assinalados em bovinos e ovinos.

Outro efeito de genes imprinting é o cruzamento de cavalos ou éguas com asininos (burras ou burros) em que se obtêm duas espécies de descendência diferindo em diversas características tudo dependendo de que espécie é o pai.

As mulas resultam do cruzamento de égua com burro, e os machos quando se trata do cruzamento entre burra e cavalo. Parece plausível que estas diferenças resultem de diferenças do imprinting genómico dos cavalos.

Outro exemplo de imprinting é aquele observado em certos desenvolvimentos musculares demonstrado recentemente em suínos e ovinos.

No caso dos suínos, uma mutação reguladora no gene *Igf2* origina um efeito maior QTL no crescimento muscular (Ref.11 citada em Thomsen, 2007), enquanto nos ovinos uma mutação *callipyge* influencia o desenvolvimento muscular dos membros posteriores dos ovinos (Ref.12 citada em Thomsen, 2007).

Num estudo muito curioso feito com diversos genes “imprinted” (Khatib et. al., 2007) de ratinhos, bovinos e seres humanos verificou-se que de 22 genes investigados 11 eram imprinted nas três espécies.

Fazemos de seguida uma comparação entre as características observadas de alguns genes ortólogos de ratinho e bovinos (Quadro 9).

Quadro 9 (Ver final do texto)

Como se verifica no quadro anterior a característica de imprinted de um mesmo gene pode variar de espécie para espécie.

Diversos autores têm procurado averiguar quando os genes imprinted têm características das suas sequências nucleotídicas que os distinguem de genes não imprinted.

Parece poder-se referir a este propósito o seguinte (Khatib et. al., 2007).

Genes imprinted versus genes não imprinted

- Menor incidência de SINES
- Menor densidade de ilhas CpG e SINES nas regiões flaqueadoras
- Maior densidade de LINEs

O gene *Igf2* de mamíferos o mais estudado a este propósito, e que pode encontrar-se na forma “imprinted” e não “imprinted” revelou que a forma imprinted está associada com a perda de SINES (Ref. Weidman et. al., 2004 citado em Khatib et. al., 2007).

Referem-se seguidamente características das sequências de uma série de genes imprinted em bovinos (Quadro 10)

Quadro 10 (Ver final do texto)

No entanto há provas acumuladas de que existe uma conservação limitada através das espécies no que se refere aos genes imprinted.

Callipyge em ovinos
Hipertrofia callipyge nos músculos do esqueleto de ovinos
(Vuocolo et. al., 2007)

Esta mutação callipyge nos ovinos origina uma hipertrofia muscular nos membros pélvicos e lombos, após o nascimento dos animais, com pequeno ou nenhum efeito muscular nos quartos anteriores.

Os músculos destes animais, são menos gordurosos e há um aumento de 10% no índice de conversão alimentar.

Ocorrem simultaneamente muitas mudanças na expressão de uma série de genes imprinted que flanqueiam o local da mutação, uma região intergénica na extremidade telomérica do cromossoma 18 dos ovinos.

Ocorre nesta situação uma diminuição de fibras do tipo I (oxidativas lentas) e uma conversão para fibras do tipo IIX e IIB (glicolíticas de contração rápida).

Os autores deste estudo propõem uma rede de interações destes genes com modificação epigenética das histonas.

O fenótipo callipyge apresenta uma forma de hereditariedade não mendeliana, sendo esse fenotipo apenas expresso pelos heterozigotos que herdaram a mutação do seu ascendente paterno (Ref. 16, 32 citadas em Vuocolo et. al., 2007). Investigações sobre o perfil da hereditariedade do fenótipo callipyge revelaram que ele só é evidente quando transmitido pelo pai e a hereditariedade a partir de uma ovelha mãe afectada não origina callipyge, o que sugere que esteja envolvido “imprinting” pois os genes imprinted são expressos a partir de apenas um alelo de uma forma que depende da sua origem parental (Murphy et al.. (2006).

O locus callipyge (CLPG) está localizado num segmento cromossómico de cerca de 400 Kb que contem quatro genes (Dlk1, Gtl 2, Peg11 e Meg 8) que são preferencialmente expressos nos músculos do esqueleto e sujeitos a imprinting parenteral neste tecido.

O fenótipo callipyge nos ovinos afecta só os indivíduos heterozigotos que receberam a mutação CLPG (callipyge) do pai (Georges, et al.. 2003)..

Nos ovinos callipyge os mutantes homozigotos não exibem o fenótipo de hipertrofia muscular indicando que uma biologia mais complexa operará , além dos modelos de imprinting standard.

Está identificada uma única mutação com troca da base A para G na região intergênica dos dois genes imprintados Dlk1 e Gtl 2 que origina o fenótipo callipyge.

O Dlk 1 é um gene expresso pela via paterna que codifica um membro do factor de crescimento epidérmico.

O Gtl 2 é expresso a partir do cromossoma herdado da mãe e codifica múltiplos transcritos “spliced” de diversas formas e que se pensa funcionarem como ncRNAs.

Enquanto a presença da mutação callipyge não altera o “imprinting” destes genes, os níveis de transcrição dos genes ligados em *cis* com a mutação são substancialmente influenciados indicando um efeito local que é independente do imprinting (Murphy et al. 2006).

A mutação CLPG ocorre provavelmente num elemento de controlo de gama extensa dentro do domínio imprintado Dlk1- Gtl 2.

Há sugestões de que o único modelo de hereditariedade do callipyge, denominado “polar overdominance” resultaria da combinação de um *Cis*-efeito da mutação CLPG sobre os níveis de expressão dos genes do domínio imprintado Dlk 1- Gtl 2 e a *trans* interacção entre os produtos, reciprocamente, de genes imprintados.

O domínio “imprinted” Dlk 1- Gtl 2 engloba o locus callipyge (CLPG) nos ovinos –víde figura 19 a seguir- e nele reside um grande numero de genes miRNA expressos da via materna (Davis et al., 2006).

Dois destes miRNA genes (o mir 127 e mir 136) são processados a partir de um transcrito (anti Peg 11) que é um antisense para Rtl 1/ Peg 11, um gene sem intrões expresso da via paterna.

Davis e col. demonstraram que diversos outros miRNAs são processados a partir de antiPeg 11 e estes regulam Rtl 1/ Peg 11 em *trans* ao conduzirem a quebra dos seus mRNA através do RISC.

Os miRNA através de RNAi estão envolvidos nos genes imprintados nos mamíferos.

Resumindo a região imprintada Dlk 1- Gtl 2 do genoma mamífero que nos ovinos engloba o locus callipyge (que tem uma forma invulgar de hereditariedade) codifica uma serie de miRNAs expressos pela via materna, cinco dos quais contidos no transcrito antisense antiPeg 11, alvejam degradando o Peg 11mRNA expresso pela via paterna através de um mecanismo mediado de RNAi (Lewis. e Redrup ,2005) ,(Figura 19).

Figura 19 (Ver final do texto)

O domínio “imprinted” Dlk 1-Gtl 2 engloba o locus callipyge (CLPG) ovino.

As interacções *trans* mediadas por RNAi num locus imprintado estão bem estudadas tal como alguns ncRNAs imprintados parecem ter efeitos repressivos apenas em *cis*.

A região domínio Dlk1-Gtl 2 “imprinted” contem três genes codificadores de proteínas expressos, provenientes do alelo doado pelo pai, assim como genes de diversas categorias provenientes da mãe expressando ncRNAs

microRNAs (miRNAs) provindo da mãe dirigem a degradação de mRNA proveniente do alelo do pai expresso pelo Peg11 por uma via mediada por RNAi.

O imprinting do cromossoma materno é controlado por uma região intergênica, diferentemente metilada (IG-DNR) acima do Gtl 2, mas o mecanismo regulando o imprinting do cromossoma paterno não está identificado (Ref. 5 citada em Lewis e Redrup.2005)..

NESP 55 em bovinos
Imprinting do gene Nesp 55 nos bovinos
(Khatib, 2004)

A transmissão sináptica é mediada pela exocitose de vários neurotransmissores, os clássicos glutamato, γ -aminobutirato, acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina e diversos peptídeos secretados normalmente e antes de segregados contidos em grandes vesículas e a um pI ácido 4-5, sendo no seu conjunto designado como cromograninas.

Nestas cromograninas foi caracterizada uma proteína segregadora neuroendócrina denominada NESP 55 que é expressa na medular da supra-renal, pituitária e cérebro e que tem um Mr de 55.000.

Esta proteína ácida NESP 55 é processada no interior das vesículas secretórias para peptídeos mais pequenos (Ischia, et. al., 1997).

A proteína NESP é expressa por um gene “imprinted” exclusivamente transcrito a partir do alelo materno.

O exão codificante da proteína secretoria neuroendócrina Nesp 55, é transcrito exclusivamente do alelo materno nos bovinos assim como nos ratinhos e humanos.

Até 2001 (Ref. Killian et. al. citado em Khatib, 2004), apenas havia um gene imprinted assinalado nos bovinos o M6P/IGF2R.

Khatib em 2004 investigou o estado imprinting do locus GNAS1 nos bovinos.

Este locus GNAS 1 codifica a subunidade α da proteína Gs (guanine nucleotide binding protein) que estimula a adenilato ciclase após estimulação hormonal.

Esta GNAS tem 4 exões, os Nesp 55, XL α S, 1A e Gs α 1.

Até 2006 apenas alguns (poucos) genes “imprinted” têm sido referidos (como vimos anteriormente) nos bovinos relativamente aos seres humanos e ratinhos (Zaitoun e Khatib, 2006).

Nos tecidos bovinos têm sido assinalados os genes imprinting tais como IGF2R (Ref. 2, citado em Zaitoun e Khatib, 2006), XIST, IGF2, GLT2 (Ref.3, citada em Zaitoun e Khatib, 2006), PEG3 (Ref. 4, citada em Zaitoun e Khatib, 2006), NESP 55 (Ref 5, citada em Zaitoun e Khatib, 2006), H19 (Ref 6, citada em Zaitoun e Khatib, 2006) e NNAT (Ref. 7, citada em Zaitoun e Khatib, 2006).

O gene H19 codifica uma molécula de RNA não traduzida (Ref. 4, citada em Zaitoun e Khatib, 2006), e é um dos genes imprinting melhor estudados, sendo expresso a partir do alelo materno, nos bovinos, ratinhos e seres humanos, encontrando-se o alelo paterno silenciado ou próximo do silenciamento (Ref. 5 e 6 citadas em Zhang et. al. 2004).

A função do transcrito H19 não é clara, embora se saiba que no ratinho e em humanos como está

próximo do gene *Igf2* regula o imprinting deste gene *Igf2* (Ref. 8, citado em Zhang et. al., 2004), através de um elemento de controlo imprinting comum.

A expressão monoalélica “imprinted” do gene *Igf2R* de diversos tecidos de canídeo (*Canis familiaris*) ocorre na ausência de transcripto anti-sense ou metilação do promotor.

No caso do gene imprinting *Igf2R* derivado do cordão umbilical de canídeo, foi identificado o alelo expresso, como derivado da mãe.

O gene imprinted *Igf2R* de canídeo assemelha-se ao gene *Igf2R* imprinted de ratinho ao ter uma ilha CpG no intrão 2 que é semi-metilado. Contudo ele difere do gene do ratinho no facto da manutenção da sua expressão monoalélica, não necessitar da expressão de um transcrito anti-sense do alelo derivado paternalmente, ou da metilação do reprimido promotor *IGF2R* (O’Sullivan et. al., 2007).

4.6.5-Regulação epigenética e domesticação de animais.

Mudanças de comportamento das aves transmitidas à descendência em resposta a alterações ocorridas no meio envolvente

Estudos realizados com galináceos, na Suécia e na Noruega por Lindqvist et al., sugerem que a expressão de alguns genes em resposta ao stress e a alguns comportamentos dos animais são transmitidos através das gerações.

É conhecido que o stress pode afectar a descendência dos animais através de mecanismos não genéticos, mas hoje há evidências de que modificações epigenéticas hereditárias dos genomas estarão também envolvidas nesta transmissão à descendência.

Neste trabalho referido em cima (Lindqvist et. al. 2007) em que se utilizou um cDNA microarray de todo o genoma das aves ensaiadas verificou-se que as mesmas modificações no perfil da expressão de genes hipotalâmicos originadas pelo stress nos ascendentes poderá também ser observada nas aves descendentes.

Cerca de 31 genes são regulados positivamente ou negativamente no hipotálamo e pituitaria das aves descendentes de aves stressadas, o que não sucedia nas aves descendentes de aves não stressadas.

Os autores deste estudo avançam com dois possíveis mecanismos para explicar este fenómeno. Num deles admitem que as marcas epigenéticas em genes específicos desencadeadas pelo stress, seriam transmitidos directamente à descendência, não sendo portanto erodidos durante a meiose, e reforçam esta possibilidade com o facto de em vertebrados estarem assinaladas marcações epigenéticas (epialelos) que são preservados através das gerações constituindo o que se designa por “soft inheritance” das características adquiridas (Ref. 12, citado em Lindqvist et. al. 2007). No outro mecanismo possível admitem que a marcação epigenética possa ter sido adquirida “de novo” no ovo através da acção de hormonas esteróides depositadas pela mãe e relacionadas com o stress (Ref. 6 citada em Lindqvist et. al., 2007).

Ainda curiosamente os mesmos autores deste estudo (Lindqvist et. al., 2007) assinalam que a expressão dos genes dos ascendentes machos parecem ser mais afectados que a das fêmeas.

Estes dados obtidos por Lindqvist e al. nas aves, por comparação entre aves domésticas (white

Leghorn Layers) e RJF (uma raça ancestral de todas as galinhas domésticas) (Ref. 13 citada em Lindqvist et al.,2007), parecem indicar que as alterações na expressão dos genes podem estar correlacionadas com alterações do comportamento dos animais, deixando em aberto a possibilidade de considerar que a domesticação dos animais possa ter ocorrido através da seleção dos animais que possuam uma capacidade aumentada para responder ao stress do meio envolvente, indo afectar os fenótipos dos animais descendentes em cativeiro (Lindqvist et. al. 2007).

4.6.6-Epigenética e nc RNAs

Regulação epigenética e transferência através do zigoto de moléculas de RNA

Hereditariedade epigenética (não-Mendeliana)em ratinhos no gene Kit, associada com transferência zigótica de moléculas de RNA

Foi verificado num estudo (Rassoulzadegan et. al.2006) que uma modificação da expressão fenotípica do alelo do gene codificante do receptor Kit em ratinho era devido a uma paramutação.

Uma paramutação é uma interacção entre locus alélicos que leva a alterações hereditáveis no estado de expressão de um dos alelos do gene (Richards, 2006), ou seja, a paramutação é uma interacção entre dois alelos de um único locus que origina uma mudança hereditável de um alelo.

A paramutação é uma modificação epigenética meioticamente estável que ocorre pois devido á interacção entre alelos em heterozigotos.

O locus Kit foi o primeiro exemplo de um gene paramutável identificado no ratinho (Arnheiter, 2007).

O gene Kit tem diversas funções além da pigmentação da pele e dos pêlos sendo importante no desenvolvimento do tracto gastrointestinal, dos mastocitos e das células reprodutivas masculinas sendo uma citocina receptora (receptor tirosina cinase que recebe e transmite sinais).

O gene Kit compreende 21 exões e mutações neste gene têm sido identificadas como causa de diversas manchas brancas na pelagem de cavalos, estando no ratinho referenciadas mais de 90 mutações sendo algumas delas responsáveis pelo aparecimento de manchas brancas e pela cor branca das pelagens.

Um locus paramutável (ou seja um locus que pode ser paramutado) é induzido por um locus paramutagénico (um locus capaz de induzir uma paramutação) enquanto um locus paramutado é um locus paramutável após a sua modificação.

Uma paramutação é pois uma variação epigenética hereditável do fenótipo de um alelo “paramutável”, iniciada pela interacção em heterozigotos possuindo uma forma “paramutagénica” do locus.

O gene Kit dos melanócitos sujeito a uma mutação pode modificar o alelo Kit do tipo “selvagem” (wilde type) de uma forma tal que a cópia do tipo selvagem produz após isso um fenótipo com uma coloração de pelagem do tipo Kit- mutante-like.

Há dois modelos para explicar esta paramutação a nível molecular. Num deles a região de um cromossoma com a estrutura da cromatina alterada interatuaria com uma região homóloga de outro e forçaria esta a sofrer uma modificação similar, talvez por transferência de complexos de cromatina alterada de uma sequência para outra. No outro modelo um longo RNA interferiria com a função de um locus paramutável, ou um pequeno RNA interferente (si RNA) levaria à degradação de RNA transcrito do locus paramutável com ou sem associação de cromatina alterada. Este RNA interferente podia provir do locus paramutagenico ou do locus paramutável. (Arnheiter, 2007).

O fenótipo paramutado é transmitido de uma forma não-Mendeliana.

Nos ratinhos os animais “paramutados” (kit) genotipicamente do tipo Wild, mantêm o fenótipo das manchas brancas na extremidade da cauda (que é característico das mutantes Kit), na ausência de alelo mutante (vide figura 20 seguinte).

Rassoulzadegan et. al. (2006) investigaram ratinhos com uma mutação Tm 1 Alf no gene Kit, através de uma construção obtida por engenharia genética (Ref. 5 citada em Rassoulzadegan et. al., 2006).

Esta mutação Tm 1 Alf abolia a síntese do receptor tirosina Kit, um elemento crítico para diversos processos de desenvolvimento, inclusive para a diferenciação germinal, hematopoiese e melanogénese.

Homozigotos Kit Tm 1 Alf morriam logo após o nascimento, e os heterozigotos revelavam manchas brancas na ponta da cauda e nas extremidades dos membros.

O fenotipo paramutado é herdado com uma extensão fenotípica variável, dependendo dos cruzamentos.

O grau de manchas brancas aumenta em sucessivos cruzamentos entre heterozigotos Kit Tm 1 Alf/+ e é mais fracamente expresso nos cruzamentos com parceiros de tipo “selvagem”.

Descendência de homozigotos Kit paramutados mantêm o fenótipo paramutado quando cruzados entre si, mas perdem progressivamente este fenótipo quando cruzados com animais de tipo “selvagem”.

Homozigotos Kit+/+ nascidos de heterozigotos Kit Tm 1 Alf/+ mantêm e transmitem à sua descendência a característica fenotípica das manchas brancas das mutantes heterozigotas que resultam de uma diminuição do nível de Kit mRNA com acumulação de moléculas de RNA não-poliadenilado de tamanhos anormais.

Na descendência paramutada (Kit*) ocorre uma redução de duas vezes no Kit mRNA poliadenilado.

Neste estudo antes referido foram feitos cruzamentos entre heterozigotos transportando o alelo de tipo “selvagem” codificando o receptor Kit, e um alelo anulado (null) produzido pela inserção da cassette LacZ-Neo no primeiro exão do gene (mutação Tm 1 Alf).

O alelo Kit + do tipo “selvagem” (um locus paramutável) codifica como já referimos um receptor tirosina cinase.

No alelo Kit Tm 1 Alf uma sequência bacteriana codificadora LacZ foi introduzida, ou melhor, fundida com os primeiros seis codões da sequência sinal Kit, seguido por um sinal poly A na mesma direção transcriptional, mais uma cassette de resistência à neomicina. Este alelo Kit Tm 1 Alf não produz proteína KIT funcional que é necessária para a hematopoiese e leva à morte dos animais homocigotos logo após o nascimento. Os heterocigotos sobrevivem mas os reduzidos níveis de KIT dificultam o desenvolvimento dos melanócitos e daí as manchas brancas de diversos tamanhos na cauda e nas extremidades dos membros (Arnheiter, 2007).

Os genótipos de ratinhos normais não mutados (Kit +/+) (Wild-type) utilizados na investigação em epígrafe, e os genótipos de ratinhos mutados heterocigotos foram identificados através de análises por PCR e confirmadas por “Southern blot”.

O cruzamento entre ratinhos mutados heterocigotos com ratinhos não mutados ou entre heterocigotos mutados e após análise dos seus genótipos e fenotipo produziram diversas situações.

Assim estes cruzamentos produziam ratinhos com o genótipo Kit tm 1 alf/+ e com as manchas brancas atrás referidas e ratinhos sem estas manchas brancas e com genótipo Kit+/+ e ratinhos com manchas brancas e genótipo com o alelo Kit+ na forma “paramutada”(fenotipo Kit*).

A ocorrência desta forma modificada “paramutada” do alelo Kit+ (fenotipo Kit*) não se restringia à descendência dos cruzamentos entre heterocigotos, mas observava-se também no cruzamento de Kit tm1 alf/+ com tipos normais, independentemente da combinação dos sexos.

O fenotipo paramutado era herdado com uma extensão fenotípica variável consoante os cruzamentos.

Rassoulzadegan et al. verificaram que os heterocigotos Kit Tm 1 Alf/+ produziam Kit RNAs anormais.

Em condições normais Kit mRNAs de tamanho normal são expressos em diversos tecidos além dos melanócitos, inclusive no cérebro e testículos. Os espermátides dos animais heterocigotos exprimem maiores quantidades do que as normais de Kit mRNA com o tamanho normal e também de Kit RNAs truncados (tr- Kit RNAs) iniciados de um promotor no intrão 16 e estendendo-se pelos exões 17-21.

As quantidades invulgares de RNA de múltiplos tamanhos no esperma dos machos paramutados (Kit*) e de heterocigotos parece indicar que a sua hereditariedade seja mediada pelo RNA. Microinjeções de embriões de uma célula, com RNA do esperma de machos paramutados ou de microRNAs (miR-221 e -222) Kit específicos reforçam este ponto de vista.

Provas do papel do RNA no estabelecimento de estados epigenéticos parecem apoiar-se na transferência zigótica de moléculas de RNA:

A presença de RNA no esperma levou os autores deste estudo (Rassoulzadegan et. al. 2006) a admitir que a transferência desse RNA para o ovo fertilizado constituísse o sinal que levaria ao fenótipo paramutado, o que foi confirmado pela série de ensaios realizados (Figura 20) .

Figura 20 (Ver final do texto)

A injeção de RNA Kit em ovos fertilizados de ratinho pode produzir defeitos epigenéticos hereditáveis, ou paramutações, com relevante perda da função de fenótipos pigmentados, o que afecta os fenótipos adultos em gerações sucessivas de ratinhos (Wagner et. al., 2008).

M. Rassoulzadegan (citando Wagner et. al. 2008; Rassoulzadegan et. al. 2006), assinala que conseguiu a indução, por RNA e hereditariedade, de uma hipertrofia cardíaca epigenética em ratinho (Wagner et. al. 2008) assinalando que os seus resultados realçam a diversidade de efeitos epigenéticos mediados por RNA podendo constituir um paradigma para casos clínicos de doenças familiares cuja hereditariedade não é plenamente explicada em termos Mendelianos.

miRNAs como reguladores da expressão dos genes

Admitem alguns autores (McCarthy e Esser, 2007), que os miRNA podem regular até cerca de 1/3 do genoma dos mamíferos, sugerindo-se que os miRNA tenham um papel central na regulação da expressão dos genes (Ref. 28 citada em McCarthy e Esser, 2007).

miRNAs podem afectar mecanismos epigenéticos ao alvejarem enzimas chaves envolvidas no estabelecimento de memórias epigenéticas (Chuang e Jones, 2007). Há evidências recentes que sugerem que esses miRNAs estão interrelacionados com a metilação do DNA e a modificação das histonas. Assim por exemplo o miR-140 alveja a enzima HDAC4 (histona desacetilase 4) envolvida na modificação das histonas e é possível que outros miRNAs interactuem com outros alvos como por ex: DNMTs (metiltransferases) envolvidas na modificação do DNA.

Está também admitido, que alteração na expressão de miRNA específicos dos músculos tenham um papel na adaptação a sobrecargas funcionais em massas musculares (McCarthy e Esser, 2007).

A diferenciação de linhagens hematopoiéticas também está referida como sendo modulada por micro RNA (Ref.9 citado em McCarthy e Esser, 2007).

É conhecido que o micro RNA – 143 regula a diferenciação de adipocitos (Ref. 14 citada em McCarthy e Esser, 2007), e a desregulação da expressão do gene micro RNA está assinalada em cancro mamário humano (Ref.20 citada em McCarthy e Esser, 2007).

A secreção de insulina também é regulada por um micro RNA específico das ilhotas pancreáticas (Ref. 32 citada em McCarthy e Esser, 2007), assim como factores miógenicos.

Papeis dos miRNA na biologia muscular e na tolerância ao álcool.

(Callis, et. al., 2008)

Durante a hipertrofia dos músculos do esqueleto sabe-se que está diminuída a expressão dos micro RNA 1 e micro RNA1339.

Também uma mutação no gene da miostatina que nestas circunstâncias passa a poder interactuar ilegitimamente com um micro RNA, afecta a muscularidade em ovinos da raça Texel (Clop et. al. 2006; Omia, 2813 e 240-20-91).

No alelo GDF8 dos ovinos Texel na região 3'UTR ocorre uma alteração de G para A o que origina um local alvo para os mir 1 e mir206 (miRNA) que são expostos em altas concentrações nos músculos do esqueleto. Daí inibição da tradução do gene da miostatina e hipertrofia muscular.

A análise de bases de dados de SNP (polimorfismos num único nucleótido) demonstra que são abundantes mutações que possam criar ou destruir possíveis alvos para miRNA, que poderão por esse mecanismo regular a variação fenotípica (Omia, 2813)

Os miRNA regulam negativamente a expressão dos genes após a sua transcrição.

Os envoltimentos dos miRNA no desenvolvimento dos músculos cardíacos e esqueléticos tal como em diversas doenças relacionadas com as massas musculares inclusive hipertrofia cardíaca, arritmias cardíacas e distrofias vão sendo melhor conhecidas (Quadro 11).

Quadro 11 (Ver final do texto)

Também curiosamente se verificou o papel de um miRNA na tolerância ao álcool.(The role of miRNA...).

Um dos principais alvos do álcool no sistema nervoso (sistema hipotalamo-neurohipofisal – HNS e Striatum) é um canal BK (Slowpoke, Maxik) ou seja um canal de potássio activado por voltagem e grande condutância de cálcio.

Este canal BK tem um importante papel no comportamento e tolerância molecular ao álcool nos vertebrados e invertebrados.

O canal BK é constituído por transcritos “splited” alternativamente (isoformas) de um gene único BK que codifica uma α – subunidade, principal formadora do poro deste canal.

A forma e função deste canal BK é alterada por regulação por um microRNA.

A exposição ao álcool altera o nível de expressão de BK assim como das isoformas que constituem o canal reduzindo as variantes da transcrição BK, ou seja, dos respectivos mRNA nos neurónios.

O álcool aumenta a expressão de um miRNA (mirR-Q) ao mesmo tempo que regula negativamente a expressão do mRNA do canal de BK, podendo contribuir para o desenvolvimento do alcoolismo.

4.6.7-Conclusão sinóptica

Parece iniludível que uma série de marcações epigenéticas nos animais são específicas de determinadas situações fisiológicas normais e patológicas, paranormais, ou resultantes de

determinadas práticas de manejo animal, aprendizagem e memorização, podendo pois ser inferidas inúmeras consequências para a prática de Medicina Veterinária ou da Produção e Maneio Animal.

São assim estabelecidos numa base molecular aspectos específicos e provavelmente primordiais de diversos fenótipos animais o que até há bem pouco tempo não tinha sido ainda alcançado.

O carácter reversível de cada uma destas situações, a sua transmissão mitótica e ou meiótica parecem abrir o horizonte para novas e amplas estratégias, pois só os genomas, entendidos como as sequências nucleotídicas (genéticas), não são os exclusivos responsáveis pelos fenótipos celulares ou animais, sendo as marcas epigenéticas ao longo de todo o genoma (epigenoma) determinantes neste aspecto.

Poder-se-á afirmar que à medida que os epigenomas forem sendo revelados (e há vários Consórcios Internacionais a trabalhar neste campo) além de se dispor de uma poderosa ferramenta no campo da biologia molecular básica, uma nova era será construída no mundo da biologia aplicada.

Nota: As designações eventuais rato ou ratinho (mouse para os anglo-saxónicos) adoptadas no texto correspondem à espécie *Mus musculus* enquanto a designação ratazana (rat para os anglo-saxónicos) corresponde à espécie *Rattus norvegicus*.

Bibliografia

Allegrucci, C. et al.. (2005) .Epigenetics and the germline.*Reproduction* 129;137-149

Application note: Methylation-sensitive high-resolution melting analysis on 7500 Fast Real-Time PCR System-Applied Biosystems.

Arnheiter, H. . (2007). Mammalian paramutation: a tail's tale?. *Pigment Cell Res.* 20(1): 36-40.

As leis de Mendel. <http://www.geocities.com/~esabio/Mendel.htm>

Barski, A. et al..(2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome.*Cell* 129; 823-837.

Bennet, D.C. e Lamoreux, L. (2003). The color Loci of mice. A genetic century.*Pigment Cell Res.* 16:333-344.

- Bock, C. e Lengauer, T. (2008). Computational epigenetics. *Bioinformatics* 21 (1);1-10.
- Branco, M. R. e Pombo, A.. (2006). Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *Plos Biology*.4 (5),e138
- Breslin, M. B. et al.. (2001). Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* 15(8): 1381-1395.
- Callis, T. E. et al..(2008). Muscling through the micro RNA world. *Exp, Biol. Med.* 123:131-138
- Chromatin immunoprecipitation. Wikipedia, the free encyclopedia.
- Chuang, J. C. e Jones, P. A. (2007). Epigenetic and MicroRNAs. *Pediatric Research* 61 (5). Pt2:24R29R.
- Clop, A. et al.. (2006). A mutation creating a potential illegitimate micro RNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics* 38: 813-818.
- Correia, J. H. R. Dias e Correia, A. A. D. (2007). Funcionalidades dos RNA não codificantes (ncRNA) e pequenos RNA reguladores, nos mamíferos. (RNA non-coding –ncRNA- functionalities and small RNA regulators in mammals). REDVET. Revista electronica de Veterinaria 1695-7504. Volume VIII Numero 10.
- Cropley, J. E. et al.. (2006). Germ-line epigenetic modification of murine Avy allele by nutritional supplementation. *PNAS* 103(46):17308-17312.
- Davis, E. et al..(2006). RNAi mediated allelic *trans*-interaction at the imprinted *Rtl 1/ Peg 11* locus. *Current Biology* 15:743-749.
- Dinger, M. E. et al..(2008). RNAs as extracellular signaling molecules. *Journal of Molecular Endocrinology* 40:151-159.
- Dolinoy, D. C. et al.. (2007). Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatric research* 61(5):30R-37R
- Duhl, D. M. et al.. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat. Genet.*8(1): 59-65.
- Encyclopedia of Genetic, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Part 1. Genetics.1.3. Epigenetic.2005. John Wiley & Sons.
- Epigenetic case studies in Agricultural Animals. USDA- Research Project 09/13/ 2005.
- Feng, Y. Q. et al.. (2006). DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *Plos Genetics* 2(4) e 65:0461-0470.
- Georges, M. et al. (2003). The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes, *Trends Genet.* 19(5).248-52.
- Gilbert, N. et al. (2004). Chromatin architecture of the Human Genome: gene-rich domain are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118:556-566.

Gilbert, N. et al.. (2007). DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compactions. *Journal of Cell Biology* 177(3): 401-411.

Gutierrez-Gil, B. et al.. (2007).. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaemelanin pigments in an F2-Backcross Charolais x Holstein population. *BMC Genetics* 8:56

Homeotic gene.Wikipedia, the free encyclopedia.

Henikoff, S. et al..(2004). Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends in Genetics* 20(7): 320-326.

Imprinted genes. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/Imprinting...>

Ischia, R. et al.. (1997). Molecular cloning and characterization of NESP 55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5 . HT 1B receptor antagonistic activity. *J. Biol. Chem.* 272 (17): 11657-11662.

Jablonka , E. e Lamb, M. J..(1995).Epigenetic inheritance and evolution. The Lamarckian Dimension. Oxford University Press. Pag. 91.

Jasny, B. (2007). Target identification tool. *Sci. STKE* 390, p.tw 210.

Johnson, D. S. et al.. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein- DNA interactions. *Science*, 316:1497-1502.

Khatib, H. et al..(2004). Imprinting of Nesp 55 gene in cattle. *Mammalian Genome* 15, 663-667.

Khatib, H. et al. (2007), Comparative analysis of sequence characteristics of imprinted genes in human, mouse, and cattle. *Mammalian genome* 18 : 538-547.

Killian, J. K. et al. (2000). M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Molecular Cell* 5, 707-716.

Lewis, A. e L. Redrup. (2005). Genetic imprinting:conflict at the Callipyge locus.*Current Biology* 15(8):R291-R294.

Li , E. et al. (1993). Role of DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366 (6453) :362-5.

Lin , J. Y. e Fisher , D. E.. (2007). Review article melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445: 843-850.

Lindqvist , C. et al..(2007). Transmission of stress-induced learning impairment and association brain gene expression from parents to offspring in chickens. *Plos One* 2 (4) e 364

Liu, D. et al. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.

Low , W. e Lin , S. C.. (2004). Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 13 (3) : 99-113.

Mattick, J. S. (2001). Non-coding RNAs: the architects of eukariotic complexity. *EMBO Journal* 21

(11): 986-991.

McCarthy, J. J. e Esser, K. A.. (2007). MicroRNA-1 and micro RNA- 133^a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 102: 306-313.

Morrison, I. M. et al.. (2005). A census of mammalian imprinting. *Trends in Genetics* 21 (8). 457-465.

Murphy, S. K., et al. (2006). Callipyge mutation affects gene expression in *cis* : A potential role for chromatin structure. *Genome Research* 16340-346.

Nakao, M.. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 218 (1-2) :25-31.

Nakatani, Y. et al.. (2006). How is epigenetic information on chromatin inherited after DNA replication. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* (57): 89-96.

Non-Mendelian inheritance- Wikipedia, the free encyclopedia.

OMIA- Online Mendelian Inheritance in Animals. Muscular hypertrophy, Texel (Phene I D 2813, Group 001426) in *Ovis aries*.

Ooi, S. L. Henikoff, S. (2009). Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* , 19 (3): 257-65.

Oommen, A. M. et al.. (2005). Roles for nutrients in epigenetic events. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16. 74-77.

O' Sullivan, F. M. et al.. (2007). Imprinted expression of the canine IGF2R, in the absence of an anti-sense transcript or promotor methylation. *Evolution & Development*, 9(6):579-589.

Peaston, A. E. e Whitelaw, E.. (2006). Epigenetics and pheno typic variation in mammals. *Mammalian Genome* 17 :365-374.

Pusarla, R. H. e Bhargava, R.. (2005). Histones in functional diversification. *FEBS Journal* 272: 5149-5168.

Rajasekhar, V. K. e Begemann, M. (2007). Concise Review: Roles of Polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* 25:2498-2510.

Rakyan, V. K. et al.. (2002). Metastable epialleles in mammals. *Trends Genet.* 18 (7) :348-51.

Rakyan, V. K. et al.. (2003). Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin Fu alleles occurs after maternal and paternal transmission. *PNAS* 100 (5): 2538-2543.

Rakyan, V. K. e Bech, S.. (2006). Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Current Opinion in Genetics Development* 16: 573-577.

Rassoulzadegan , M. et al.. (2006). RNA-mediated non-Mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441: 469-474.

Reik, W. et al.. (2003). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and

therapy. *Theriogenology* 59 (1). 21-32.

Reik, W.. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447:425-432.

Richards, E. J. .(2006). Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. *Nature Reviews* 7: 395-401.

Ringrose, L. e Paro, R.. (2007). Polycomb /Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity *Development* 134: 223-232.

Schneider, R. e Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & development* 21:3027-3043.

Schuettengruber, B. et al.. (2007). Genome regulation by Polycomb and Trithorax proteins. *Cell* 128: 735-745.

Seo, K. et al.. (2007). Biology of epidermal and hair pigmentation in cattle : a mini-review. *Vet. Dermatol.* 18 (6) : 392-400.

Sirard, Marc-Andre. (2003). Oocyte maturation. Bovine embryo Gene collection.

Slominski, A. et al.. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84: 1155-1228.

Soloway., P. D. (2006). Genetic: Paramutable possibilities:Model for paramutation at Kit as proposed by Rassoulzadegan et al..*Nature* 441:413-414.

Spitzer, J. J. e Poolman, B.. (2005). Electrochemical structure of the crowded cytoplasm. *Trends in Biochemical Sciences*, 30 (10) . 536-541.

Spivakov, M. e Fisher, A. G.. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature Reviews* 8 : 263-271.

Strahle , U. et al.. (1992). At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *PNAS* 89 :6731-6735.

Strathdee, D. et al.. (2008). Distal transgene insertion affects CpG island maintenance during differentiation. *J. Biol. Chem.* 283:11509-11515.

The role of miRNAs in alcohol tolerance. Epi Genie miRNA News.

Thomson, P. D. . (2007). Genomic imprinting- an epigenetic regulation of fetal development and loss. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49 (suppl I) :S-7- pag 1-3.

Thon, G.. (2008).. Histone modifications: cycling with chromosomal replication. *Current Biology* 18 (9): R380-R382.

Ushijima, T. et al.. (2003). Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Research* 13:868-874.

Vuocolo, T. et al..(2007). Identification of a gene network contributing to hypertrophy in callipyge

skeletal muscle. *Physiol. Genomics* 28:253-272.

Wagner, K. D: et al.. (2008). RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Development Cell* 14:962-969.

Weaver, I. C. G. et al.. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience* 7 (8) . 847-854.

Weaver, I. C. G. et al. . (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *PNAS* , 103, 9 :3480-3485.

Whitelaw, N. C. Withlaw, E.. (2006). How lifetimes shape epigenotype with and across generations. *Human Molecular Genetics* 15 (2). R 131-R137.

Williams, A. e Flavell, R. A.. (2008). The role of CTCF in regulating nuclear organization. *The Journal of Experimental Medicine*, March 17,1-4.

Wutz et al.. (1997). Receptor insuline-like growth factor 2. *Nature* (16 October 1997).

Zaitoun, I. e Khatib, H.. (2006). Assessment of genomic imprinting of SLC38 A4, NNAT, NAP1L5, and H19 in cattle. *BMC Genetics* 7:49, pag 1 a 10.

Zeng, L. et al.. (1997).The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90:181-192.

Zhang, M. Q.. (1998). Statistical features of human exons and their flanking regions. *Human Molecular Genetics* 7(5):919-932..

Zhang, S. et al.. (2004). Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. *Biology of Reproduction* 71:1540-1544.

FIGURA - 4
 Interacção das proteínas do grupo polycomb com a cromatina
 (Adaptado de Rajasekhar e Begeman, 2007)

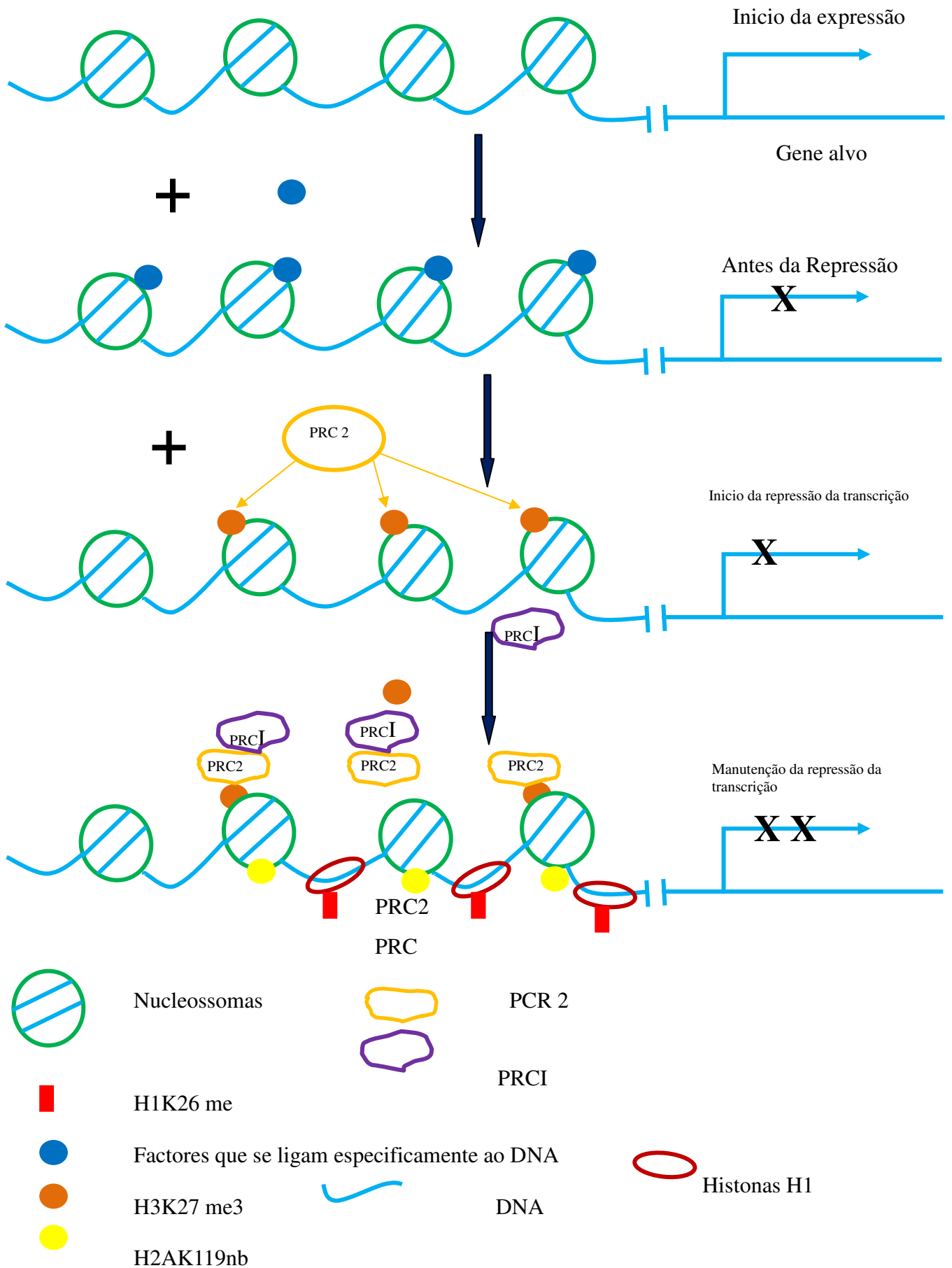


FIGURA-5

Modelo esquemático de vias de sinalização extra celulares desencadeadas mRNA e ncRNA

Adaptado de Dinger e tal., 2008)

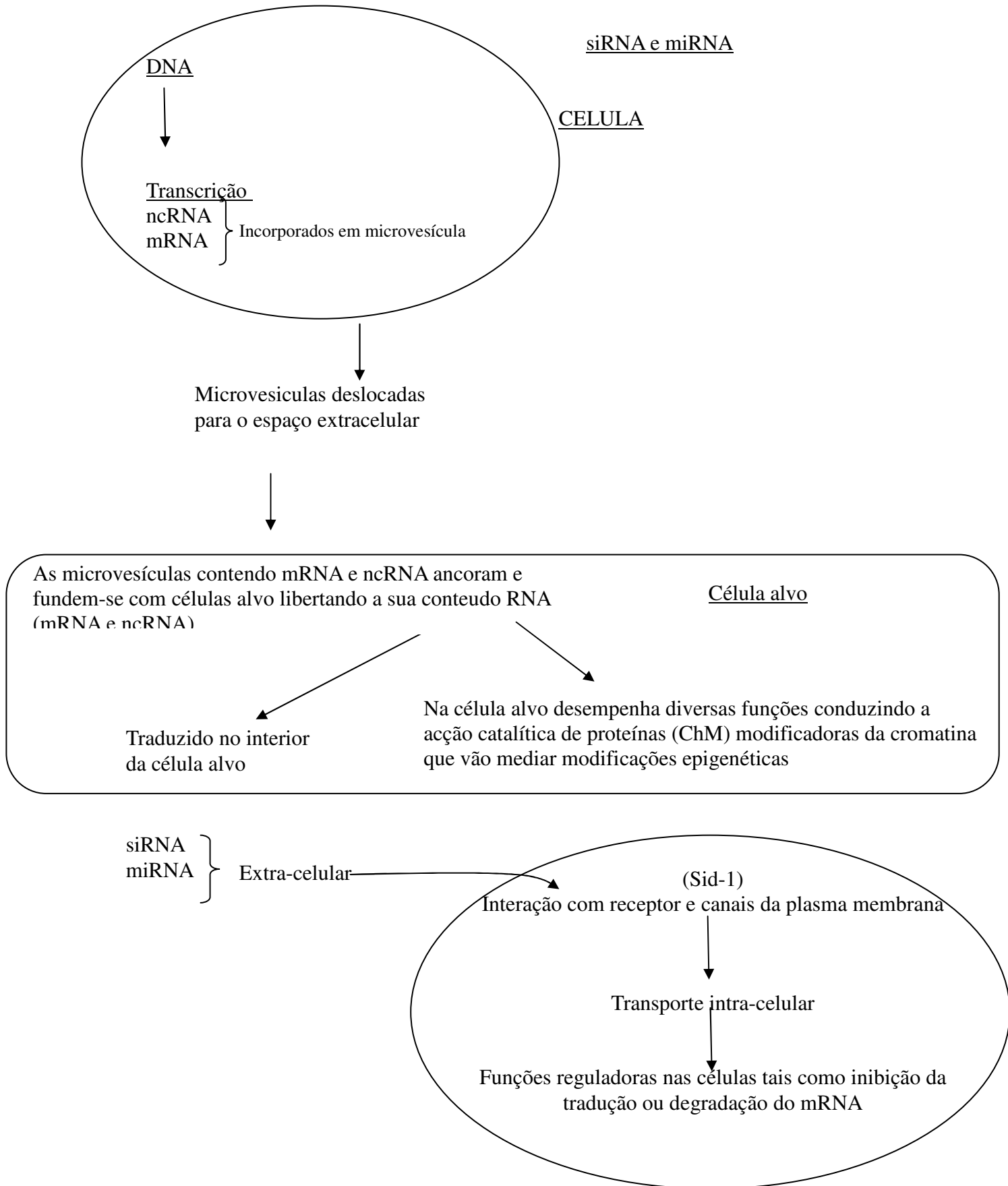


Figura 6
Sequência parcial do promotor do gene

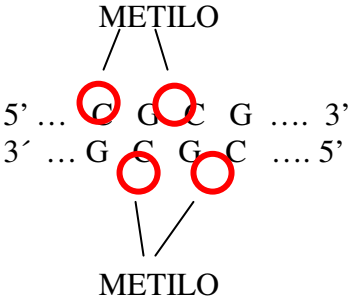


Figura 7

Igf 2r. Metilação do gene materno

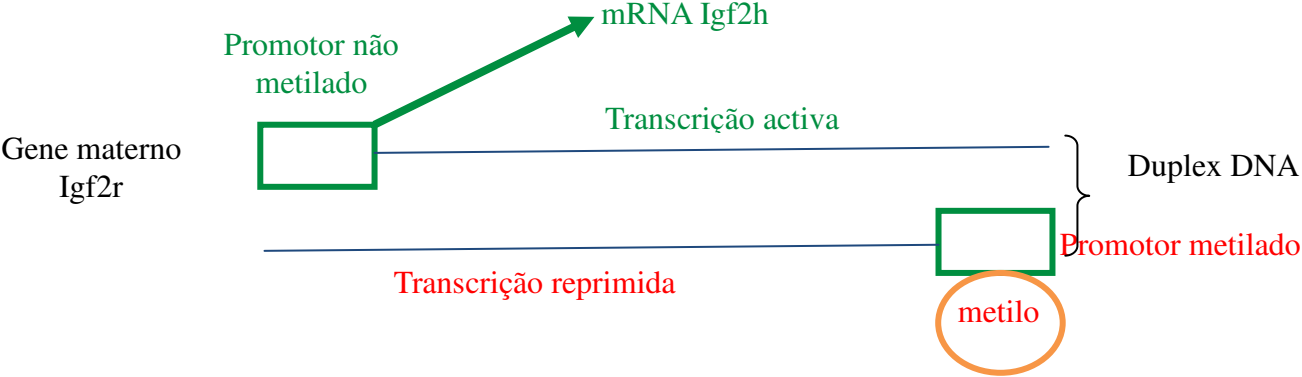


Figura 8
Igf 2r Metilação do gene paterno

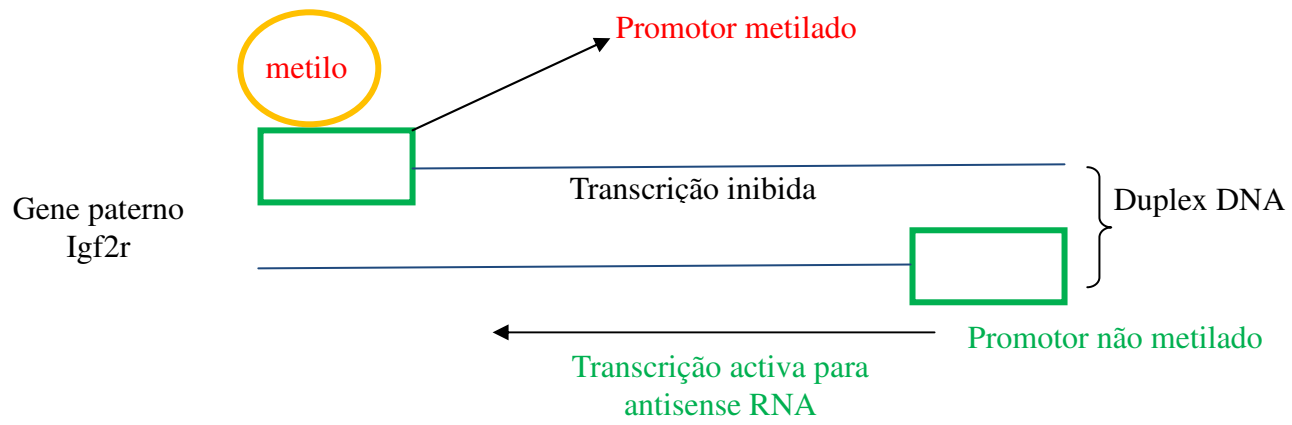
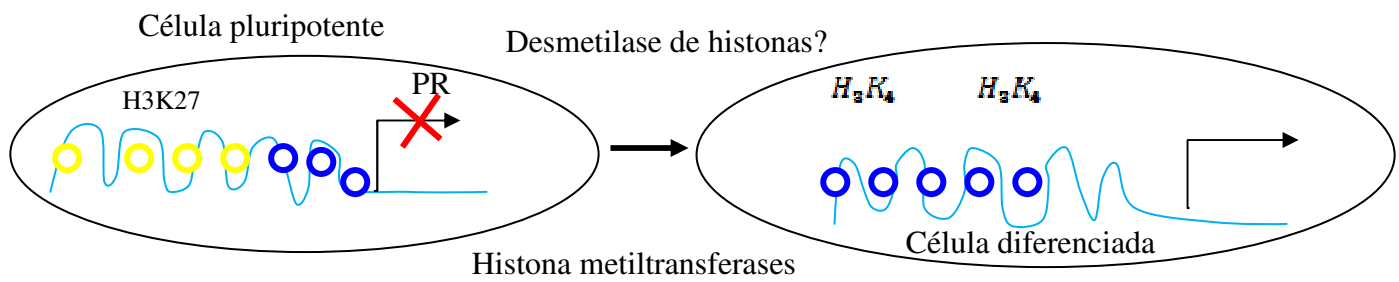


Figura 9

Na figura 9 representa-se a repressão temporária dos genes envolvidos no desenvolvimento pelo complexo proteico polycomb PcG



● Histonas H3K27 metiladas

● Histonas H3K4 metiladas

PRC complexos proteicos repressivos contendo proteínas PcG

Figura 10

Repressão de genes associados com a pluripotência.

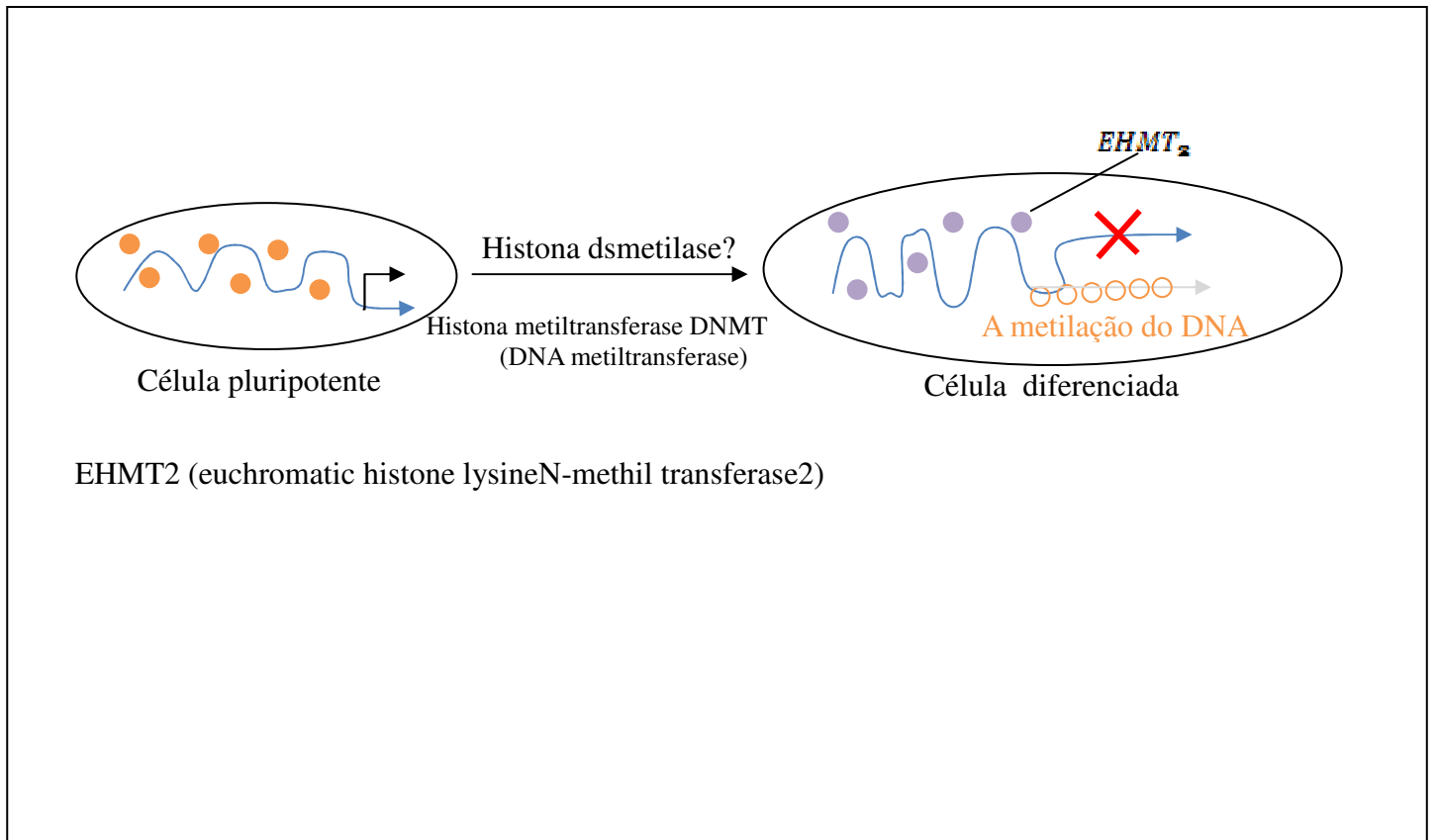


Figura 11

Repressão de genes somáticos.

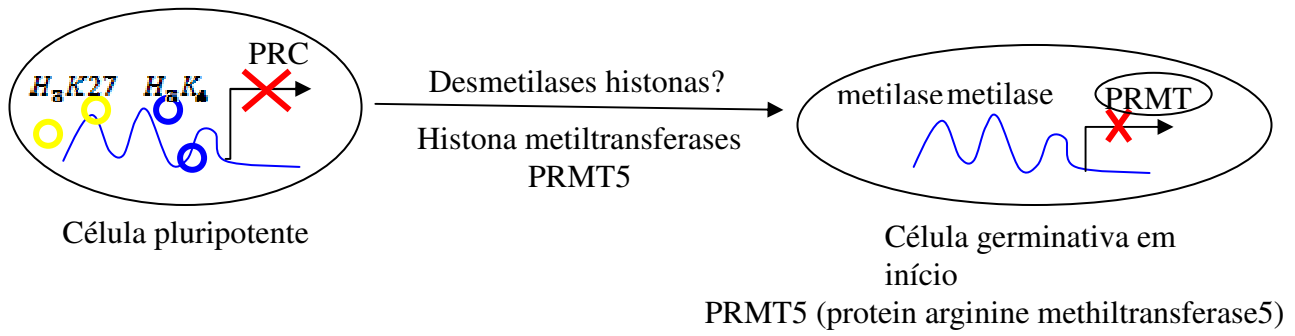


Figura 12

Aquisição de metilação do DNA nas células germinativas

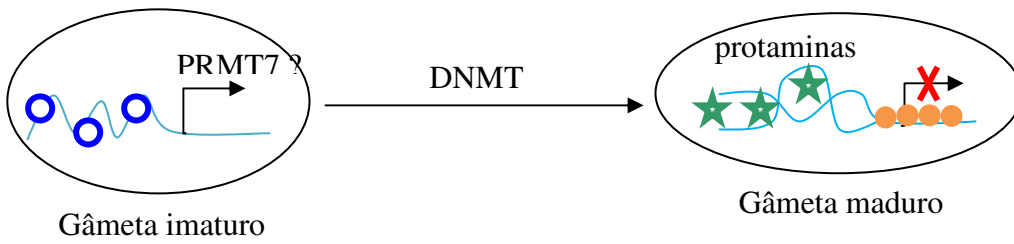


Figura 13
Silenciamento do cromossoma X e de genes imprinted. Modificações de histonas

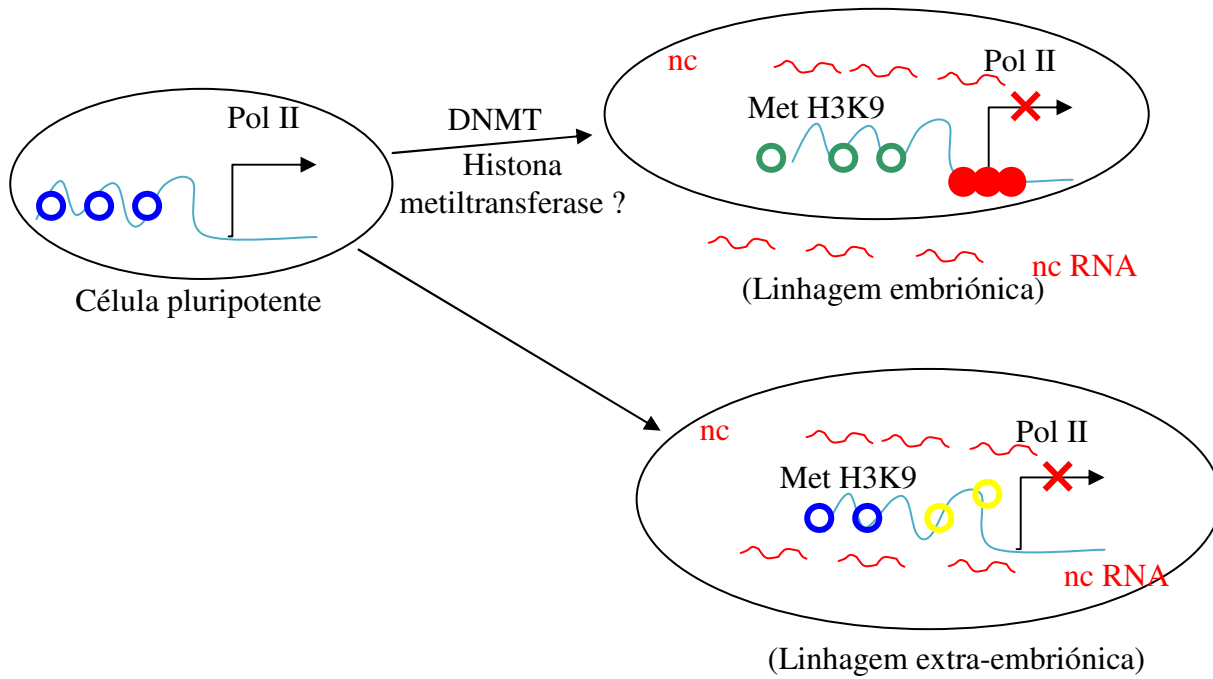


Figura 14

Erosão da metilação das PGC

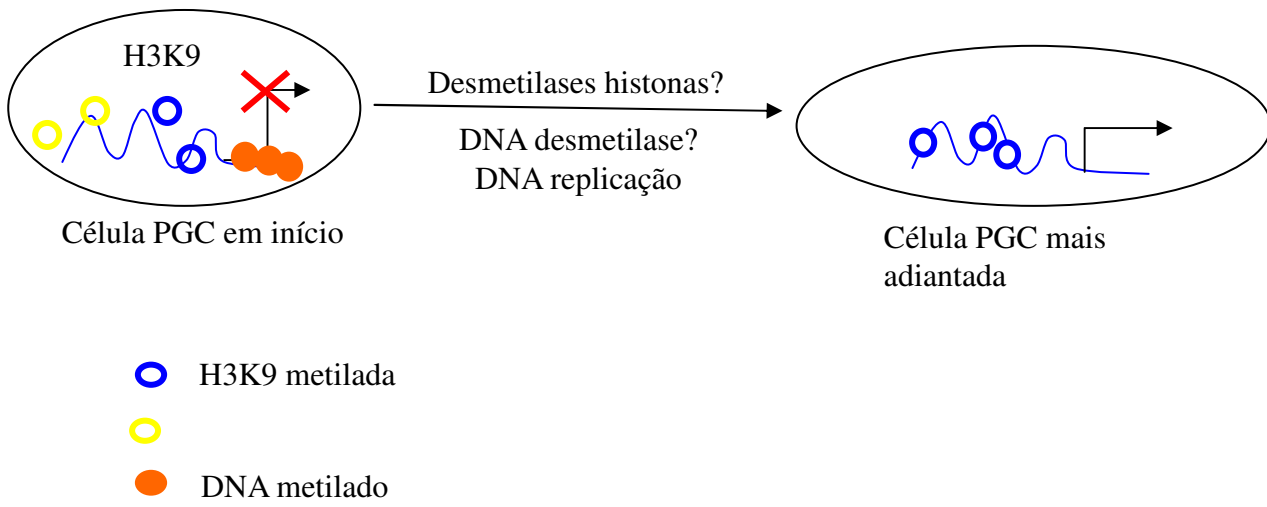


Figura 15

Erosão da metilação no momento e após fertilização

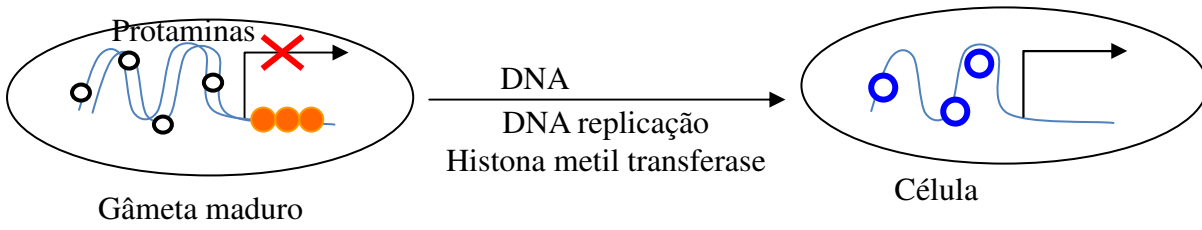


Figura 16

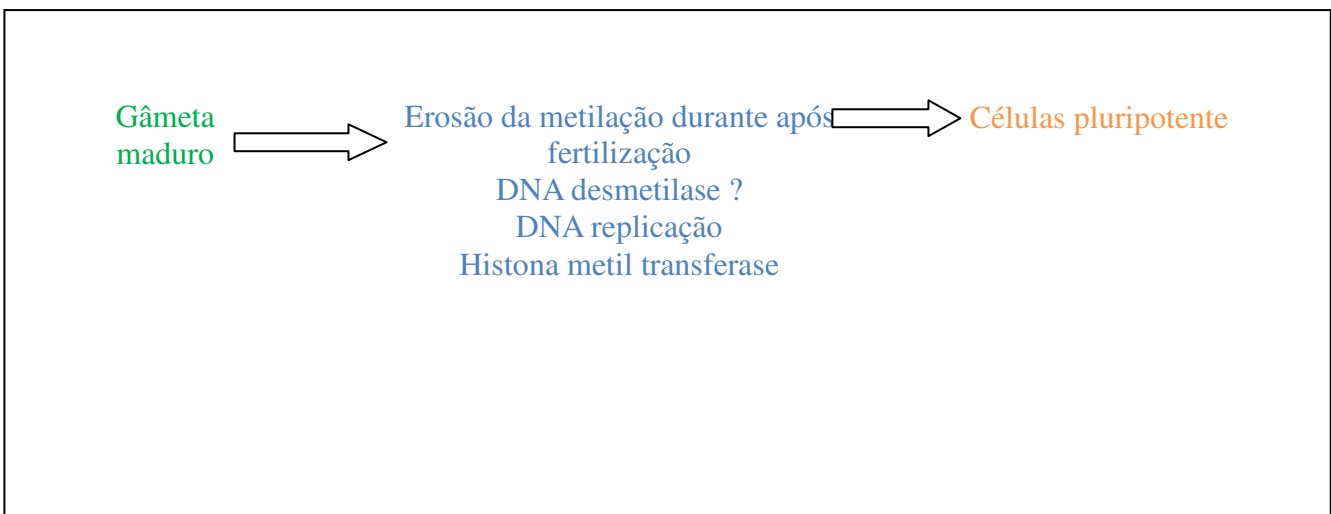
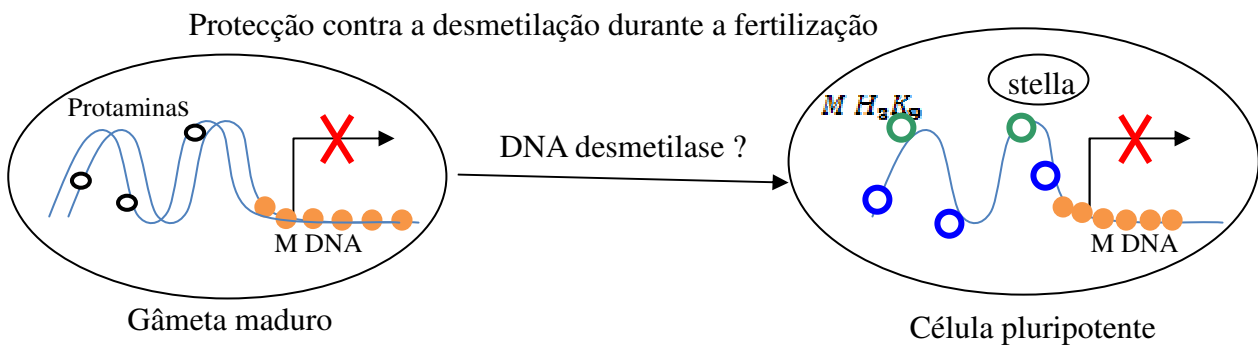


Figura 17 – Interações envolvidas nas respostas de stress

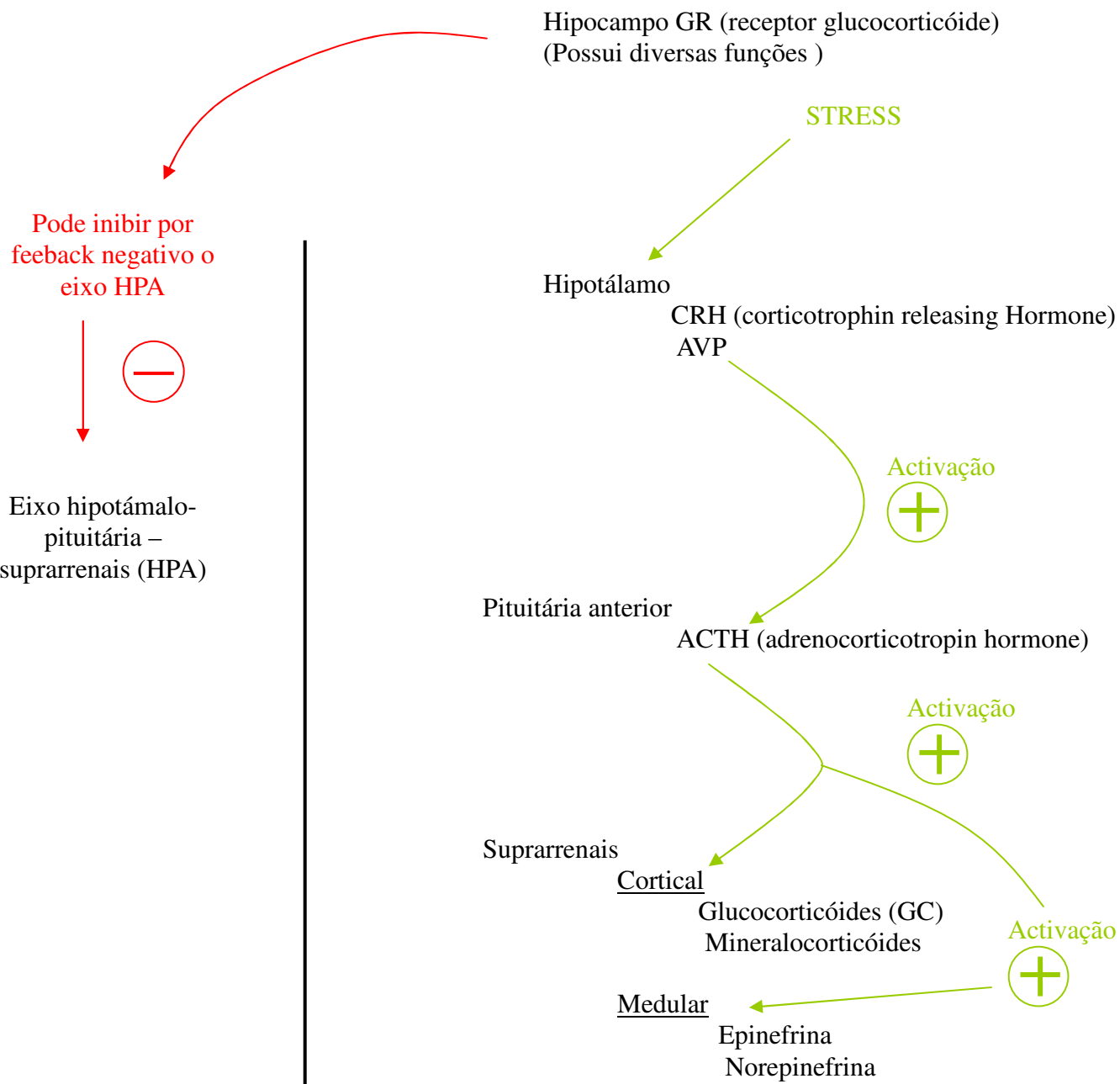


Figura 18

Comportamentos das crias de ratinhos que dispensaram ou não bons cuidados maternos, durante os primeiros 10 dias de vida das crias (período crítico do efeito dos cuidados maternos sobre o desenvolvimento do eixo HPA)(Nos estudos efectuados pelos investigadores que suportam estes dados, cada medição foi significativamente correlacionada com a frequência dos cuidados maternos)

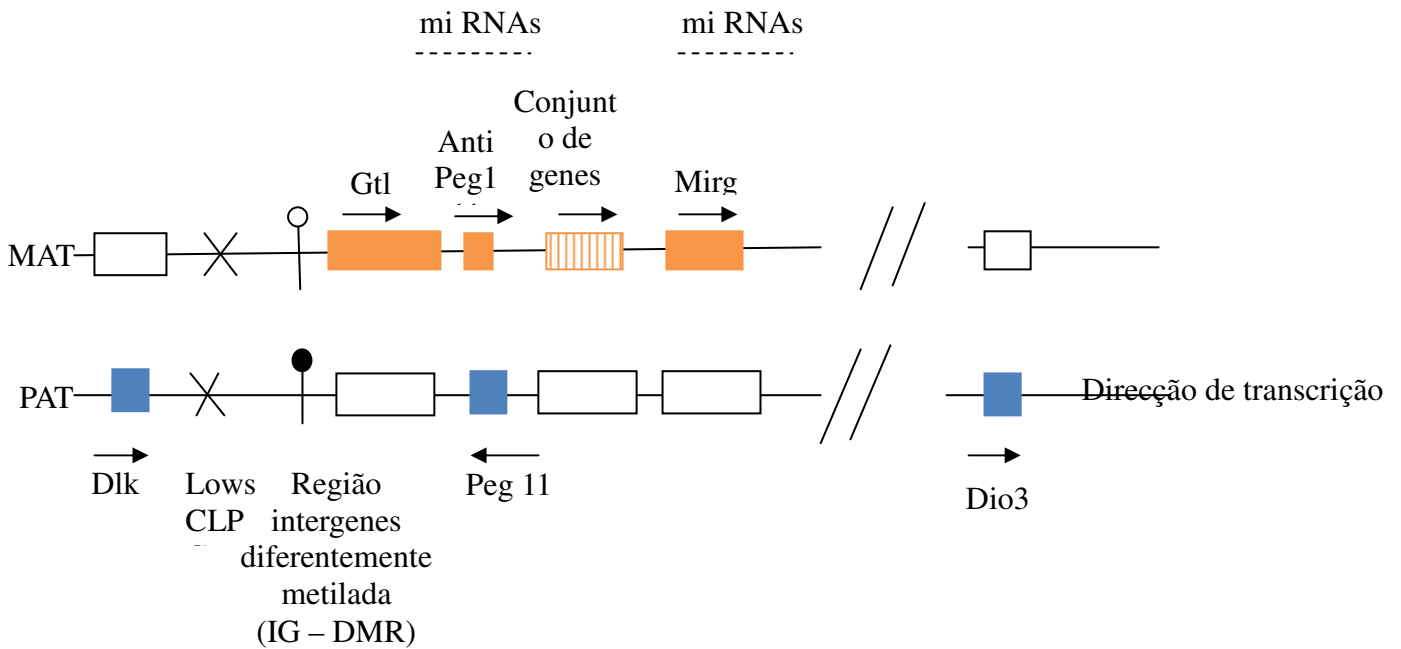
Bons cuidados maternos	Ausência de bons cuidados maternos
Hipocampo	
Promotor do gene GR	
Metilação do DNA	↓ ↑
Acetilação de histonas	↓ ↑
mRNA GRH	↑ ↓
Sensibilidade favorecida para feedbackglucocorticóide	↑
Expressão do gene NGF 1A	↑ ↓
Hipotálamo	
mRNA CRH	↓ ↑
AVP	↓
Pituitária	
ACTH	↓ ↑
Suprarrenais	
corticoesterona	↓ glucocorticoides ↑
	mineralocorticoides ↑
	Epinefrina ↑
	norepinefrina ↑
Sangue	
ACTH	↓ Cortisol ↑
corticoesterona	↓ Glucagina ↑
	Catecolaminas ↑
	Hormona do crescimento ↑
	Glicémia ↑
	Ácidos gordos livres ↑
	Biossíntese proteíca ↓
	Catabolismo proteico ↑
Resposta ao stress	↓ ↑
Resposta do eixo HPA	↓ ↑

↓ Valores diminuídos com significado estatístico

↑ Valores aumentados com significado estatístico

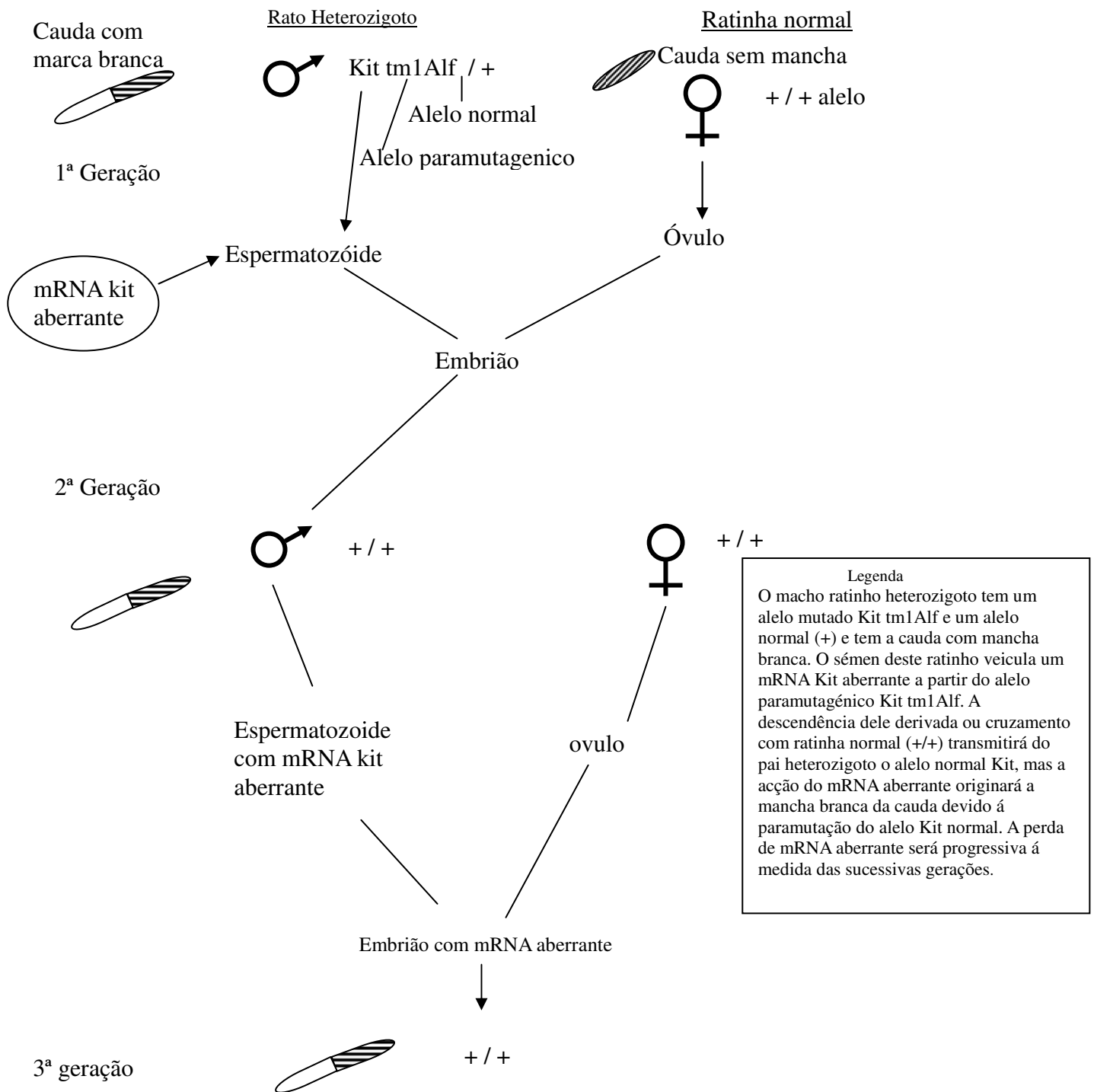
Figura 19

Diagrama esquemático do locus DIK1 – Gtl2 (Genes presentes na proximidade da mutação callipyge (A → G) locus CLPG no cromossoma materno (MAT) e no cromossoma paterno (PAT) (extremidade telomérica do cromossoma 18 nos ovinos) (adaptado de Lewis e Redrep, 2005)_



- Genes paternalmente expressos (provenientes do pai)
- Genes maternalmente expressos (provenientes da mãe)

Figura 20
Modelo para a paramutação no alelo kit



(Adaptado de Soloway, 2006)

QUADRO – 3 Marcas modificadoras da cromatina em diversas situações e regiões de um Gene codificador de uma proteína

GENE



- █ Enhancer
- █ Promotor
- █ } Sequência codificadora
- █ } Sequência codificadora
- █ Isolador

	H3, H4, H2A Acetilados	H3/K4 Monometil	Trimetil	H3/K9 Monometil	Dimetil e trimetil	H4 K20 Monometil	H3/K27 Monometil	Dimetil e trimetil	H3 K36 Trimetil	H3 K70 Trimetil
cromatina activa	Enhancer		+	+						
	Promotor		+	+						
	Gene 5' activo 3'	+	+	+		+	+		+	
	Isolador									
Cromatina em equilibrio	Enhancer									
	Promotor			+				+		
	Gene 5' activo 3'							+		
	Isolador									
Cromatina inactiva	Enhancer									
	Promotor				++			++		+
	Gene 5' activo 3'				++			++		+
	isolador							++		

Quadro 5
Epialelos transmitidos meioticamente

Locus/epialelo	Organismo	Mecanismo	Estabilidade	Fenotipo	Ref.
Avy	Ratinho	Associada com um transposição: o elemento IAP é inserido acima com perda do estado epigenetico silenciado esta associado com superexpressão	metastável	Pelagens amarelas, obesidade	31
<i>Axin^{Fv}</i>	Ratinho	Associada com um transposição: o elemento IAP é inserido com perda do estado epigenetico silenciado está associado com a superexpressão	metastável	Cauda torta	68
MLH1	Ser humano	A hipermetilação do DNA na região acima está associada com o silenciamento do gene	metastável	Predisposição para a formação de tumores	71

(Adaptado de Richards, 2006)

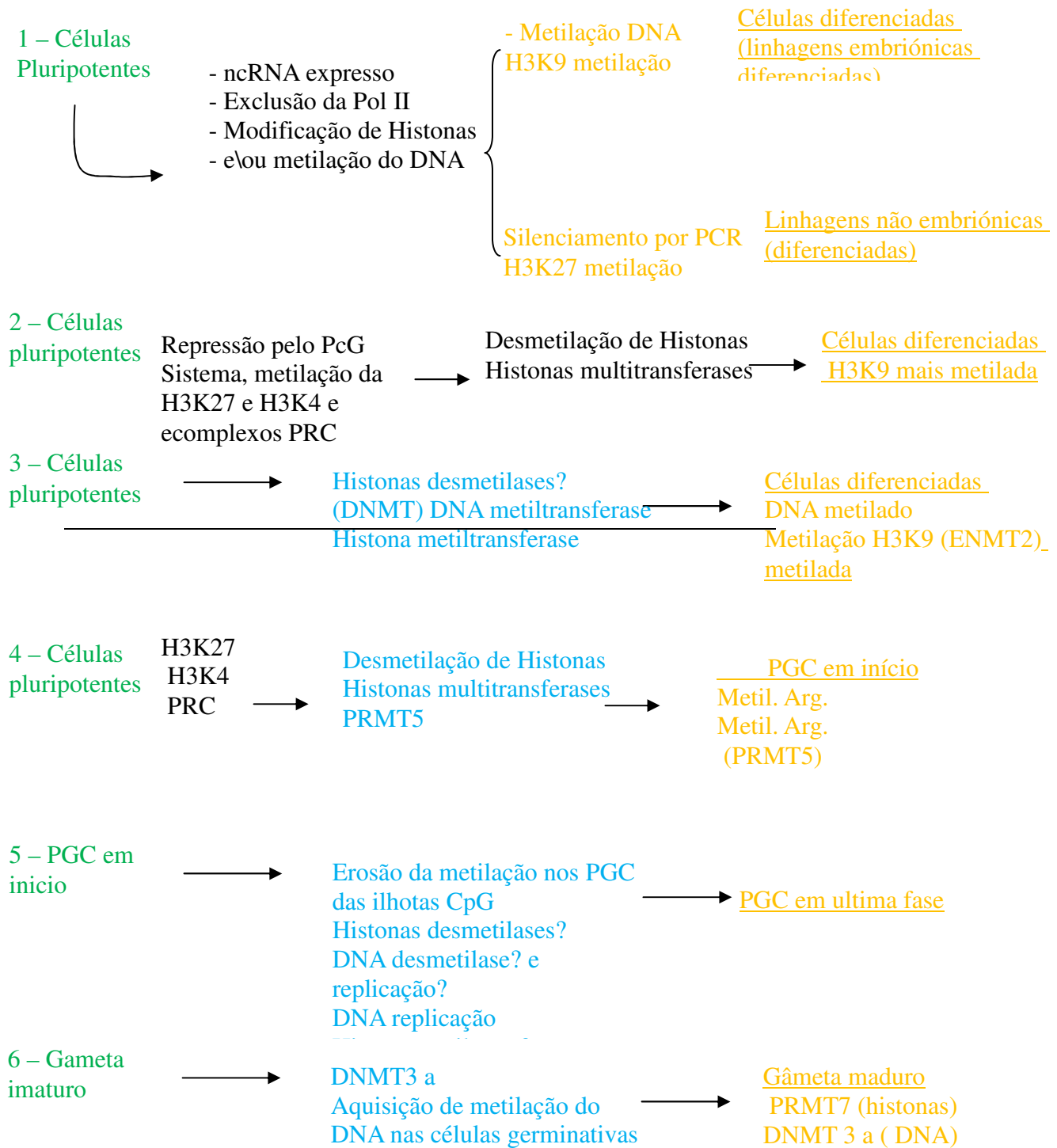
Quadro 6
Etapas epigenéticas ao longo da vida

	Primeiros estados embrionários (células pluripotentes)	Fases posteriores do desenvolvimento (células paucipotentes)	Células adultas (células unipotentes)
Genes pluripotentes	+	-	-
Genes silenciados a curto termo (modificação das histonas)	-	+	-
Genes silenciados a longo termo (metilação do DNA)	+	+	+

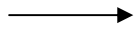
+ activada

- reprimida (silenciamento)

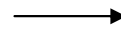
Quadro 7- Sumário da evolução das etapas epigenéticas ao nível do DNA e Histonas durante o desenvolvimento dos mamíferos



7 – PGC em início

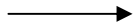


Erosão da metilação durante ou após fertilização
DNA desmetilase?
DNA replicação
Histona metiltransferases

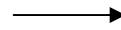


Célula pluripotente

8 – Gameta maduro



DNA desmetilase?



Célula pluripotente

Metilação
H3K9
Metilação
H3K4
Metilação
DNA

Quadro 8

Evolução das etapas epigenéticas básicas, a vários níveis, durante o desenvolvimento dos animais (mamíferos) e regulação da expressão dos genes

Células embrionárias e somáticas	<u>Modificações epigenéticas</u>	- Metilação da DNA - Metilação H3K27 - Metilação H3K4	+	-	-	+	+	++	++
	<u>Desenho da expressão dos genes</u>	- Genes associados com pluripotências - Genes envolvidos no desenvolvimento (por proteínas PCG)	-	+	++	-	-	-	-
	<u>Etapas do desenvolvimento</u>		oócito	zigoto	morla	Blastocisto	embrião	adulto	Células germinativas
			-	-	-	+	+	+	+
+ Mantidos (com várias intensidades) - Erosionada	Células germinativas	<u>Modificação</u>	- Metilação doDNA - Metilação H3K27	+ -	- +	++			
		<u>Desenho da expressão dos genes</u>	- Genes associados com pluripotências - Genes envolvidos no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-
				-	+	+			

(Adaptado de Reck, 2007)

Quadro 9
 Comparação entre genes ortólogos

<u>Gene</u>	<u>Ratinho</u>	<u>Bovino</u>	<u>Expressão</u>
DCN	±	NI	M
NESP55 - GNAS	±	±	M
H19	±	±	M
IGF2	±	±	P
IGF2R	±	±	M
MAGEL2	±	±	P
MEG3	±	±	M
NAPIL5	±	±	P
NNAT	±	±	P
PEG3	±	±	P
XIST	±	±	P
SLC38A4	±	NI	P
OSBPL5	±	NI	M

± Imprinted
 NI não Imprinted
 M Materno
 P Paterno

Quadro 10
Características de genes imprinted em bovinos

Gene	Sequência codificante (bp)	Repetições em tandem nas sequencias codificantes	Repetições em tandem na sequencia total	CpG nas regiões codificantes	CpG na totalidade
NESP 55	13523	1	4	0	2
IGF2	6070	0	22	2	19
IGF2R	102613	11	23	31	36
NAPIL5	2354	0	1	1	1
NNAT	1609	0	1	2	4
PEG3	23509	11	18	19	30
H19	1305	0	19	3	22
MEG3	25865	2	22	4	15

Quadro 11
Envolvimento dos miRNA em diversas situações

<u>Micro RNA</u>	<u>Desenho da expressão</u>	<u>Papeis biológicos</u>	<u>Alvos conhecidos</u>
mi R-1	Coração, músculo de esqueleto	Apoptose, cardiogêneses, condução, miogênese, hipertrofia dos músculos do esqueleto	Cdk9, delta, fibronectina, GDF8, GJA1, Hand2, Irx5, KCNJ2, HDAC4, HSP60, HSP70, KCNE1, nPTB, Ras 6AP, Rnet
mi R-21	Coração, baço, intestino delgado, colon	Apoptose, hipertrofia cardíaca, tumorigênese	PTEN, TPM1
mi R-133	Coração, musculo de esqueleto	Apoptose, condução, miogênese, hipertrofia dos músculos do esqueleto	Caspase-9, Cdc 42, ERG, KCNQ1, nPTB, Rho A, SRT, WHSC2
mi R-181	Cérebro, coração, pulmão, rim, músculo esqueleto, medula óssea, baço, timo	Miogênese e regeneração, hematopoieses	Hox-A11
mi R-195	Coração, pulmão, rim, pele, músculo esqueleto	Hipertrofia cardíaca, miogênese	Nenhum assinal, Cx43, GDF8, Fst11, nPTB, Polo1, Utm
mi R-208	coração	Hipertrofia cardíaca, miogênese	Thrap1, SU(fu)