

# Inativação do X e Imprinting Genômico:

Fernando Borges

## 1. Inativação do X

### 1.1 - Introdução:

A inativação do cromossomo X é um processo que ocorre em todos os mamíferos, resultando na inativação seletiva de alelos em um dos dois cromossomos X, nas fêmeas. Sabe-se que as mulheres possuem dois cromossomos X, enquanto os homens possuem apenas um, sendo eles considerados hemizigóticos para os genes deste cromossomo, mas as fêmeas tornam-se funcionalmente hemizigóticas pela inativação de um dos alelos cromossômicos X parentais.

O cromossomo Y contém pouquíssimos genes que, em sua maioria, governam a função sexual do macho, de modo que as fêmeas podem passar perfeitamente bem sem este cromossomo. O cromossomo X, entretanto, contém muitos genes que desempenham papéis vitais em ambos os sexos, e, assim, algum método de compensação de dose é necessário para assegurar que as células funcionem normalmente tanto com um como com dois cromossomos X.

Essa compensação de dose se dá pelo mecanismo de inativação do X, freqüentemente chamado de **lyonização**, por ter sido a Dra. Mary Lyon quem primeiro sugeriu esse mecanismo (Figura 1.1).

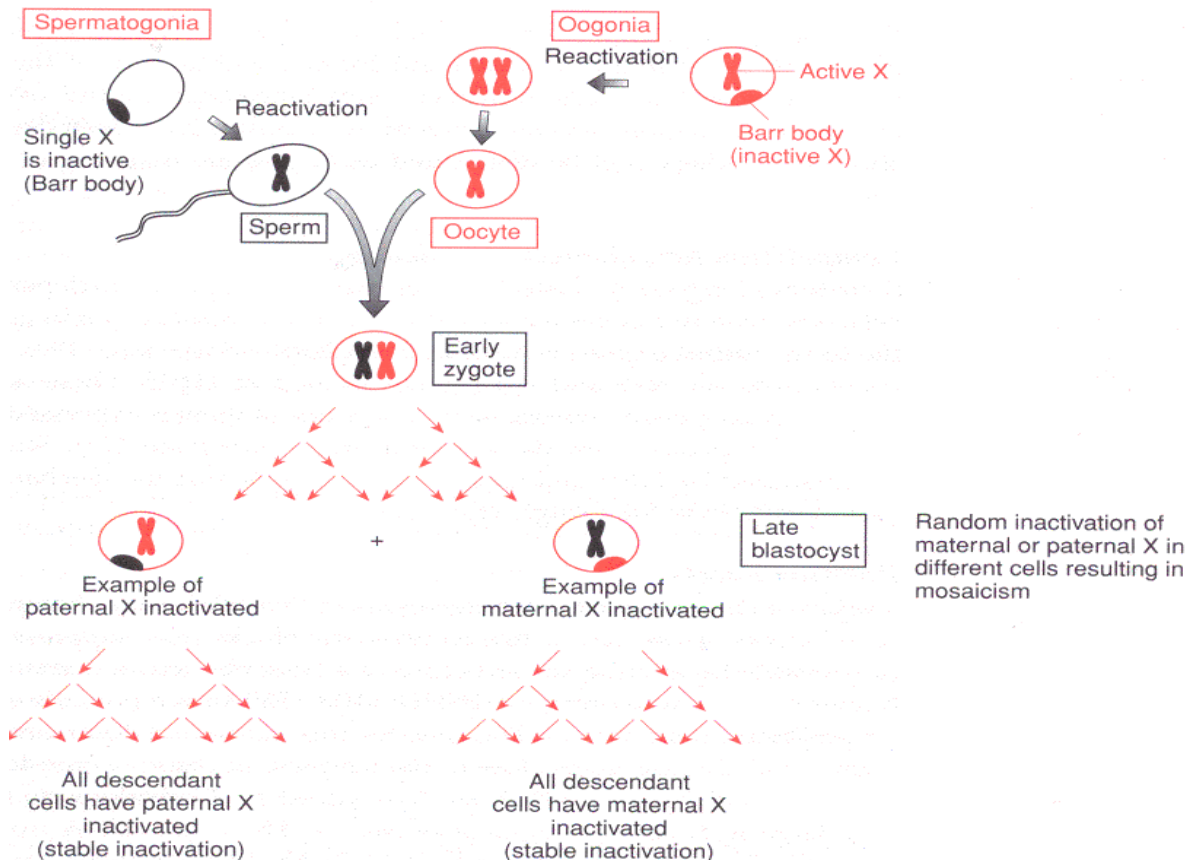
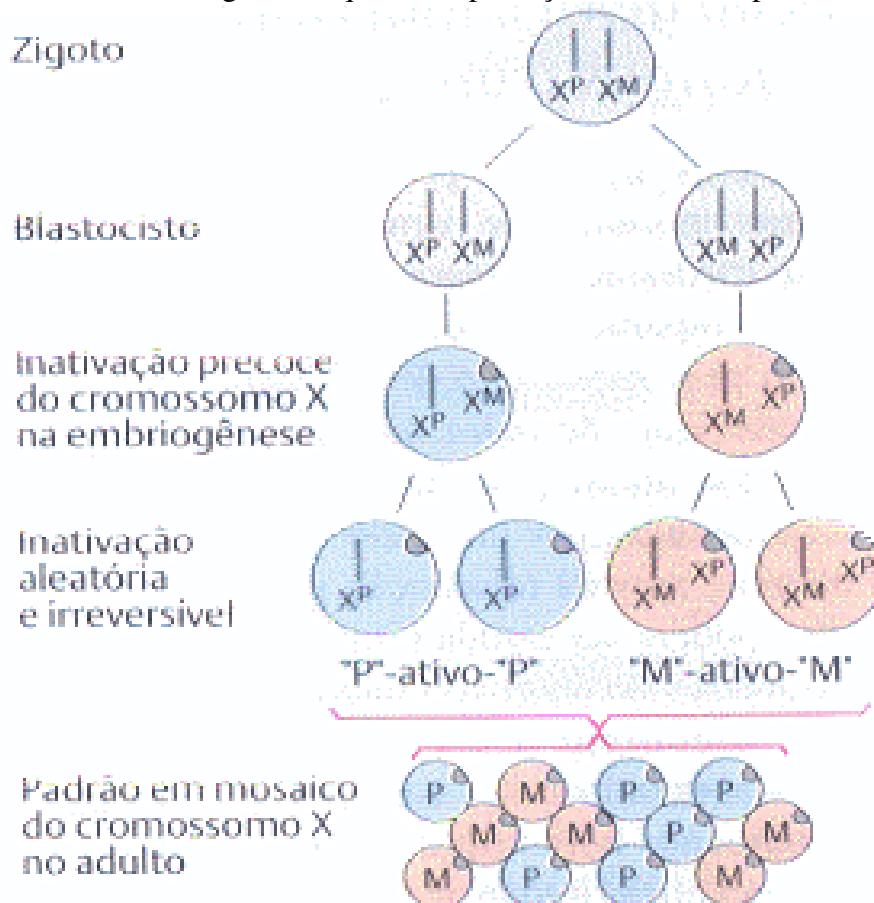


Fig. 1.1

Cedo no desenvolvimento embrionário no estágio tardio da blástula (por volta do 13º ao 16º dias de vida embrionária – blastocisto com menos de 100 células), a célula, de alguma maneira, conta seus cromossomos X e inativa todos eles, menos um (por exemplo uma célula 47,XXX inativaria dois X). No entanto, quando os cromossomos de uma célula feminina são observados na metáfase da mitose, o X ativo e o X inativo têm o mesmo aspecto – mas isso é porque na metáfase mitótica *todos* os cromossomos estão condensados e inativos. Terminada a divisão celular, o X inativo continua condensado, enquanto os demais cromossomos se descondensam e reassumem as suas atividades de transcrição. Em algumas células, o X inativo pode ser visto como um **corpúsculo de Baar** ou **corpúsculo de cromatina sexual**, próximo à membrana do núcleo interfásico.

A escolha do X inativado na célula feminina 46,XX é aleatória (com poucas exceções), de modo que algumas células inativarão o X paterno e outras, o X materno. Feita a escolha, ela é memorizada, ou seja, as células filhas inativam o mesmo X que a célula mãe. Uma fêmea adulta é um mosaico de clones derivados de diferentes células embrionárias, ou seja, compreendem misturas de linhagens celulares nas quais o X paterno é inativado e linhagens em que o X materno é inativado (Figura 1.2). Em um clone todas as células inativam o mesmo X, porém entre clones, a escolha é aleatória.

Nem todos os genes do cromossomo X estão sujeitos à inativação; os genes que escapam à inativação incluem aqueles em que existe um homólogo funcional no cromossomo Y e alguns em que a compensação de dose não parece ser importante.



## B. Esquema de inativação do X

Fig. 1.2

## 1.2 - Genes que Escapam à Inativação:

Cerca de 25% dos genes do cromossomo X inativo escapam à inativação e expressam-se tanto pelo cromossomo X ativo, como pelo inativo. A maioria desses genes encontra-se no braço curto do cromossomo X (Xp). Uma consequência desse processo é a clínica de pacientes com Síndrome de Turner (45,X). Se todos os genes do cromossomo X inativo estivessem metilados, essas pacientes não teriam nenhuma característica clínica diferente da população normal. Porém, a falta dos genes que escapam à metilação do X inativo gera os sinais e sintomas característicos dessa síndrome.

Os genes que escapam à metilação são os das seguintes regiões:

- 1) Região pseudoautosômica: homologia e crossing over com cromossomo Y.
- 2) Região com cópia correlata no Y, mas sem crossing over.
- 3) Região sem cópia correlata e sem crossing over com o Y. Ex: gene para esteróide sulfatase.

Cerca de 16 genes do cromossomo X inativo escapam à inativação, 12 deles têm homólogos no cromossomo Y. Além disso, alguns genes apresentam inativação variável entre diferentes indivíduos e, desta forma, podemos inferir que existam outros mecanismos envolvidos na compensação de dosagem entre homens e mulheres em relação a genes ligados ao X.

Na revista Nature, de 17/03/2005, contém uma reportagem sobre um estudo realizado que mostrou que o segundo cromossomo X nas mulheres, que até então era considerado inativo, não é tão silencioso quanto se imaginava. "Os efeitos dos genes do cromossomo X inativo podem explicar algumas diferenças entre homens e mulheres que não podem ser atribuídas aos hormônios sexuais", disse Laura Carrel, Ph.D., professora assistente de bioquímica e biologia molecular na Pennsylvania State College of Medicine. Dependendo do gene, possuir duas cópias ativas pode fazer pouca ou muita diferença. Quando genes no X inativo escapam da inativação e se expressam, isso pode criar uma concentração maior de genes particulares.

Carrel e o co-autor do estudo, Huntington F. Willard, diretor do Institute for Genome Sciences & Policy, da Duke University, determinaram quais genes estavam escapando da inativação e sua localização no cromossomo X inativo. Eles descobriram que a maior parte desses genes "desobedientes" estava grupada.

Trabalho anterior de Willard e outros pesquisadores, apresentou a primeira evidência que parte dos genes no segundo cromossomo X da mulher permanecia ativo. O trabalho atual estende as descobertas anteriores para um conjunto completo de genes ligados ao X e também revela que as mulheres exibem diferenças individuais em relação à inativação do X, disse Willard. Nós examinamos os cromossomos X de 40 mulheres e cada um deles possuía um padrão único de expressão do gene", disse Willard. Todas essas variações são completamente únicas para as mulheres. Os cromossomos X nos homens são todos iguais nesse aspecto. No estudo, os pesquisadores isolaram células da epiderme de 40 mulheres. Eles mediram o grau de atividade de 471 genes para determinar se a segunda cópia estava desligada ou não. Cerca de 15% dos genes no segundo cromossomo X escaparam da inativação em algum grau. Isso significa que pelo menos 15% dos genes ligados ao X, e suas proteínas produzidas, estão presentes em níveis mais elevados e variados nas mulheres do que nos homens.

A proporção de genes que permanece ativa difere dramaticamente entre as regiões do cromossomo X. Além disso, em algumas mulheres, um adicional de 10% de genes

ligados ao X demonstraram padrões de inativação variáveis e diferentes graus de atividade nos cromossomos X "silenciados", reportou a equipe.

Os dados também sugerem que o genoma feminino difere do masculino em pelo menos quatro formas. Primeiro, estudos prévios mostraram que o cromossomo Y fornece aos homens diversos genes que as mulheres não possuem. Segundo, este estudo mostra que o fato de alguns genes no X inativo serem expressos significa que cerca de 15% dos genes são expressos num grau maior em mulheres do que nos homens. Terceiro, este estudo também mostra que um adicional de 10% de genes no X inativo apresentam graus de expressão variável nas mulheres, enquanto que os homens possuem uma única cópia desses genes. “Agora sabemos que 25% do cromossomo X - de 200 a 300 genes - podem ser expressos de forma única em comparação a outro sexo”, disse Willard. Em essência, não existe um genoma humano, mas dois - o masculino e o feminino.

Trabalhos adicionais são necessários para explorar as conseqüências potenciais dessas variações, acrescentou. As descobertas ressaltam as diferenças entre o genoma masculino e feminino.

### **1.3 - Mecanismos de Inativação:**

A inativação do cromossomo X em mamíferos parece ser iniciada por um único gene, XIST, o qual é unicamente expresso no cromossomo X inativado. É um processo complexo e mecanismos moleculares distintos estão envolvidos na iniciação e na manutenção da inativação. O centro de inativação do X (Xic), que em humanos está localizado em Xq13, controla a iniciação e a propagação da inativação do X. Nesse centro, o gene XIST codifica um produto de RNA maduro de 15 kb que é unicamente codificado pelo cromossomo X inativo.

XIST é essencial para o funcionamento de Xic na iniciação da inativação do cromossomo X, mas não é necessário para a manutenção da inativação do cromossomo X. De alguma forma, uma propagação *cis*-limitada desse produto de RNA atua de forma a cobrir o cromossomo X inativado por distâncias muito longas. No entanto, o mecanismo que assegura a inativação dos genes no cromossomo X inativo, mas não no X ativo, é desconhecido (existem apenas modelos possíveis).

Embora XIST seja essencial para a função de Xic, XIST não é suficiente sozinho. O elemento controlador de X (Xce) afeta a escolha de qual cromossomo X permanece ativo e é diferente de XIST, estando localizado a 3' desse. Além disso, a deleção de uma região de 65kb a 3' de XIST produz um efeito que sugere que elementos envolvidos no mecanismo de contagem situam-se distantes a 3' de XIST. Recentemente outro gene foi identificado como sendo transcrito a partir da fita dupla oposta àquela que é utilizada para transcrever o gene XIST. Uma vez que a unidade de transcrição do novo gene sobrepõe-se completamente ao gene XIST e está em orientação reversa, ela foi denominada Tsix. Isso dá origem à idéia de que XIST possa ser regulado pelo gene Tsix.

Assim, temos que o processo de inativação do X inicia na vida embrionária, por ação do gene XIST, mas deve ser mantido através de mecanismos específicos para que permaneça nos descendentes clonais celulares. No cromossomo X que permanece ativo, o gene XIST é inativo, e seus genes expressam-se normalmente. O gene XIST é ativo apenas no cromossomo X inativo.

#### **1.4 - Manutenção da Inativação:**

O gene XIST determina o padrão de inativação e inicia o silenciamento dos genes do cromossomo X. Para que esse processo seja mantido, é preciso que os genes inativados pelo XIST sejam metilados. A metilação é um processo primariamente normal de inativação de diversos tipos de genes. É o processo mais importante na manutenção da inativação iniciada pelo gene XIST. É feita nas citosinas do DNA pela enzima DNA metiltransferase, sendo restrita ao dinucleotídeo CpG. A metilação também está relacionada à expressão do XIST. No cromossomo X ativo o gene XIST encontra-se hipermetilado, o que determina a ausência de sua expressão neste cromossomo. Algumas proteínas histonas também participam no processo de manutenção da inativação associadas à metilação.

#### **1.5 - Inativação Não Aleatória:**

Há algumas situações em que a inativação do X não é aleatória, sendo as principais:

- 1) Lyonização seletiva: em situações onde há uma mutação presente em um dos cromossomos X, a inativação ocorre preferencialmente no X onde há defeito, permitindo a seleção de X ativos sem mutação e tendo, portanto, um efeito benéfico. Assim, as anomalias do X são melhores toleradas que as anomalias similares dos autossomos.
- 2) Lyonização negativa: neste caso também há uma mutação presente em um dos cromossomos X, mas há uma inativação preferencial do cromossomo X normal, permanecendo o X mutado na maioria dos cromossomos X ativos. Esta forma de inativação não aleatória tem conseqüências negativas, podendo heterozigotas desenvolverem doenças ligadas ao X como Hemofilia, Distrofia Muscular de Duchenne, Daltonismo, Síndrome de Wiskott-Aldrich e distúrbios oculares ligados ao X.
- 3) Mutação em XIST: que proporciona alteração no processo aleatório.
- 4) Células de tecido extra-embriônico: nas quais somente o X de origem paterna é inativado.

A inativação não-aleatória gera expressividade variável de doenças ligadas ao cromossomo X em mulheres heterozigotas. As mesmas podem ter fenótipo desde normal até plenamente afetado, dependendo da porcentagem de X ativo alterado e de X ativo não alterado por mutação, translocação ou doença recessiva ligada ao X.

#### **1.6 - Gametogênese:**

No processo de formação dos gametas femininos (oocitogênese) é necessário que ocorra a reativação do cromossomo X previamente inativo para que seus gametas disponham cada qual de um cromossomo X ativo. Este processo de reativação do cromossomo X ocorre pela ação da enzima *5-azacytidine* que inibe a metilação da citosina. Simultaneamente a isso, a expressão do gene XIST diminui.

A reativação do X é fundamental para manutenção da vida, pois do contrário 50% dos embriões masculinos (aqueles que o espermatozóide levava um Y) não sobreviveriam, uma vez que 50 % dos gametas femininos possuiriam um X inativo e pelo menos um X deve ser ativo para que o embrião se desenvolva.

## 2. Imprinting Genômico

### 2.1 – Introdução:

Com exceção dos cromossomos sexuais, X e Y, para a totalidade dos genes restantes dos cromossomos autossômicos, existem dois alelos ativos, cujas manifestações fenotípicas dependem da sua dominância ou recessividade. No entanto, vários estudos recentes, mostraram que, para alguns genes, o postulado da contribuição equitativa dos progenitores não se aplica. Nesses casos excepcionais, observa-se que apenas um dos alelos, paterno ou materno, é normalmente expresso. O alelo herdado de um dos progenitores comporta-se de forma distinta do alelo herdado do outro progenitor. Este fenômeno denomina-se imprinting genômico, já que se admite que um dos alelos parentais adquiriu, presumivelmente, uma marca (imprint) de natureza supostamente bioquímica.

O imprint deverá levar, direta ou indiretamente, à expressão diferencial de um dos alelos parentais. O imprinting poderá assim ser o responsável pelo fato de algumas doenças genéticas apenas ocorrerem quando o gene responsável é herdado por via materna, e outras quando o alelo em causa é de origem paterna, como é o caso das síndromes de Prader-Willi e Angelman. Geralmente, se refere ao somatório das diferenças entre alelos como epigenético, e elas incluem modificações covalentes do DNA (metilação), alteração da estrutura da cromatina e acetilação das histonas.

O mecanismo de imprinting não é exclusivo da classe dos mamíferos, sendo observado também em fungos, nematódios, insetos e protozoários, que apresentam elegantes processos de marcação genética, que resultam na expressão diferenciada de genes

### 2.2 - A Descoberta do Imprinting:

O imprinting genômico foi identificado no início da década de 80, através de resultados de experimentos com ratos. Uma das técnicas utilizadas consistia em fazer embriões que herdassem cromossomos específicos de apenas um dos progenitores (dissomia uniparental – Figura 2.1).

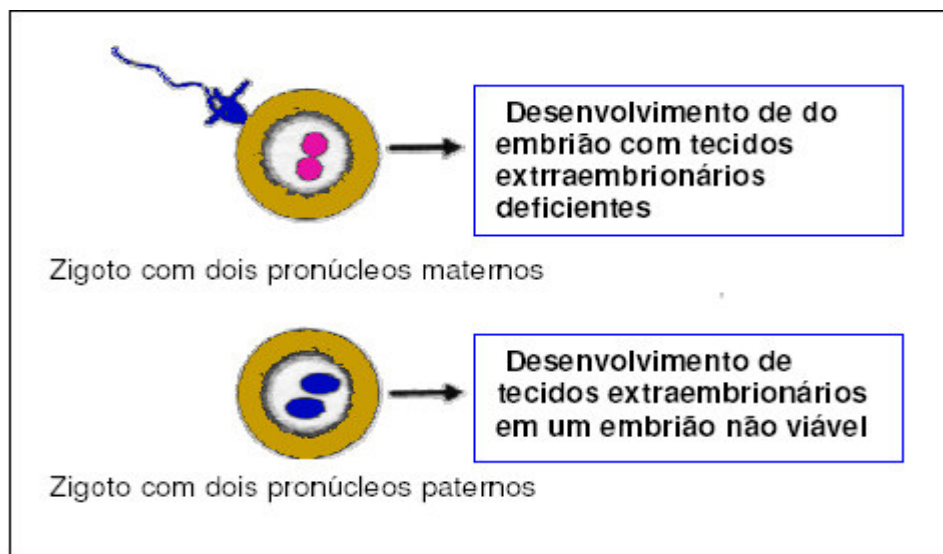


Fig. 2.1

Através deste experimento concluiu-se que alguns genes funcionariam diferentemente dependendo se a herança for materna ou paterna.

## **2.2 – Aspectos Moleculares e Propriedades do Imprinting:**

Os genes imprintados raramente são encontrados em regiões isoladas. Em torno de 80% estão fisicamente ligados em um agrupamento (cluster) com outros genes imprintados. A organização em agrupamentos deve refletir a regulação coordenada dos genes em um domínio cromossômico. Há elementos controladores do imprinting (IC'S) em alguns agrupamentos que são necessários para seu controle ou para a expressão dos genes imprintados.

Não existe uma tendência no padrão de metilação dos genes. Isto significa que a metilação pode estar associada com a atividade e inatividade do gene. Existem inúmeras propriedades que permitem a distinção entre genes expressos e não expressos e é razoável esperar que os dois alelos parentais mostrem tal diferença. Geralmente, se refere ao somatório das diferenças entre alelos como epigenético, e elas incluem modificações covalentes do DNA (metilação), alteração da estrutura da cromatina e acetilação das histonas.

## **2.3 – Genes Imprintados:**

Na década de 90 foram descobertos os primeiros genes imprintados. Hoje existem mais de 20 genes humanos imprintados identificados, desde fatores de crescimento a RNA não traduzidos, e acredita-se que 100 a 500 genes imprintados possam existir.

Alguns genes no cromossomo 11, por exemplo, são imprintados, incluindo o fator de crescimento similar a insulina (IGF-2). Este gene está imprintado no cromossomo de origem materna, e ativo apenas no cromossomo paterno. Em camundongos, se o gene IGF-2 for herdado do pai, ele possui um tamanho normal, mas se for herdado da mãe resulta num fenótipo anão.

Os genes imprintados estão normalmente envolvidos no crescimento embrionário e desenvolvimento comportamental, entretanto, devido a uma expressão imprópria, perda do imprinting ou dissomia uniparental em um *locus* imprintado, eles podem funcionar como oncogenes ou como genes supressores de tumores. Dos genes imprintados, os mais envolvidos em carcinogênese humana inclui: *IGF-2*, *WT-1*, *p57*, *p73*, *NOEY2* E *MP6/IGF-2R*. A perda do imprinting associada com a perda da metilação alelo-específica caracteriza um exemplo de variação epigenética encontrada em células cancerosas que atua como facilitadora da expressão de protooncogenes e inativadora de genes supressores de tumores

## **2.4 – As Síndromes de Prader-Willi e Angelman:**

O imprinting é, assim como outros mecanismos genéticos, passível de erros. Alterações no imprinting tem sido relatadas como causa de diversas doenças humanas. As síndromes de Prader-Willi (PWS) e Angelman (AS) constituem patologias clinicamente distintas (Figuras 2.2 e 2.3), embora ambas ocorram por perda (de função) de genes na região 15q11-q13 do cromossoma 15. Dentro desta região, vários genes são transcricionalmente ativos apenas no cromossomo herdado do pai, enquanto outros são ativos apenas no cromossomo herdado da mãe. Assim, existem vários genes nessa região que são ativos em apenas um dos cromossomos e se a única cópia ativa for perdida por uma deleção cromossômica nenhum produto gênico será gerado, resultando em doença.

Apesar da incidência das síndromes de Prader-Willi e Angelman ser relativamente baixa, nos últimos anos tornaram-se objeto de estudo intensivo, dado constituírem paradigmas do fenômeno de imprinting genômico. A maioria dos doentes com PWS ou AS possuem uma deleção do cromossoma 15, essa deleção ocorre no cromossoma 15 paterno na PWS e no cromossoma 15 materno na AS. Com efeito, uma proporção significativa de indivíduos com PWS (25%) herdam apenas o cromossoma 15 materno, uma situação conhecida por dissomia uniparental materna (UPD materna). Estudos moleculares mostraram que, na maioria dos casos, os indivíduos afetados herdam os dois cromossomas 15 maternos como resultado de não disjunção na meiose I.

Assim, por exemplo, se um ovo dissômico para o cromossoma 15 materno, for fertilizado por um espermatozóide normal, originará um zigoto com trissomia do cromossoma 15, situação que, a manter-se, originará um abortamento precoce. Se, no entanto, ocorrer nas primeiras divisões pós-zigóticas uma perda (por não-disjunção) de um dos cromossomas 15, poderá haver uma reposição do estado euplóide. Se esta não-disjunção resultar na perda do cromossoma 15 paterno (probabilidade de 1/3) ocorrerá uma PWS.

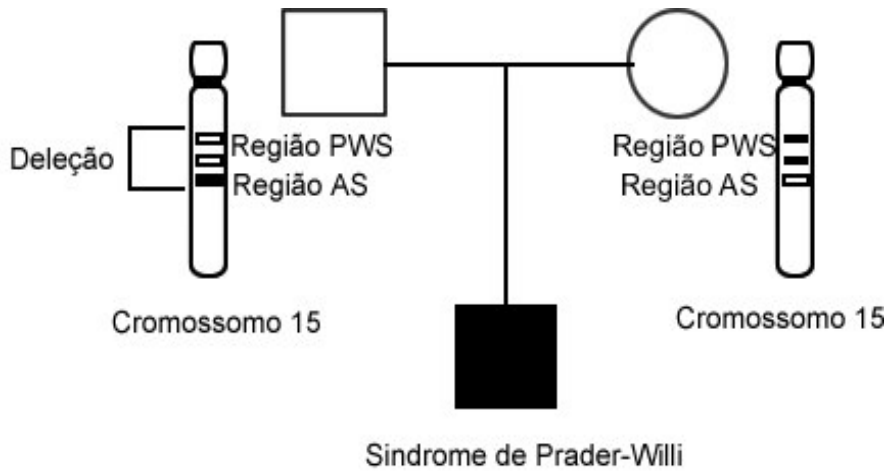
Finalmente, cerca de 1% dos casos de PWS resultam de uma pequena deleção da região que contém um centro de imprinting no cromossomo 15.

## **2.5 – Resumo:**

Em suma o *imprinting* genômico é um tipo de herança epigenética na qual os alelos de determinado gene são expressos de forma diferente dependendo de qual progenitor foram herdados. Ultimamente um crescente número de genes imprintados tem sido identificados e acredita-se que possam existir mais de cem. A maioria desses genes apresentam elementos reguladores de sua expressão, que desempenham uma importante função no desenvolvimento e sua desregulação conduz a alterações no desenvolvimento embrionário, doenças hereditárias e a carcinogênese.



## Síndromes de Prader-Willi & Angelman

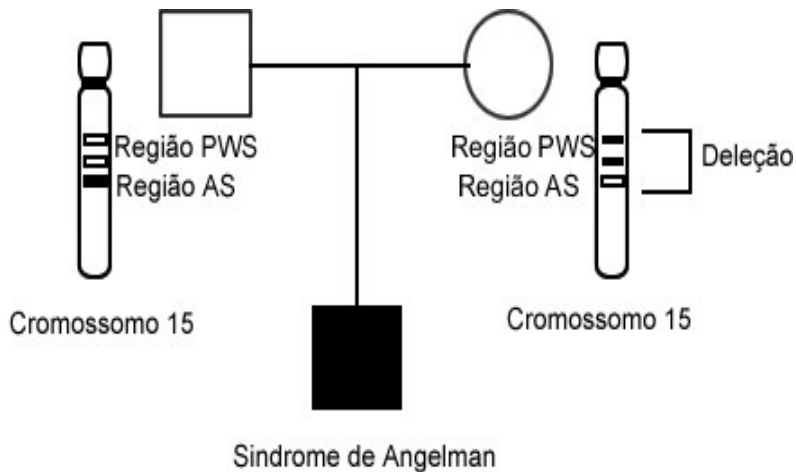


### Manifestações Clínicas da PWS

- Hipotonia
- Dificuldades alimentares
- Hipogonadismo
- Atraso psico-motor e estatuoponderal
- Hiperfagia com subsequente desenvolvimento de **obesidade**
- Mãos e pés pequenos
- Baixa estatura
- Atraso mental moderado

□ Ativo  
■ Inativo

Fig. 2.2



### Manifestações Clínicas da AS

- Atraso do desenvolvimento psicomotor
- Ausência de linguagem (menos de 6 vocábulos)
- Paroxismos de riso
- Movimentos bruscos e descoordenados
- Microbraquicefalia progressiva
- Alterações eletroencefalográficas
- Atraso mental profundo

□ Ativo  
■ Inativo

Fig 2.3