

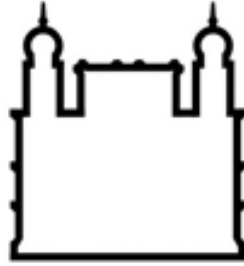
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança
e do Adolescente Fernandes Figueira**

**INVESTIGAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN**

Leonardo Lima de Faria

**Rio de Janeiro
Abril de 2018**



Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e
do Adolescente Fernandes Figueira

INVESTIGAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM PACIENTES COM SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN

Leonardo Lima de Faria

Dissertação apresentada à Pós-
Graduação em Pesquisa Aplicada
à Saúde da Mulher e da Criança,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientador: Juan Clinton Llerena Junior
Coorientadora: Sayonara Gonzalez

Rio de Janeiro,
Abril de 2018

CIP – Catalogação na Publicação

de Faria, Leonardo Lima

Investigação genética e epigenética em pacientes com Síndrome de Beckwith-Wiedemann / Leonardo Lima de Faria – Rio de Janeiro, 2018.

58f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, RJ, 2018

Orientador: Juan Clinton Llerena Jr.

Co-orientador: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez

Bibliografia: f.48 – 54

1. Síndrome de Beckwith-Wiedemann. 2. Genética. 3.Epigenética.
4. Análise de metilação. 5. Região cromossômica 11p15.5

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca da Saúde da Mulher e Criança/ICICT/IFF com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juan Llerena, por ter me auxiliado a dar mais um passo na minha carreira acadêmica ao me aceitar como seu aluno de mestrado. Por cada breve reunião em seu escritório, da qual eu saía sempre mais confiante do que quando chegava, muito obrigado.

À Profa. Dra Sayonara Gonzalez, minha coorientadora, por ter aberto as portas do Laboratório de Medicina Genômica para que eu pudesse realizar meu trabalho e por todo suporte e carinho, muito obrigado.

À Profa. Dra Leila Cardoso, minha amiga e ex-orientadora de graduação, por uma lista sem fim de boas ações na minha vida acadêmica e pessoal desde 2013. Muito obrigado por continuar acompanhando meu trabalho, dando suporte, corrigindo e me orientando, ainda que extraoficialmente. Sua colaboração só não é maior que minha gratidão.

À Lucia Moraes, pelo auxílio imprescindível para a realização desse trabalho, por ter tido paciência e uma boa vontade inesgotável para me auxiliar nas diversas etapas metodológicas desse trabalho e por ter tentado mostrar em mim um potencial que raramente percebo. Minha gratidão pela sua contribuição é extrema.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Fernando Reglas Vargas e Prof. Dr. Leonardo Gomes, pela disponibilidade e boa vontade em aceitar meu convite. Pelas considerações, muito obrigado.

Agradeço à minha mãe, Denair Lima, e ao meu pai, Ricardo Faria, por terem me concedido apoio em todos os aspectos da vida e por terem estado ao meu lado por todo o tempo, ainda que nem sempre concordando com minhas direções. Por cada conselho e cada incentivo, muito obrigado.

À equipe do Laboratório de Medicina Genômica, Natana, Célia, Maria Eduarda, Fernanda, Juliana por terem me recebido com afeto e gentileza, sempre dispostas a me ajudar nas mais variadas etapas desse trabalho.

À Thays Vieira, pela contribuição, boa vontade, amizade, piadas, lágrimas enxugadas e compartilhadas. Pelos sonhos contemplados juntos, muito obrigado. Afirmo que sua presença foi o ponto alto dessa jornada.

Aos pacientes e seus pais, sem os quais esse trabalho não seria possível.

As agências de fomento CAPES e Ministério da Saúde

E, por fim, ao que compreendo como sendo Deus, por falta de termo melhor.

Lista de Abreviações

°C	Grau Celcius
DMR	Região diferencialmente metilada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IC1	Centro de <i>Imprinting</i> 1
IC2	Centro de <i>Imprinting</i> 2
IFF/FIOCRUZ	Instituto Fernandes Figueira/ Fundação Instituto Oswaldo Cruz
kb	Kilobase
LOH	Perda de heterozigosidade
LOI	Pedra de <i>imprinting</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS-MLPA	<i>Methylation Sensitive Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	Polimerização de reação em cadeia
pH	Potencial de hidrogenização
rpm	Rotação por minuto
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SPW	Síndrome de Prader Willi
SA	Síndrome de Angelman
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
UPD	Dissomia uniparental
UPDp	Dissomia uniparental paterna
WT	Tumor de Wilms
WT2	Locus Tumor de Wilms 2
µL	Micro litro

Resumo:**Investigação genética e epigenética em pacientes com Síndrome de Beckwith-Wiedemann**

Os erros no padrão de *imprinting* são caracterizados como alterações epigenéticas por não afetarem a sequência nucleotídica do DNA mas modificarem a expressão gênica. Diversos aspectos do desenvolvimento embrionário, incluindo ocorrência de malformações congênitas e síndromes diversas, como a síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW; OMIM#130650) ocorrem em decorrência de eventos epigenéticos. A etiologia molecular de SBW é descrita com base em alterações epigenéticas na região cromossômica 11p15.5, que possui genes cuja expressão é regulada por dois centros de *imprinting* (IC) ou regiões diferencialmente metiladas (DMR). O IC1, que controla a expressão dos genes *IGF2* e *H19* apresenta metilação no alelo paterno e ausência de metilação no alelo materno; o IC2 encontra-se metilado normalmente no alelo materno, participando no controle da expressão dos genes *CDKN1C*, *KCNQ1* e *KNCQ1OT1*. A etiologia de SBW também está associada a mutações pontuais em genes como *CDKN1C*, que codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina da fase G1 do ciclo celular. O objetivo deste trabalho é investigar alterações genéticas e epigenéticas em amostras de DNA de 21 pacientes com SBW oriundos do Ambulatório de Genética Médica do Instituto Nacional Fernandes Figueira IFF/FIOCRUZ. A abordagem metodológica consistiu na análise do perfil de metilação dos dois centros de *imprinting* de 11p15.5 com uso da técnica de MS-MLPA; análise de microssatélites dessa região, visando discriminar alterações epigenéticas em ambos os centros de *imprinting* de possíveis dissomias uniparentais (UPD); e a amplificação do gene *CDKN1C*, para sequenciamento de Sanger. Dos 21 pacientes analisados inicialmente por MS-MLPA, sete não apresentaram nenhuma alteração epigenética. Após reavaliação clínica foi confirmado o diagnóstico de SBW em três desses sete pacientes enquanto que os outros quatro pacientes apresentaram características clínicas isoladas associadas à SBW, sendo excluídos da amostra. Nos 14 pacientes restantes a análise de MS-MLPA identificou 10 casos de perda isolada de metilação no IC2, três casos de deleção em IC2 e um caso de ganho de metilação em IC1 com perda em IC2 (UPDp). Este trabalho confirmou estudos anteriores sobre a ocorrência de alterações epigenéticas nesta síndrome; em consequência, permitindo uma orientação clínica e antecipação do monitoramento de pacientes quanto ao risco de tumores pediátricos.

Palavras Chave: Síndrome de Beckwith-Wiedemann; metilação; epigenética; gene *CDKN1C*; MS-MLPA; Locus 11p15.5.

Abstract:**Genetic and epigenetic investigation in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome.**

Errors in imprinting pattern are characterized as epigenetic alterations, not affecting the nucleotide sequencing on DNA but affecting the gene expression. Several aspects of embryonic development, including occurrence of abnormalities and congenital disorders, as Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS; OMIM#130650) occur due to epigenetic events. The molecular etiology of BWS is described based on epigenetic alterations in 11p15.5 chromosomal region, which includes genes that have their expression regulated by two imprinting centers (IC) or differentially methylated region (DMR). The IC1 regulates the gene expression of IGF2 and H19 genes. This IC shows a high methylation level only in the paternal allele. The IC2, normally methylated on the maternal allele, controls the gene expression of CDKN1C, KCNQ1 e KCNQ1OT1 genes. Besides these alterations, BWS's etiology is also associated with point mutations in CDKN1C gene, which encodes a cyclin dependent kinase inhibitor, acting on G1 cellular cycle phase. The purpose of this study is to investigate genetic and epigenetic alterations in DNA samples of 21 patients with BWS from Instituto Nacional Fernandes Figueira IFF/FIOCRUZ. The methodological approach was based on the methylation profile's analysis of the two 11p15.5 imprinting centers using the MS-MLPA technique; microsatellite analysis of this region, aiming to distinguish epigenetic alterations on both imprinting centers from possible uniparental disomy (UPD); and CDKN1C gene Sanger sequencing. Seven of 21 patients analysed by MS-MLPA did not show any epigenetic alteration. After a clinical reevaluation the BWS diagnosis was confirmed to three of these seven patients while the remaining four only showed isolated clinical features associated with BWS. On 14 patients MS-MLPA analysis identified 10 cases of isolated loss of methylation on IC2, three cases of IC2 deletions and one case with both gain of methylation on IC1 and loss of methylation on IC2 (UPDp). This study confirmed previous researches about the epigenetic alteration occurrence in BWS; in consequence, allowing a clinical monitoring to these patients due to the risk of pediatric tumors.

Palavras Chave: Beckwith-Wiedemann syndrome; methylation; epigenetic; *CDKN1C* gene; MS-MLPA; 11p15.5 locus.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
JUSTIFICATIVA.....	13
OBJETIVOS.....	14
REFERENCIAL TEÓRICO	15
I.1 Epigenética.....	15
I.2 Metilação no DNA	15
I.3 Imprinting.....	17
I.4 Dissomia Uniparental.....	20
I.5 Locus WT2 – A região cromossômica 11p15.5	22
I.6 A Síndrome de Beckwith-Wiedemann.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS	27
1) Caracterização da pesquisa.....	27
2) Pacientes.....	27
3) Registro de informações clínicas.....	27
4) Critérios de inclusão.....	27
5) Considerações éticas.	27
6) Extração de DNA proveniente de sangue periférico.....	28
7) <i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	29
8) Genotipagem da região 11p15.5.....	32
9) Padronização do rastreamento mutacional do gene <i>CDKN1C</i>	33
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	47
ANEXO.....	54

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: (A) Reprogramação do *imprinting* com remoção das marcas epigenéticas e o reestabelecimento da metilação em função do sexo. Cromossomos materno e paterno representados em rosa e azul, respectivamente; marcações epigenéticas representadas por áreas cinzas nos cromossomos. (B) Grau de metilação no desenvolvimento. Desmetilação global nas células germinativas (CGP), com remoção das marcas epigenéticas (linhas tracejadas rosas e azuis), seguida da metilação de novo, reestabelecendo o padrão de metilação em função do sexo na gametogênese. Após a fecundação ocorre um segundo evento de desmetilação global, seguido da remetilação antes da implantação. TR, trofoblasto; MCI, massa celular interna. Adaptado de Ishida & Moore (2003).....18

Figura 2) O locus WT2. À esquerda, Domínio centromérico, com KvDMR metilada (pontos pretos) no alelo materno, e à direita, o Domínio telomérico, mostrando a ligação de CTCF em DMRH19 no alelo materno, não permitindo a metilação desta região. Em azul, genes expressos maternalmente; em vermelho, genes expressos paternalmente; em cinza genes não expressos; em roxo, a proteína CTCF. Adaptado de Weksberg *et al.* (2005).....23

Figura 3) Figura esquemática do gene CDKN1C e da proteína correspondente. Éxons 2 e 3 codificam a proteína, representada abaixo dos éxons. Notar os três domínios da proteína: 1) inibidor de cinase dependente de ciclina (CdK); 2) repetição de prolina-alanina (domínio PAPA); 3) domínio de ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Intervalos numéricos indicam as regiões gênicas que codificam os domínios da proteína. (Adaptado de Eggermann *et al.*, 2014).....29

Figura 4) Gráfico referente a análise do número de cópias (A) e perfil de metilação (B) fornecido pelo software Coffalyser.net. Área em cor salmão compreende as 26 sondas (representadas por pontos pretos) de interesse para a região 11p15.5, incluindo as 10 sondas com sítios para enzima de restrição Hha1. Linha azul no gráfico A corresponde a variação máxima da normalidade para número de cópias; linha vermelha no gráfico A corresponde a variação mínima da normalidade para número de cópias. Linha azul no gráfico B corresponde ao limite máximo de metilação para a normalidade; linha vermelha no gráfico B corresponde ao limite mínimo de metilação para a normalidade. Notar as duas sondas em vermelho, no gráfico B, totalmente digeridas e que são utilizadas como controle interno para verificação da atividade enzimática de Hha1.....31

Figura 5) Idiograma do cromossomo 11. Localização dos microssatélites em 11p15.5 indicadas pela marcação vermelha na extremidade.....31

Figura 6) Gráfico referente à análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P14, um dos 10 pacientes com perda isolada de metilação em IC2. (A) indica número de cópias normal. (B) não indica alteração no centro de imprinting 1 (53.5%) e indica hipometilação isolada (5.12%) no centro de imprinting 2, representado graficamente pelas sondas em vermelho localizadas dentro do gene KCNQ1OT1. Sondas com sítio para enzima de restrição Hha1, nomeadas acima do gráfico.....36

Figura 7) Gráfico referente a análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P2. Gráfico (A) indica número de cópias normal. (B) indica hipermetilação (círculos em roxo) em IC1 (77.5%) e hipometilação (círculo em roxo) em IC2 (28.75%). A cor roxa indica que tanto os índices de metilação de IC1 quanto os de IC2 não ultrapassaram as linhas que determinam os valores de normalidade.....36

Figura 8) Gráfico referente a análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P12, um dos três pacientes com deleção em sondas que abrangiam o IC2. (A) indica número de cópias alterado, com deleção de 10 sondas (marcadas em vermelho). Gráfico B indica hipometilação no IC2.....37

Figura 9) Eletroferograma da amostra do paciente P2. A) marcador de microssatélite D11S2071 em heterozigose (2 picos, indicados por setas pretas, referentes aos alelos de tamanhos diferentes, 188.36 e 193.17). B) marcador de microssatélite D11S4088 também em heterozigose (2 picos, indicados por setas pretas, referentes aos alelos de tamanhos diferentes, 219.11 e 241.04). Amostras dos pais do paciente não estavam disponíveis.....39

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Correlação entre principais alterações em 11-15.5 e fenótipos associados.....	24
Tabela 2: Marcadores de microssatélites da região 11p15.5.....	32
Tabela 3: Informações dos iniciadores utilizados para sequenciar o gene <i>CDKN1C</i>	34
Tabela 4: Achados clínicos e índices de metilação de IC1 e IC2.....	38

INTRODUÇÃO

Os erros no padrão de *imprinting* são caracterizados como alterações epigenéticas por não afetarem a sequência nucleotídica do DNA mas modificarem a expressão gênica (Grossniklaus *et al*, 2013). Diversos aspectos do desenvolvimento embrionário, incluindo ocorrência de malformações congênitas e síndromes diversas, como a síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW; OMIM#130650) ocorrem em decorrência de eventos epigenéticos (Shuman *et al*, 2016; Ibrahim *et al*, 2013). A SBW é uma síndrome de crescimento desorganizado caracterizada clinicamente pela presença de macrossomia, macroglossia, hemihipertrofia, defeitos na parede abdominal, depressões retro auriculares e predisposição a neoplasias infantis, com destaque para o tumor de Wilms, um tumor renal de origem embrionária (Sato *et al*, 2006; Scott *et al*, 2008). A etiologia molecular de SBW é descrita com base em alterações na região cromossômica 11p15.5, que aloja diversos genes cuja expressão é regulada por dois centros de *imprinting* (IC) ou regiões diferencialmente metiladas (DMR) (Romanelli *et al*, 2011a; Eggermann *et al*, 2014). O IC1, que controla a expressão dos genes *IGF2* e *H19* apresenta metilação no alelo paterno e ausência de metilação no alelo materno. Com a metilação em IC1 no alelo paterno, o gene *H19* não é expresso, uma vez que IC1 localiza-se dentro de sua região promotora. Com essa região metilada, os fatores de transcrição não interagem com essa região, o que permite que a cromatina assumira uma conformação favorável à expressão de *IGF2* no alelo paterno. No alelo materno, por sua vez, o IC1 encontra-se protegido pela proteína dedo de zinco CTCF, que impede a sua metilação e possibilita que haja a expressão do gene *H19*. O IC2 por sua vez, localizado em *KCNQ1OT1*, encontra-se metilado normalmente no alelo materno, participando no controle da expressão dos genes *CDKN1C*, *KCNQ1* e *KCNQ1OT1*. No alelo paterno, o gene *KCNQ1OT1* é expresso e seu produto inibe in cis a expressão de *KCNQ1* e *CDKN1C*. No alelo materno, a metilação em *KCNQ1OT1* impede a expressão desse gene, possibilitando a expressão de

KCNQ1 e *CDKN1C* (Sparago *et al*, 2007; Zimmerman *et al*, 2013; Abi Habib *et al*, 2014). Além dessas alterações, a etiologia de SBW também está associada a mutações pontuais em genes como *CDKN1C*, que codifica um inibidor de cinase dependente de ciclina da fase G1 do ciclo celular (Milani *et al*, 2014).

JUSTIFICATIVA

A identificação de alterações epigenéticas e genéticas possui importante implicação clínica nos casos de SBW, uma vez que a hipermetilação de DMRH19 associa-se a um risco aumentado em desenvolver diversos tipos de tumores embrionários, sendo o tumor de Wilms o mais frequente. O estudo do locus WT2, via a técnica de MS-MLPA, tem, portanto, sua importância no diagnóstico molecular e no prognóstico de pacientes com SBW; além da caracterização de alterações epigenéticas que podem estar associadas ao desenvolvimento do TW (Smith *et al*, 2007). De forma complementar à técnica de MS-MLPA, o uso de microssatélites possibilita uma melhor caracterização de possíveis alterações associadas simultaneamente aos dois centros de *imprinting* que comportam o locus WT2, contribuindo de forma mais específica para a identificação de alterações genéticas relacionadas à síndrome. Paralelamente o rastreamento de mutações genéticas, especialmente nos casos sem alterações epigenéticas, possibilita uma melhor compreensão e distinção de novos mecanismos moleculares associados à SBW. Além da relevância clínica para o paciente em questão, os estudos genético e epigenético dessas amostras contribuem para o aconselhamento genético de famílias que possuem membros com SBW. Por fim, o levantamento de informações sobre as diferentes alterações moleculares que conduzem ao desenvolvimento de uma mesma síndrome auxilia a compreensão do espectro fenotípico observado clinicamente nos pacientes brasileiros.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Investigar alterações epigenéticas e genéticas na região 11p15.5 em pacientes com SBW.

Objetivos específicos:

- 1) Investigar alterações epigenéticas no locus 11p15.5 (DMRH19 e KvDMR) a partir da técnica de MS-MLPA.
- 2) Averiguar os possíveis casos de UPD paterna de 11p15.5 a fim de discriminar se esta é uma alteração epigenética ou estrutural a partir da genotipagem da família com o uso de marcadores de microssatélites de 11p15.5.
- 3) Padronizar o rastreamento mutacional a partir do sequenciamento do gene *CDKN1C* nos casos em que não forem encontradas alterações epigenéticas.

REFERENCIAL TEÓRICO

I.1 Epigenética

A epigenética corresponde aos fenômenos moleculares que afetam a expressão gênica sem alterar a sequência nucleotídica do DNA e que são herdáveis, seja de modo histológico, de uma célula para outra, ou transgeracional, de um indivíduo ao outro. A forma, como essas modificações sobre o DNA são mantidas e herdadas, assim como o modo como esses eventos coordenam processos como a regulação gênica e o desenvolvimento de organismos eucarióticos, principalmente os mamíferos, tem ampliado nosso conhecimento sobre mecanismos envolvidos na regulação gênica (Grossniklaus *et al*, 2013).

Dentre os fenômenos epigenéticos mais descritos está a incorporação ou a remoção do radical metil em citosinas de regiões ricas em repetições “citosina-fosfodiéster-guanina”, conhecidas como "ilhas CpG", resultando, respectivamente na metilação ou demetilação ao longo do genoma, além da adição e remoção de radicais metil e acetil em resíduos de aminoácidos específicos na cauda de histonas. O efeito do radical sobre o equilíbrio de cargas elétricas entre a molécula de DNA e a histona promove ou inibe a compactação do DNA dependendo de qual aminoácido é alvo da remoção ou adição do radical, resultando por fim, na ativação ou inibição expressão gênica (Bartolomei & Ferguson-Smith, 2011; Peltomäki, 2012; Grossniklaus *et al*, 2013).

I.2 Metilação no DNA

Em geral, a metilação da região promotora de um gene impede que a mesma seja acessada pelos fatores de transcrição, inibindo expressão do gene, enquanto que a demetilação desta região permite a transcrição gênica. A importância da metilação do DNA como inibidor

da transcrição foi experimentalmente descrita por Jones & Taylor (1980) utilizando 5-azacitidina (5-aza-CR), um análogo de citidina que inibine a metilação de citosinas, em cultura de células musculares de camundongos afim de caracterizar o processo de diferenciação celular e constataram que mesmo numa baixa incorporação de 5% de 5-aza-CR, 85% de citosinas na molécula de DNA havia inibição da metilação, sugerindo que as enzimas responsáveis pela metilação do DNA (DNA metiltransferases) agiam ao longo da dupla fita durante a adição de grupos metil; e, ao depararem com resíduos de 5-aza-CR (mesmo que em baixa incorporação), este passava a impedir a ação da enzima, inibindo a metilação da molécula de DNA, e, conseqüentemente, permitindo a expressão gênica. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram uma relação causal entre a metilação do DNA e expressão gênica, culminando na diferenciação celular.

Boyes & Bird (1991) propuseram dois modelos de inibição da transcrição gênica via a metilação: 1) inibição direta, na qual fatores de transcrição reconhecem o CpG metilado como uma "mutação" no seu sítio de ligação e com isso ficam inaptos a interagirem com a região genômica em questão, como ocorre nas regiões promotoras de genes; e 2) inibição indireta, na qual proteínas nucleares interagem com o DNA metilado, prevenindo, por consequência, a interação do DNA com fatores de transcrição, como ocorre na interação do DNA com fatores de ligação do tipo dedos de zinco, como a proteína CTCF (*CCCTCF binding factor*).

Cada célula no organismo possui o mesmo genótipo, no entanto, o caráter reversível da marcação por radicais metil e sua função na regulação gênica faz com que existam diversos “epigenótipos” possíveis dependendo do estado de atividade celular específico de cada tecido, das fases do desenvolvimento e até de condições ambientais (Peltomäki, 2012).

I.3 Imprinting

A regulação da expressão gênica por metilação inclui o fenômeno de *imprinting*, no qual as “marcações metil” são herdadas de acordo com a origem parental do cromossomo, possibilitando uma expressão gênica diferencial, um modelo de herança não mendeliano. Esse modelo de herança é descrito não apenas em humanos, mas em todos mamíferos e também em angiospermas, ambos organismos com estruturas extra-embriônica, onde são registradas diferenças na expressão gênica entre o embrião e a placenta, no caso dos mamíferos, e entre o embrião e o endoesperma, no caso das plantas (Pires & Grossniklaus, 2014).

Diversas teorias evolutivas propõem explicações para o entendimento de como esse modelo de herança teria sido fixado em diversos organismos ao longo da evolução, uma vez que a expressão diferencial de genes conduz à uma expressão monoalélica, acarretando em um custo adaptativo em função da exposição de mutações recessivas nesses genes. A principal semelhança entre essas teorias consiste no antagonismo funcional de genes ligados ao crescimento e de como os genomas paterno e materno contribuem de forma diferenciada para o desenvolvimento do embrião (Patten *et al*, 2014)

O *imprinting* genômico sofre uma reprogramação dinâmica durante dois períodos do desenvolvimento embrionário em mamíferos: nas células da linhagem germinativa e no período pré implantação (Figura 1). Durante a gametogênese as marcações do *imprinting* são removidas em ambos os cromossomos e reestabelecidas em função do sexo do indivíduo, de modo que em um embrião masculino o *imprinting* do cromossomo materno após ser apagado será novamente adicionado, mas de acordo com o *imprinting* paterno. No caso de um embrião feminino ocorre o oposto, o alelo de origem paterna receberá o *imprinting* materno (Pfeifer, 2000). Dessa forma, os genes que sofrem *imprinting* são expressos de acordo com a origem parental do cromossomo herdado (Sparago *et al*, 2007). Logo após a fertilização, no período

pré-implantação, o genoma sofre uma outra onda global de desmetilação seguida por uma metilação *de-novo* no período pós implantação. Esses eventos de reprogramação permitem que possíveis alterações epigenéticas possam ser corrigidas, prevenindo sua transmissão para a próxima geração (Kelsey *et al*, 2013).

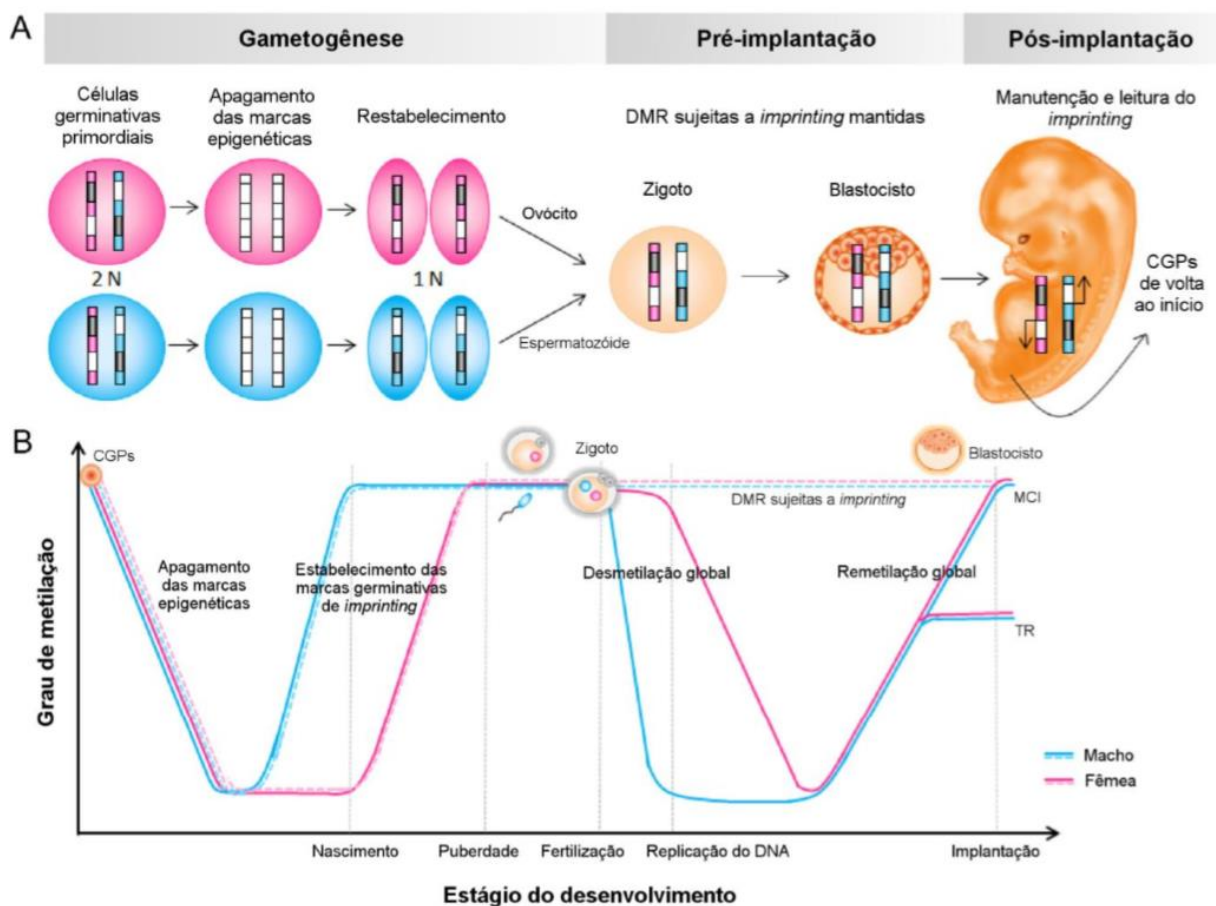


Figura 1 (A) Reprogramação do *imprinting* com remoção das marcas epigenéticas e o reestabelecimento da metilação em função do sexo. Cromossomos materno e paterno representados em rosa e azul, respectivamente; marcações epigenéticas representadas por áreas cinzas nos cromossomos. (B) Grau de metilação no desenvolvimento. Desmetilação global nas células germinativas (CGP), com remoção das marcas epigenéticas (linhas tracejadas rosas e azuis), seguida da metilação de novo, reestabelecendo o padrão de metilação em função do sexo na gametogênese. Após a fecundação corre um segundo evento de desmetilação global, seguido da remetilação antes da implantação. TR, trofoblasto; MCI, massa celular interna. Adaptado de Ishida & Moore (2003)

Os genes que sofrem *imprinting* em geral são organizados em *clusters* gênicos (Ibrahim *et al*, 2014), e estão envolvidos em várias etapas do desenvolvimento embrionário e formação placentária. Assim, alterações no padrão de *imprinting* podem originar, por exemplo, doenças como distúrbios de crescimento, síndromes e cânceres. As síndromes de Prader-Willi (SPW; OMIM #176270; obesidade, hipotonia muscular, retardo mental, baixa estatura, hipogonadismo hipogonadotrópico e pés e mãos pequenos) e de Angelman (SA; OMIM #105830; retardo mental, desordem de movimentação e equilíbrio, comportamentos anormais típicos e limitações graves de fala e linguagem) foram duas das principais síndromes associadas aos erros de *imprinting*, ambas secundárias de forma predominante a deleções de 15q11-q13 (Procter *et al*, 2006). Na SPW 70% dos indivíduos possui deleção da região 15q11-q13 de herança paterna, 25% apresenta dissomia uniparental (UPD, do inglês *uniparental disomy*) materna e cerca de 5% associa-se às alterações de *imprinting*. Já os casos de SA, incluem deleção de 15q11-q13, de herança materna, em 70% dos casos, UPD paterna em 7%, e erros de *imprinting* em cerca de 3% dos casos (Procter *et al*, 2006 *apud* Cassidy & Schwartz, 1998). A síndrome de Beckwith Wiedemann (SBW, OMIM#130650; macrossomia, macroglossia, visceromegalia e tumores embrionários), por sua vez, foco desse estudo, também é uma síndrome que foi amplamente relacionada aos erros de *imprinting* (Shuman *et al*, 2016) e representa uma doença congênita de crescimento resultante da expressão anormal de genes da região 11p15.5 (Ibrahim *et al*, 2014). Alterações epigenéticas envolvendo centros reguladores de *imprinting* são responsáveis pelo desenvolvimento de malformações e síndromes diversas, muitas das quais frequentemente apresentam sobreposição de características clínicas envolvendo distúrbios de crescimento (Girardot *et al*, 2013).

I.4 Dissomia Uniparental

Outro mecanismo genético dependente da origem parental dos alelos herdados é a dissomia uniparental, caracterizada quando um indivíduo possui as duas cópias de um cromossomo, inteiro ou partes dele, oriundas de um mesmo progenitor. Se ambos os cromossomos são de origem paterna, há a ocorrência de dissomia uniparental paterna (UPDp); e, caso sejam de origem materna, uma dissomia uniparental materna (UPDm). Esse fenômeno, inicialmente descrito em alterações no desenvolvimento embrionário, pode ser oriundo de erros ocorridos durante a meiose do progenitor ou durante as primeiras divisões mitóticas do zigoto; e podendo, por fim, acarretar em um mosaïcismo celular somático. Os mecanismos pelos quais a UPD pode ocorrer são: 1) não disjunção durante a meiose 1 ou 2, gerando um gameta diplóide que, após a fertilização com um gameta haplóide irá gerar uma trissomia cromossômica, completa ou parcial. A partir desse momento pode haver um evento de resgate do perfil diplóide das células, deletando uma das três cópias cromossômicas. Caso a cópia deletada seja o alelo de origem oposta ao alelo duplicado dá-se a UPD; 2) a complementação gamética, onde ocorre a fertilização de um gameta nulissômico com um gameta dissômico; 3) fertilização entre um gameta haplóide com um gameta nulissômico, gerando um zigoto haplóide que poderá sofrer uma subsequente duplicação cromossômica; e, por fim, 4) recombinação não homóloga, acarretando em uma UPD parcial (Tuna *et al*, 2009). A recuperação do número de cópias normal diplóide a partir de uma célula inicialmente haplóide ou de um zigoto triplóide é conhecida como diploidização ("tornar diplóide") (Romanelli *et al*, 2011a).

A hipótese mais provável que explica o mecanismo pós-zigótico de diploidização baseia-se em falhas na replicação do DNA proveniente de um dos genitores. Por exemplo, falhas na replicação de um dos cromossomos maternos, nas primeiras divisões celulares após

a fecundação, seguida pela endoreplicação do homólogo paterno, que não sofreu tal falha. Essa hipótese foi utilizada por Romanelli *et al*, 2011 em um estudo de caso de uma mulher de 26 anos de idade com síndrome de Beckwith-Wiedemann que foi diagnosticada com tumor de Wilms aos 4 anos de idade e adenoma adrenocortical, diagnosticado aos 20 anos. O proposto diagnóstico molecular de SBW, secundário a uma UPDp de 11p15, foi baseado na genotipagem da região 11p15.5 e confirmado por MS-MLPA (*Methylation Specific-Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*). Esta técnica possibilita identificar níveis de metilação de uma amostra de DNA, por hibridização de sondas e uso de enzima de restrição em amostras de DNA de sangue da paciente e de seus pais. A técnica de SNP CGH-array (*Single Nucleotide Polymorphism arrays*) mostrou a perda de heterozigose (do inglês *LOH – loss of heterozygosity*) em todos cromossomos, mantendo a contribuição, quase que completa, do genoma paterno para garantir o perfil diploide das células da paciente. Este mesmo grupo realizou uma análise de microssatélites de diversos cromossomos confirmou nas células de sangue, pele, urina, mucosa oral e outros tecidos, que quase toda a contribuição genômica era paterna (85%) com a contribuição materna com baixo mosaicismo (15%). A análise de microssatélites do cromossomo X, na paciente, indicou que na maioria das células ambos os cromossomos X eram de origem paterna. A UPDp foi confirmada pela técnica de MS-MLPA, onde claramente foi possível mostrar a falta de metilação alélica apropriada em 14 regiões diferencialmente metiladas localizadas em sete diferentes cromossomos autossômicos. Este foi o caso mais recente de UPD em um genoma completo secundário à diploidização, estando associado a repercussões clínicas na presença de diferentes tumores ocorrendo simultaneamente em um mesmo indivíduo.

A dissomia uniparental leva à perda de heterozigosidade (LOH), um fator importante na tumorigênese, decorrente, por exemplo, da inativação somática de genes supressores tumorais, responsáveis por impedir a proliferação de células danificadas, ou a ativação de

proto-oncogenes, que, através de mutações de ganho de função, estimulam a proliferação e sobrevivência de células tumorais (Lee & Muller, 2010). A LOH proporciona a perda localizada de *imprinting* (do inglês *loss of imprinting* - LOI), via a ausência da contribuição parental balanceada em uma determinada região regulada por esse mecanismo, podendo ser caracterizada como uma “UPD por erro de *imprinting*”. Nesse modelo, ambas cópias do genoma são de origem parentais distintas; porém, dependendo da alteração epigenética e de sua origem parental, uma região herdada, por exemplo, maternalmente, pode receber o padrão de *imprinting* do alelo paterno, fazendo com que esse alelo materno se comporte, em nível de expressão gênica, como o alelo paterno (Romanelli *et al*, 2011a).

I.5 Locus WT2 – A região cromossômica 11p15.5

A região 11p15.5, de aproximadamente um milhão de pares de base (1Mb), desempenha um importante papel no desenvolvimento e crescimento humano, através de diversos fatores regulatórios. Esse locus, conhecido como WT2 (do inglês *Wilms tumor 2 locus*) possui um conjunto de genes cuja expressão é regulada por dois centros de *imprinting* ou regiões diferencialmente metiladas (DMRs) (Figura 2): o centro de *imprinting* 1 (IC1), telomérico, também denominado DMRH19 e, o centro de *imprinting* 2 (IC2), centromérico, também conhecido como KvDMR. Normalmente, DMRH19 é metilado somente no alelo paterno e localiza-se à 5' do promotor do gene *H19*. Este centro de *imprinting* regula a expressão de *H19*, pelo alelo materno, um RNA não codificante que atua como supressor tumoral, impedindo a expressão do gene *IGF2* (do inglês *insulin-like growth factor 2*) neste alelo. O gene *IGF2* é um fator de crescimento fetal normalmente expresso somente pelo alelo paterno e, assim como *H19*, é expresso em tecidos derivados do endoderma e do mesoderma durante o desenvolvimento embrionário (Eggermann *et al*, 2014).

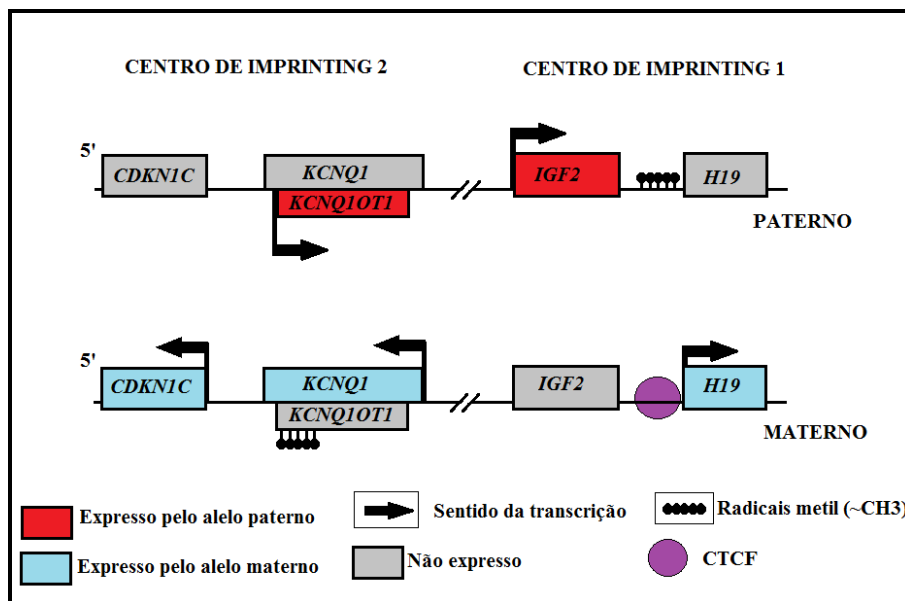


Figura 2) O locus WT2. À esquerda, Domínio centromérico, com KvDMR metilada (pontos pretos) no alelo materno, e à direita, o Domínio telomérico, mostrando a ligação de CTCF em DMRH19 no alelo materno, não permitindo a metilação desta região. Em azul, genes expressos maternalmente; em vermelho, genes expressos paternalmente; em cinza genes não expressos; em roxo, a proteína CTCF. Adaptado de Weksberg *et al.* (2005).

O padrão de *imprinting* de IC1 é mantido via a ligação da proteína dedo de zinco CTCF que possui importante papel na regulação da expressão gênica e que se liga, durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, à DMRH19, apenas no alelo materno, impedindo que esta DMR seja metilada, enquanto a DMRH19 do alelo paterno sofre metilação. No alelo paterno a metilação de DMRH19 permite que a cromatina assuma uma conformação favorável ao acesso de fatores de transcrição ao promotor de *IGF2*, possibilitando a expressão do mesmo. A epimutação mais comum nessa região é o ganho de metilação de DMRH19 materna, levando a uma expressão bialélica de *IGF2*, presente em 10% dos casos de SBW. Essa alteração encontra-se presente em 69% dos casos de tumor de Wilms (TW) esporádicos, tumor embrionário presente em até 7% dos pacientes com SBW. De forma oposta, o contra-tipo clínico se dá pela perda de metilação de DMRH19, levando a uma expressão bialélica de *H19*, uma das alterações mais frequentes relacionadas à etiologia molecular da síndrome Silver-Russell (SSR; OMIM#180860) (Õunap, 2016; Bliek, 2009).

Por sua vez, KvDMR, metilado somente no alelo materno em condições normais, comporta os genes *KCNQ1* (*potassium voltage-gated channel gene*), *CDKN1C* (*dependent kinase inhibitor 1C*) expressos pelo alelo materno e *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*), expresso apenas no alelo paterno. A região diferencialmente metilada KvDMR engloba a região promotora do gene *KCNQ1OT1* e encontra-se metilada somente no alelo materno. No alelo paterno o estado demetilado de KvDMR permite a expressão de *KCNQ1OT1*, cujo transcrito regula, *in cis*, a expressão de *CDKN1C*, inibindo-a na maioria dos tecidos, apesar da expressão em nível basal durante o desenvolvimento fetal (Matsuoka et al., 1996). A perda de metilação do alelo materno é uma das alterações mais frequentes nessa região, presente em 50% dos casos de SBW e a UPDp possui uma frequência de 20% dos casos dessa síndrome. De forma semelhante ao que ocorre com PWS e AS, a duplicação materna dessa região, resulta na expressão bialélica do gene, *CDKN1C*, e está associada a ocorrência da Síndrome de Silver Russel (Schönherr et al, 2007; Sparago et al, 2007; Zimmerman et al, 2013; Abi Habib et al, 2014; Eggermann et al, 2010).

Tabela 1) Correlação entre principais alterações em 11-15.5 e fenótipos associados:

Hipermetilação em IC1	Hipometilação em IC2	UPDp
Supercrescimento neonatal	Supercrescimento pós natal	Supercrescimento neonatal
Macroglossia	Onfalocele	Hemihiperplasia
Visceromegalia	Macroglossia	Hérnia umbilical
Anomalias renais	Malformações auriculares	Anomalias renais
Hipoglicemia	Hipoglicemia	Hipoglicemia
Tumor de Wilms		Tumor de Wilms

I.6 A Síndrome de Beckwith-Wiedemann

A SBW possui uma prevalência de 1:13.700 nascimentos, sendo esporádica em aproximadamente 85% dos casos e hereditária em aproximadamente 15% (Udayakumaran & Onyia, 2015). Os pacientes com SBW possuem um risco aumentado de desenvolver TW, um tumor renal de origem embrionária que representa 6% de todas as neoplasias infantis. O desenvolvimento de TW acomete 7% dos casos de SBW (Sato *et al*, 2006; Scott *et al*, 2008). Aproximadamente 69% dos TW apresentam alterações epigenéticas na região 11p15.5, no locus WT2 (Scott *et al*, 2012).

Além das alterações epigenéticas nos dois centros de *imprinting* da região 11p15.5, relacionadas a etiologia da SBW, também há descrições de alterações cromossômicas menos frequentes na mesma região, tais como translocações e duplicações, presentes em 2% dos casos; e, por fim, mutações no gene *CDKN1C*, em aproximadamente 10% dos casos esporádicos (Shuman *et al*, 2000).

O gene *CDKN1C*, de 1943 pares de base (pb) é normalmente expresso somente pelo alelo materno, codifica um inibidor de kinase dependente de ciclina, cuja atividade regula negativamente a proliferação do ciclo celular, durante a fase G1, com um papel não-proliferativo. A proteína CDKN1C apresenta três domínios funcionais: 1) o domínio inibidor de CDK, na porção N-terminal, envolvido na ubiquitinação de kinases dependentes de ciclina, marcando-as para degradação; 2) domínio PAPA, com repetições dos aminoácidos prolina e alanina, envolvido na fosforilação de proteínas kinase ativadas por mitógenos (MAP kinase, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*); e, 3) o domínio de ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *Proliferating cell nuclear antigen*), um cofator da DNA polimerase que coordena o recrutamento de fatores de replicação, sendo importante portanto no controle da replicação do DNA (Moldovan, G.L. *et al*, 2007; Milani *et al.*, 2014) (Figura 3).

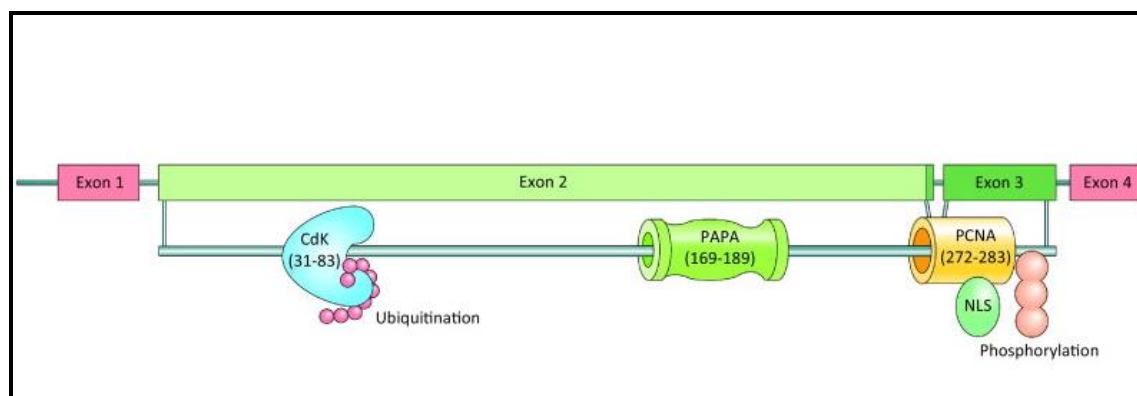


Figura 3) Figura esquemática do gene CDKN1C e da proteína correspondente. Éxons 2 e 3 codificam a proteína, representada abaixo dos éxons. Notar os três domínios da proteína: 1) inibidor de cinase dependente de ciclina (CdK); 2) repetição de prolina-alanina (domínio PAPA); 3) domínio de ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Intervalos numéricos indicam as regiões gênicas que codificam os domínios da proteína. (Adaptado de Eggermann *et al*, 2014).

Mutações de perda de função de CDKN1C promovem um aumento da proliferação celular, levando ao fenótipo macrossômico característico de pacientes com SBW, sendo herdadas maternalmente de forma dominante em aproximadamente 40% dos casos familiares e presentes de 5% a 10% dos casos de SBW esporádico (Hamajiima *et al*, 2013). Correlações entre genótipo e fenótipo têm demonstrado que cada tipo de alteração, seja genética ou epigenética, associa-se à uma heterogeneidade relacionada à SBW. Mutações em CDKN1C são frequentes no subgrupo de pacientes com defeitos na parede abdominal, como onfalocele, além de anomalias genitais, mas ausente em pacientes com tumor (Milani *et al*, 2014).

MATERIAIS E MÉTODOS:

1) Caracterização da pesquisa: Estudo descritivo e prospectivo a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com quadro clínico sugestivo da SBW acompanhados no Ambulatório de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do IFF/FIOCRUZ com a colaboração da Plataforma de Sequenciamento da FIOCRUZ.

2) Pacientes: Pacientes com suspeita da SBW, independentemente da idade ao diagnóstico foram incluídos na pesquisa. O grupo amostral compreende amostras de DNA de sangue de 21 pacientes.

3) Registro de informações clínicas: Nos casos de aceitação do participante e/ou de seus responsáveis legais, além dos dados contidos no prontuário, os pacientes foram fotografados pelo pesquisador responsável afim de registrar suas características clínicas.

4) Critérios de inclusão: Foram incluídos 21 pacientes cujo diagnóstico clínico indicou SBW ou características isoladas associadas à síndrome.

5) Considerações éticas: Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira – IFF/FIOCRUZ – RJ/MS, pelo parecer 1.846.324 (CAAE58515516.8.0000.5269) e segue os preceitos da resolução 466/12 referente a pesquisa com seres humanos. Os pacientes acompanhados pelo serviço citado participaram deste estudo somente mediante assinatura, por seus representantes legais, de termo de consentimento livre e esclarecido e de termo de uso de imagem. Nos casos em que o

diagnóstico molecular apresentou alterações de ganho de metilação em DMRH19 ou, de forma concomitante, ganho de metilação em DMRH19 e perda de metilação em KvDMR, essa informação foi repassada ao geneticista clínico responsável pelo manejo de pacientes com SBW nos ambulatórios do IFF.

Para todo resultado molecular foi realizado um relatório laboratorial e anexado ao prontuário médico de cada paciente inscrito na pesquisa. Nos casos necessários os progenitores foram igualmente investigados.

6) Extração de DNA proveniente de sangue periférico:

A extração salina de DNA seguiu as recomendações propostas por Miller (1988). Com a transferência de um volume de 5ml de sangue, contendo EDTA, para um Falcon de 50ml, foram adicionados 15ml de tampão de lise de hemácias (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA, pH 7,4), seguido de incubação no gelo por 30 minutos, para desnaturá-las. Após esse período o material foi centrifugado a 3000rpm por 30 minutos seguido da remoção do sobrenadante, adição de 10ml tampão de lise de hemácias e centrifugação a 3000rpm por 10 minutos. Após a última centrifugação e remoção do sobrenadante, o material foi incubado com 3mL de tampão de lise de núcleo (400mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA), 150µL de SDS 20% (GIBCO) e 15µL de proteinase K (20mg/ml) à 37°C por 18 horas.

Após essa etapa, foram acrescentados 1ml de NaCl 5M. O material foi centrifugado a 3000rpm por 30 minutos e após a remoção do sobrenadante, o mesmo foi transferido para um novo tubo e submetido a uma nova centrifugação a 3000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo Falconde 15 ml, seguindo da adição de 2 volumes de etanol 100% a -20°C e posterior homogeneização para a precipitação do DNA.

O DNA foi eluído em 300µL de TE 1X e armazenado a 4°C. Foram feitas alíquotas de DNA em tubos Eppendorf de 1,5 ml em concentrações de 100 ng/µL, armazenadas, para uso, a 4°C. A qualidade do DNA extraído foi averiguada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e sua concentração obtida via dosagem de 1µL em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Nos casos em que foram necessárias as análises das amostras de DNA dos pais de pacientes (casos de UPD paterna), esses foram contatados para a coleta do determinado material, para a extração de DNA segundo este protocolo.

7) *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA):*

Esta técnica, semi-quantitativa, detecta os índices de metilação através de reações com enzimas de restrição sensíveis à metilação. O *kit SALSA MS-MLPA probemix ME030-C3 BWS/RSS (MRC-Holland)* contém 26 sondas específicas para região 11p15, sendo 11 para a análise de DMRH19 e 15 para KvDMR. Dez das 26 sondas possuem sítios para a enzima de restrição, sensível a metilação, *HhaI*. Por fim, 13 são sondas controles referentes a genes fora da região 11p15.

Cada sonda consiste em dois oligonucleotídeos (*right probe oligo* e o *left probe oligo*) que se hibridizam às sequências homólogas no DNA e são posteriormente ligados entre si, formando um único fragmento para cada sonda. Nas extremidades das sondas encontram-se sequências de iniciadores universais que permitirão a amplificação dessa região na última etapa da reação. As sondas de MS-MLPA só se diferenciam das sondas de MLPA comuns por hibridizarem-se à sequências alvos que contém sítios de restrição para enzima *HhaI*, enzima de restrição sensível a metilação.

A reação ocorre em três etapas: a de hibridização, a de ligação e digestão enzimática e, por último, a amplificação por PCR. Para a realização dessas etapas, em termociclador, foram seguidas as recomendações do fabricante (MRC-Holland). A primeira etapa, a hibridização de

oligonucleotídeos com o DNA alvo, inicia-se com a desnaturação de 100ng de DNA em um volume de 5 μL a 98°C por 5 minutos, seguido por resfriamento a 25°C. Nesse momento foram adicionados 1,5 μL do tampão de MS-MLPA e 1,5 μL de *probe mix*, seguido de incubação a 95°C por 1 minuto e 60°C por 18 horas. Após este período, finalizando a hibridização, a 20°C, foram adicionados 3 μL do tampão de ligase A e 10 μL de água deionizada, resultando em um volume final de 19 μL por reação.

Foram feitas duas alíquotas de 8 μL de cada amostra, sendo uma para a reação de digestão e uma para controle ("tubo de amostra digerida" e "tubo de amostra não digerida"). Os tubos foram mantidos a 48°C e em seguida, no "tubo de amostra digerida", adicionou-se 7,75 μL de água deionizada, 1,5 μL do tampão ligase B, 0,25 μL de enzima ligase 65 e 0,5 μL da enzima *HhaI*. Enquanto no "tubo de amostra não digerida", foram adicionados 8,25 μL de água deionizada, 1,5 μL do tampão de ligase B e 0,25 μL de enzima ligase 65. As amostras permaneceram incubadas a 48°C por 30 minutos (ativação enzimática), seguidos de 5 minutos a 98°C (inativação enzimática) e resfriamento a 20°C, finalizando a etapa de ligação e digestão enzimática.

Por fim, foram incorporados em cada tubo 3,75 μL de água deionizada, 1,0 μL do *mix* do par de iniciadores e 0,25 μL de polimerase para a última etapa correspondente à amplificação das sondas hibridizadas ao DNA alvo por PCR, seguindo a seguinte ciclagem: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos pela fase de extensão final à 72°C por 20 minutos e, por fim, resfriamento a 4°C. Os produtos de PCR foram armazenados e protegidos da luz à -20°C até o momento da análise de fragmentos.

A reação de sequenciamento foi realizada com 0,2 μL de LIZ e 9 μL de formamida (Hi-Di Formamida, Applied Biosystems) para cada 0,7 μL do produto de PCR. Após a aplicação dos reagentes e desnaturação por 86°C por 3 minutos a placa foi rapidamente resfriada e colocada no sequenciador ABI3130XL (Applied Biosystems).

Foram feitas duplicatas experimentais de todas as amostras. A confiança e os valores normais das sondas desse *kit* foram determinados com controles de DNA, proveniente de amostras de sangue de indivíduos saudáveis, juntamente a cada experimento. O processamento dos dados de cada amostra foi feito via o uso do *software* Coffalyser.net, recomendado pelo próprio fabricante do kit de MS-MLPA, MRC-Holland (figura 4). Os índices de metilação foram calculados com base na média das quatro sondas com sítios para enzima de restrição Hha1 presentes nas regiões de interesse: IC1 e IC2. A normalização é feita com base em DNA controle de indivíduo saudável.

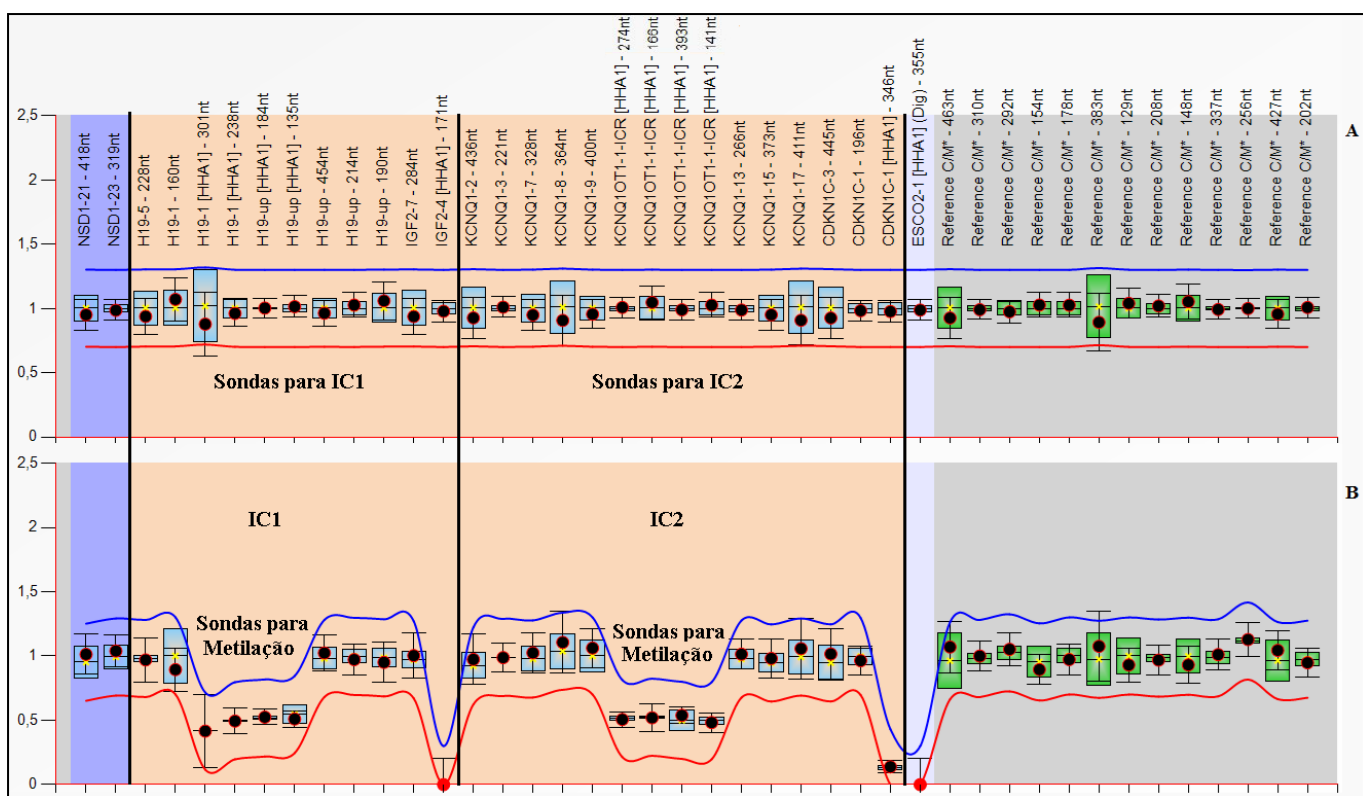


Figura 4) Gráfico referente a análise do número de cópias (A) e perfil de metilação (B) fornecido pelo software Coffalyser.net. Área em cor salmão compreende as 26 sondas (representadas por pontos pretos) de interesse para a região 11p15.5, incluindo as 10 sondas com sítios para enzima de restrição Hha1. Linha azul no gráfico A corresponde a variação máxima da normalidade para número de cópias; linha vermelha no gráfico A corresponde a variação mínima da normalidade para número de cópias. Linha azul no gráfico B corresponde ao limite máximo de metilação para a normalidade; linha vermelha no gráfico B corresponde ao limite mínimo de metilação para a normalidade. Notar as duas sondas em vermelho, no gráfico B, totalmente digeridas e que são utilizadas como controle interno para verificação da atividade enzimática de Hha1.

8) Genotipagem da região 11p15.5:

O padrão de hipermetilação do centro de *imprinting* 1 concomitante à hipometilação do centro de *imprinting* 2, caracterizando uma UPD paterna, foi investigado com o uso de marcadores de microssatélites específicos da região 11p15 (Tabela 1) (Figura 5).

Tabela 2: Marcadores de microssatélites da região 11p15.5

Microssatélite	Pares de iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado	Grau de heterozigosidade (%)	Referência
D11S2071	5'-AGGGCAATGAGGACATGAAC-3' (senso) 5'-ATGTGGCTGGTCCACCTG-3' (antissenso)	198 pb	86%	Browne <i>et al.</i> , 1995
D11S4088	5'-GGGCAGAGGCAGTGGAG-3' (senso) 5'-GCATGTTTCGGGGTG-3' (antissenso)	207 pb	73%	Algar <i>et al.</i> , 2011

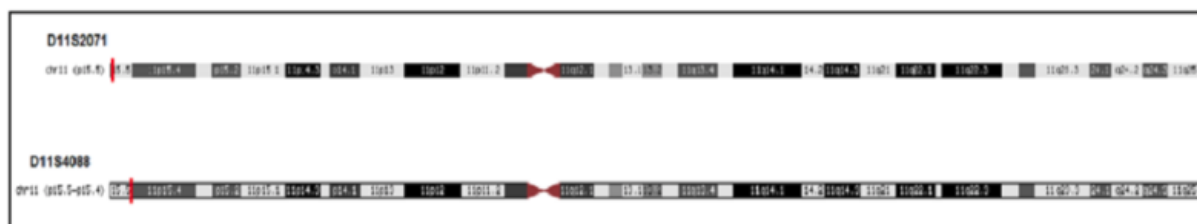


Figura 5) Idiograma do cromossomo 11. Localização dos microssatélites em 11p15.5 indicadas pela marcação vermelha na extremidade.

As reações de PCR foram feitas a partir de 200ng de DNA, 5pmol de cada iniciador, 1µM de cada dNTP (Life Technologies), 0,9mM MgCl₂, 10mM de Tris- HCl (pH 8.0), 25µM KCl, 1U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) para um volume final de 25µl. A ciclagem utilizada consistiu de: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, decrescendo 0,3°C por ciclo, e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos e resfriamento à 4°C. Os produtos de PCR foram armazenados e protegidos da luz à -20°C até o momento da genotipagem.

A confirmação da amplificação foi feita via corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, TAE 1x com brometo de etídeo como corante e de marcador de peso molecular de 1Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen).

Para a genotipagem de cada marcador microssatélite, adicionou-se a cada 1µL do produto de PCR, 0,3µL de GeneScan 500 LIZ (Life Technologies) 8,7µL de formamida (Hi-Di Formamida, Applied Biosystems) e seguiu-se a desnaturação da mistura por 95°C por 3 minutos, e posterior corrida eletroforética na plataforma ABI3130XL (Applied Biosystems). Os dados brutos foram gerados em arquivo *fsa*. e analisados no *software PeakScanner v 1.0* (Life Technologies).

9) Padronização do rastreamento mutacional do gene *CDKN1C*:

Para a padronização da técnica de PCR foram utilizados pares de iniciadores utilizados por Gaston *et al*(2000) e Hamajima (2013) (pares 1 a 6), com exceção dos pares 7 e 8, desenhados com auxílio do *software Clone Manager v9*, utilizando como sequência de referência a região do cromossomo 11, *NC_000011.10 GRCh38.p7* (tabela 2). A presença dos produtos de PCR foi confirmada via eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare ®) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento serão realizadas com o *kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing* (Life Technologies ®), conforme instruções do fabricante, utilizando os mesmos iniciadores da PCR, mas em reações separadas (senso e anti senso). O sequenciamento direto das amostras foi feito em sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Life Technologies ®) e as sequências de DNA das amostras e das sequências de referência foram alinhadas e comparadas, usando o *software ChromasPro* ® V. 1.41.

As reações de PCR para os iniciadores 1, 2, 3, 4 e 5 foram realizadas nas seguintes condições: 200ng de DNA, 0.2 mM de dNTP, 2.5 U de *Taq Platinum*® DNA polimerase (Invitrogen), 5% de DMSO, 10mM de Tris- HCl (pH 8.0), 25µM KCl, 1mM de MgCl₂, (iniciadores 1, 2 e 5) e 1.5mM de MgCl₂, (iniciadores 3 e 4), 1 µM de iniciador 1 e 0.5 µM de iniciador 2, 3, 4 e 5 para um volume final de 50 µL. A reação de PCR foi realizada nas seguintes ciclagens: 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos (iniciadores 2, 3 e 4); 65°C por 30 segundos (iniciadores 1 e 5) e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos e resfriamento à 4°C. Os produtos de PCR foram armazenados à -20°C até o momento do sequenciamento.

Tabela 3: Informações dos iniciadores utilizados para sequenciar o gene *CDKN1C*

Iniciadores	Éxon	Tamanho do amplicon
Primer 1 F: 5' CAGGAGCCTCTCGCTGAC 3'	1	233
Primer1 R: 5' CTTTAATGCCACGGGAGGAG 3'	1	233
Primer 2 F: 5' GGCGACGTAAACAAAGCTGA 3'	2	395
Primer 2 R: 5' GGGCTCTTTGGGCTCTAAAC 3'	2	395
Primer 3 F: 5' CGTTCCACAGGCCAAGTGCG 3'	1	394
Primer 3 R: 5' GCTGGTGCGCACTAGTACTG 3'	1	394
Primer 4 F: 5' CGTCCCTCCGCAGCACATCC 3'	1	279
Primer 4 R: 5' CCTGCACCGTCTGGCGGTAG 3'	1	279
Primer 5 F: 5' TGGACCGAAGTGGACAGCGA 3'	1	305
Primer 5 R: 5' GGGGCCAGGACCGCGACC 3'	1	305
Primer 6 F: 5' CGGAGCAGCTGCCTAGTGTC 3'	1	538
Primer 6 R: 5' CTTTAATGCCACGGGAGGAGG 3'	1	538
Primer 7 F: 5' GTGAGCCAAGTGAGTACAG 3'	3	478
Primer 7 R: 5' GATAAATACAGGTCCGCACC 3'	3	478
Primer 8 F: 5' ACTGGTCCCAAGGTGTAAAG 3'	3	754
Primer 8 R: 5' CTTTCTGTTCGGACCTGAAG 3'	3	754

RESULTADOS

Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA):

Foram analisadas por essa técnica amostras de DNA provenientes de sangue de 17 pacientes com SBW e 4 pacientes com características isoladas como macrossomia, hemhiperplasia ou hemihipertrofia, oriundas do Ambulatório de Genética Médica IFF/FIOCRUZ. A investigação epigenética das regiões IC1 (DMRH19) e IC2 (KvDMR) dos 21 pacientes, mostrou hipometilação isolada de KvDMR em 10/21 pacientes (47.6%) (figura5). Em uma amostra (4.7%) foi identificada hipermetilação de DMRH19 juntamente com hipometilação de KvDMR, sugerindo uma UPDp (figura 6). Em amostras de 03/21 pacientes (14.3%) relacionadas com parentesco (mãe-filha-neta) 10 sondas do kit correspondentes a região IC2 não foram amplificadas, indicando uma deleção da região complementar de um total de 2930 pb (figura 7). Amostras de 07/21 pacientes (33.4%) incluídos nesse estudo não apresentaram níveis alterados de metilação registrados pela técnica de MS-MLPA.

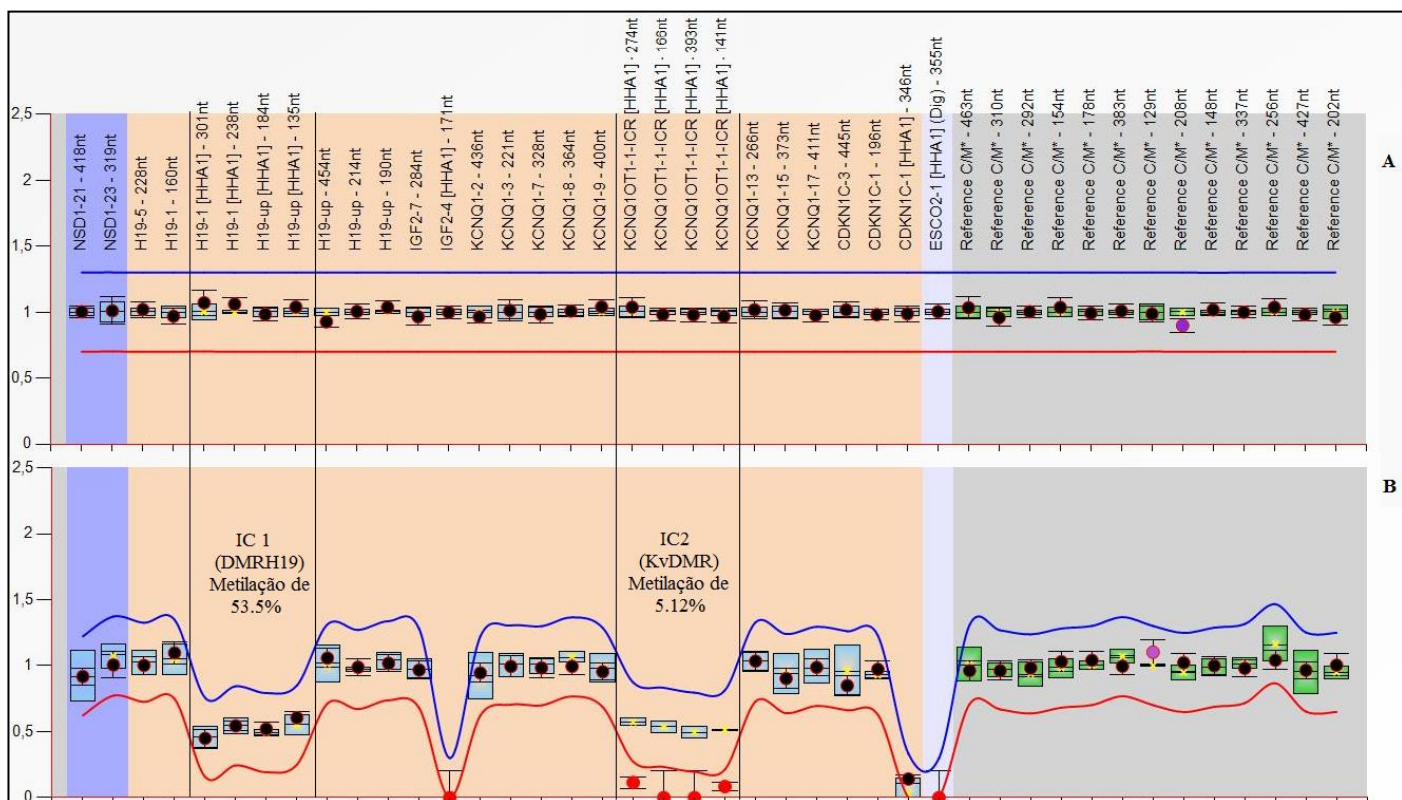


Figura 6) Gráfico referente à análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P14, um dos 10 pacientes com perda isolada de metilação em IC2. (A) indica número de cópias normal. (B) não indica alteração no centro de imprinting 1 (53.5%) e indica hipometilação isolada (5.12%) no centro de imprinting 2, representado graficamente pelas sondas em vermelho localizadas dentro do gene KCNQ1OT1. Sondas com sítio para enzima de restrição Hha1, nomeadas acima do gráfico.

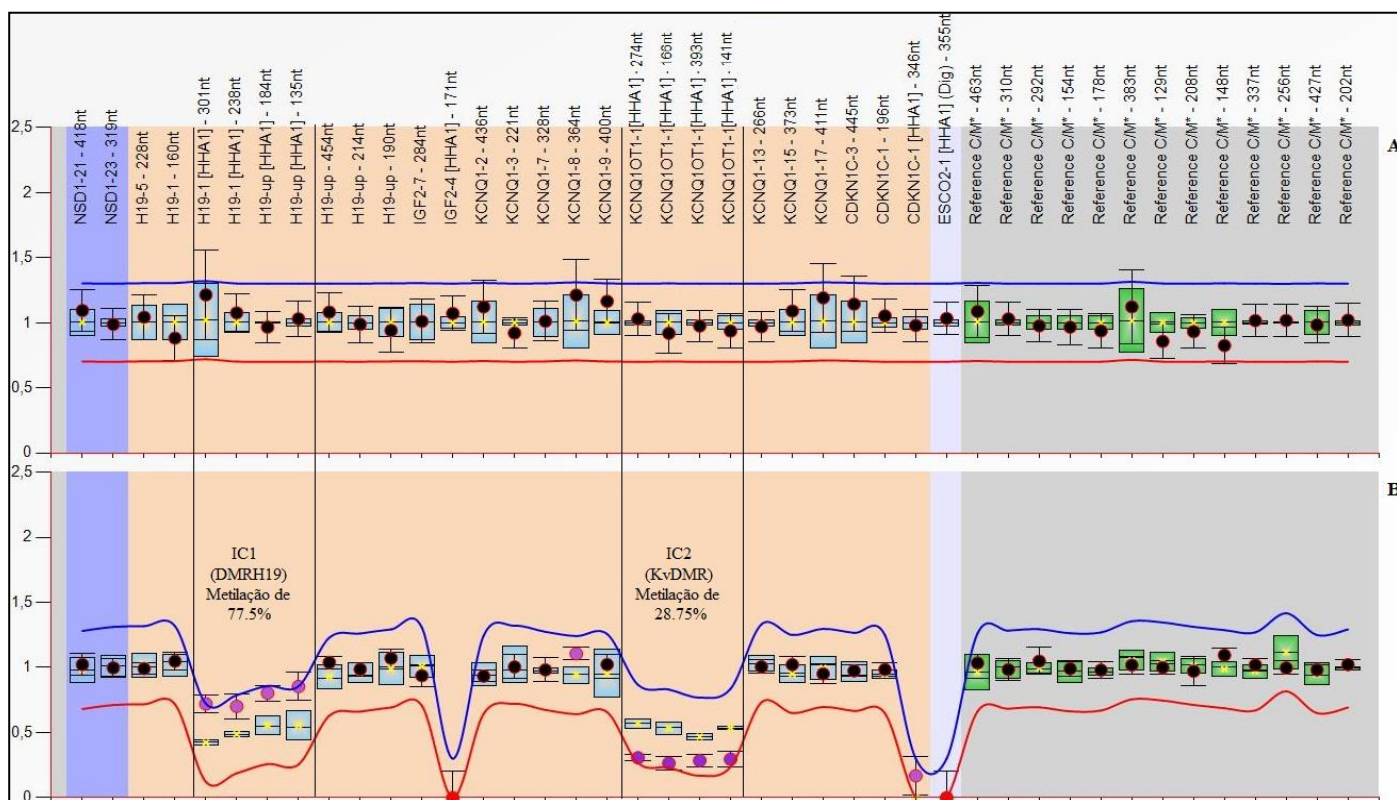


Figura 7) Gráfico referente a análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P2. Gráfico (A) indica número de cópias normal. (B) indica hipermetilação (círculos em roxo) em IC1 (77.5%) e hipometilação (círculo em roxo) em IC2 (28.75%). A cor roxa indica que tanto os índices de metilação de IC1 quanto os de IC2 não ultrapassaram as linhas que determinam os valores de normalidade.

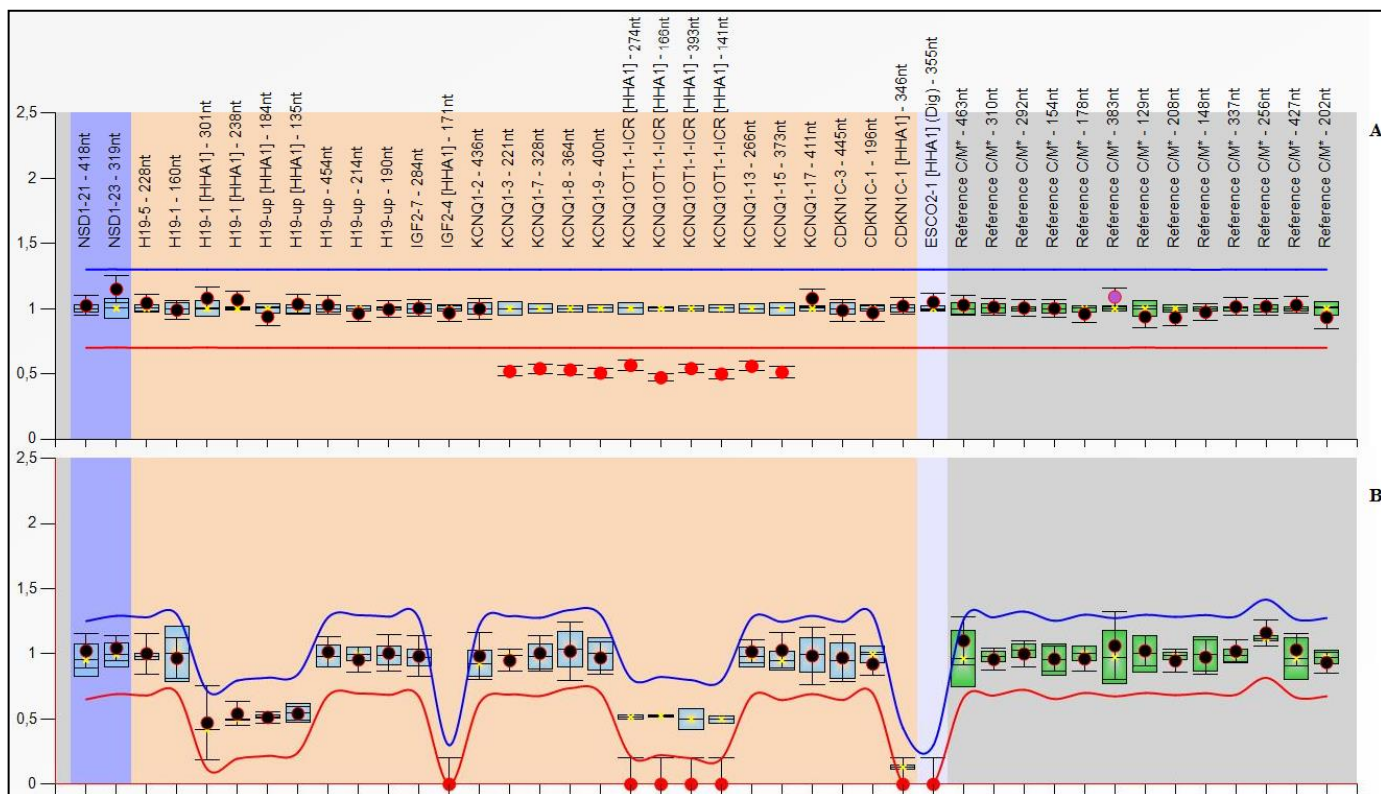


Figura 8) Gráfico referente a análise do número de cópias e perfil de metilação do paciente P12, um dos três pacientes com deleção em sondas que abrangiam o IC2. (A) indica número de cópias alterado, com deleção de 10 sondas (marcadas em vermelho). Gráfico B indica hipometilação no IC2.

A tabela 3, a seguir, apresenta os achados clínicos dos pacientes, assim como os índices de metilação identificados em IC1 e IC2. O intervalo de normalização para IC1 e IC2 encontra-se entre 30% e 70%.

Tabela 4: Achados clínicos e índices de metilação de IC1 e IC2:

Paciente	Diagnóstico clínico	Índice de metilação para IC1/ IC2 (% de metilação)	MsMLPA
P1	SBW	50.85% / 5.68%	Hipometilação de IC2
P2	SBW	77.5% / 28.75%	UPDp
P3	SBW	54.85% / 45.1%	Não alterado
P4	SBW	50.8% / 48.8%	Não alterado
P5	SBW	54% / 9.5%	Hipometilação em IC2
P6	SBW	52.6% / 13.5%	Hipometilação em IC2
P7	SBW	56.65% / 16.82%	Hipometilação em IC2
P8	SBW	52.4%; 4.52%	Hipometilação em IC2
P9	Hemihipertrofia isolada	53.3%; 42.8%	Não alterado
P10	SBW	53%; 0%	Deleção de 10 sondas na região de IC2
P11	SBW	50.6%; 0%	Deleção de 10 sondas na região de IC2
P12	SBW	48.5%; 0%	Deleção de 10 sondas na região de IC2
P13	SBW	54%; 3.1%	Hipometilação em IC2
P14	SBW	53.5%; 5,12%	Hipometilação em IC2
P15	Hemihiperplasia e onfalocele	44.5%; 43.75%	Não alterado
P16	SBW	47.5%; 10.75%	Hipometilação em IC2
P17	Hemihiperplasia isolada	54%; 53.25%	Não alterado
P18	SBW	53.8%; 4.62%	Hipometilação em IC2
P19	SBW	51.4%; 57%	Não alterado
P20	Macrossomia isolada	52.25%; 53.5%	Não alterado
P21	SBW	54.7%; 22%	Hipometilação em IC2

Legenda: P: pacientes; SBW: Síndrome de Beckwith-Wiedemann; IC1: centro de imprinting 1; IC2: centro de imprinting 2; UPDp: dissomia uniparental paterna.

Genotipagem dos casos de UPD paterna com o uso de microssatélites da região 11p15.5:

A UPD_p encontrada na amostra do Paciente 2 foi analisada com o uso de microssatélites da região 11p15.5 (D11S4088 de 207pb, e D11S2071 de 198pb) com o objetivo de identificar se o achado de UPD era secundário a erros isolados de *imprinting*, mantendo a presença de um alelo de herança paterna e outro, materna, ou resultantes de UPD de fato, devido a presença de dois alelos de mesma origem parental. A genotipagem da amostra do paciente 2 mostrou ser informativa para ambos marcadores de microssatélites utilizados (Figura 8), confirmando a presença de dois alelos distintos para cada um dos marcadores e, portanto, uma UPD secundária a erros de *imprinting*.

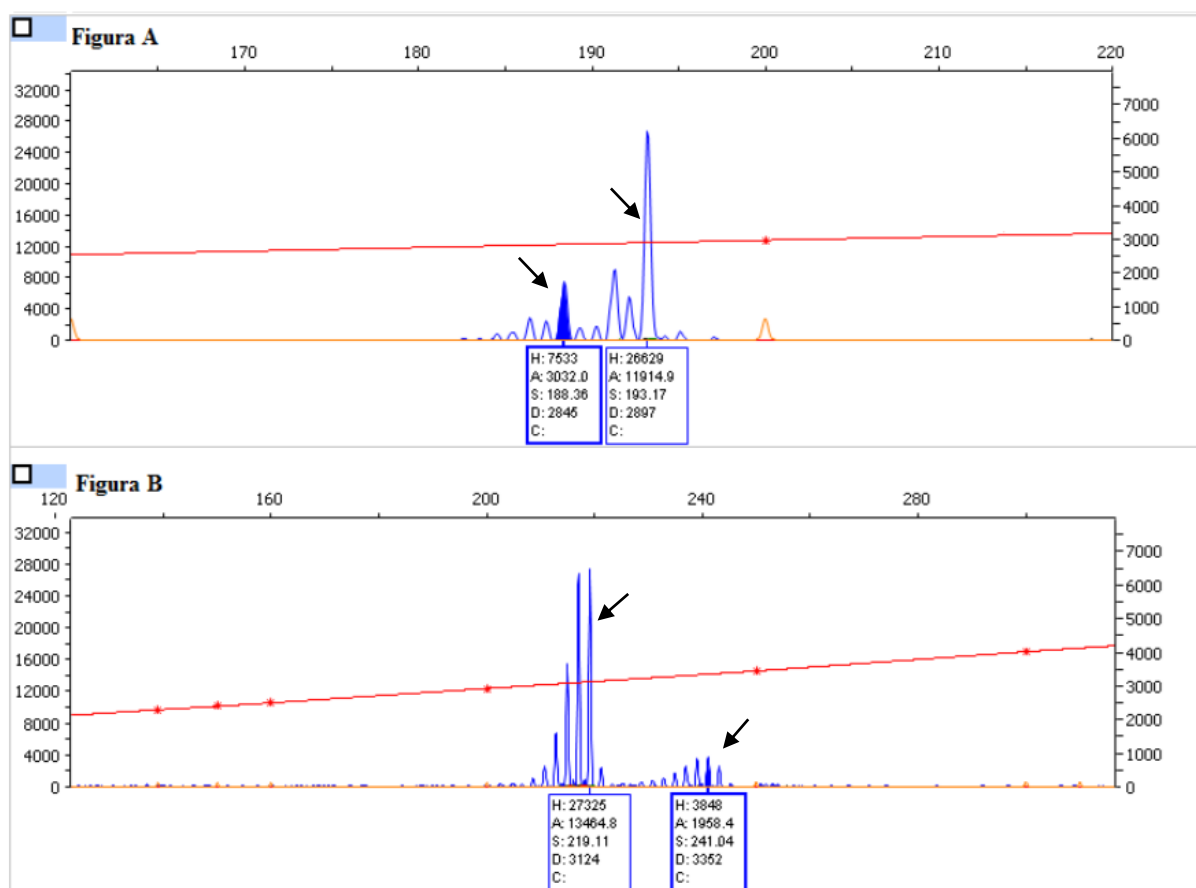


Figura 9) Eletroferograma da amostra do paciente P2. A) marcador de microssatélite D11S2071 em heterozigose (2 picos, indicados por setas pretas, referentes aos alelos de tamanhos diferentes, 188.36 e 193.17). B) marcador de microssatélite D11S4088 também em heterozigose (2 picos, indicados por setas pretas, referentes aos alelos de tamanhos diferentes, 219.11 e 241.04). Amostras dos pais do paciente não estavam disponíveis.

Rastreamento mutacional do gene *CDKN1C*

Os sete pacientes que não apresentaram alterações de dosagem alélica nem alterações nos índices de metilação de 11p15 foram reavaliados clinicamente. Desses, somente três (P3, P4 e P19) tiveram a confirmação da síndrome de Beckwith-Wiedemann. Uma vez que mutações no gene *CDKN1C* correspondem a 5 a 10% dos casos de SBW esporádicos, as amostras de DNA dos três pacientes citados foram submetidas à amplificação por PCR e sequenciamento do gene. As três amostras sequenciadas apresentaram genótipo selvagem para as regiões contempladas pelos iniciadores 1, 3, 4 e 5 (éxon 1) e 2 (éxon 2). Os pares de iniciadores de 6 (éxon 1), 7 e 8 (éxon 3) não tiveram suas reações devidamente padronizadas a ponto de garantir a amplificação adequada do fragmento esperado.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, amostras de DNA extraídas a partir de sangue de pacientes com SBW foram analisadas com foco na região cromossômica 11p15.5, um locus que reúne um conjunto de genes regulados por dois centros de *imprinting*. Ao todo, amostras de 21 pacientes com diagnóstico clínico prévio de SBW foram incluídos. A análise molecular desses pacientes teve como base de investigação diretrizes recomendadas para esta síndrome em função das alterações genéticas e epigenéticas mais frequentes descritas que sustentam sua etiologia. O primeiro passo trata-se da análise dos níveis de metilação dos centros de *imprinting* 1 e 2 da região cromossômica 11p15.5 (Mussa *et al*, 2015; Eggermann *et al*, 2016). A análise de metilação pela técnica de MS-MLPA tem representado uma abordagem eficaz e abrangente, possibilitando não apenas a identificação de alterações no padrão de metilação como variações no número de cópia, dois tipos de alterações frequentes nessa síndrome. Contudo, existem alternativas para o estudo de metilação como pirosequenciamento, COBRA e *Southern blotting*. (Priologo *et al*, 2008).

Pela técnica de MS-MLPA foram encontradas três tipos de alterações: (1) hipometilação no centro de *imprinting* 2 em 10/21 pacientes (47.6%); (2) deleção do centro de *imprinting* 2 em 03/21 pacientes (14.3%); e, (3) hipermetilação no centro de *imprinting* 1 juntamente com hipometilação de *imprinting* em um paciente. Amostras de 07/21 pacientes (33.4%) não apresentaram alteração no perfil de metilação. Esses sete pacientes foram clinicamente reavaliados e desses, quatro pacientes (P9, P15, P17 e P20) foram identificados com sinais clínicos associados a SBW, como macrossomia e hemihiperplasia. Por tanto, dos 21 pacientes incluídos no estudo, 17 tiveram diagnóstico concluído de SBW.

A perda de metilação no centro de *imprinting* 2 materno leva à expressão de *KCNQ1OT1*, normalmente expresso somente no alelo paterno, cujo transcrito silencia os genes localizados *in cis*, bloqueando a expressão do gene *CDKN1C* no alelo materno. A

ausência da expressão de *CDKN1C* é a alteração mais frequente encontrada em casos de SBW, estando presente em mais de 50% dos pacientes (Weksberg *et al*, 2005; Sparago *et al*, 2007). Nas amostras dos 17 pacientes com SBW investigadas neste estudo, 58.8% (10 de 17 pacientes) apresentaram esta alteração. Esse percentual encontra-se um pouco maior que o reportado na literatura possivelmente em função do pequeno número amostral desse estudo; no entanto, trabalhos como o de Baskin *et al*, 2014 reportaram que em um grupo de 167 pacientes com SBW, aproximadamente 62% apresentavam hipometilação no IC2.

A deleção em IC2 identificada nas amostras dos pacientes P10, P11 e P12, caracterizou-se pela ausência de hibridização e amplificação de 10 sondas do kit de MS-MLPA, totalizando 2930 pb. Dessas dez sondas, seis correspondem ao gene *KCNQ1* e quatro ao *KCNQ1OT1*, sendo estas últimas com sítios para a enzima Hha1, levando à conclusão de que pelo menos parte de IC2 foi deletado nessas amostras. Os pacientes P10, P11 e P12 são membros de uma mesma família e esses dados tornam-se ainda mais interessantes levando em consideração sua relação avó-mãe-filha.

De acordo com a dinâmica de quais genes são expressos em quais cromossomos, paternos ou maternos, bem como o fenótipo das pacientes, é possível que essa deleção tenha sido herdada maternalmente. Deleções como essas, apesar de pouco frequentes, são bem conhecidas. Baskin *et al* (2014), também utilizando MS-MLPA, reportou deleções na região de IC2 variando de 0.5 kb a tamanhos ainda maiores, de até 315 kb, em sua maioria herdadas maternalmente ou, quando *de novo*, acometendo cromossomos maternalmente herdados.

Por fim, o último tipo de alteração encontrada por MS-MLPA, observada somente em um paciente, (P2), foi a perda da metilação no centro de *imprinting 2* juntamente com o ganho de metilação no centro de *imprinting 1*. Assim como o centro de *imprinting 2*, o centro de *imprinting 1* regula a expressão de genes antagônicos, como o *IGF2*, paternalmente expresso,

que promove o crescimento, e o *H19*, maternalmente expresso, que regula negativamente o desenvolvimento. A metilação no centro de *imprinting 1*, localizado na região promotora de *H19*, impede a associação de fatores de transcrição com essa região e possibilita indiretamente que o gene *IGF2* possa ser expresso; pois, com a ausência de fatores de transcrição e da proteína CTCF, devido a metilação, a cromatina assume uma conformação favorável à expressão de *IGF2*, o que ocorre normalmente no alelo paterno (De Crescenzo *et al*, 2011). Desse modo, o ganho de metilação no centro de *imprinting 1* materno, encontrado em P2, leva a uma expressão bialélica de *IGF2* e a perda completa da expressão de *H19*. Além de afetar o antagonismo funcional desses genes, promovendo os distúrbios de crescimento característicos de SBW, o ganho de metilação no centro de *imprinting 1* está associado à um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores embrionários, sendo o mais frequente o tumor de Wilms (Cardoso *et al*, 2012; Bachmann *et al*, 2017). Pela revisão do prontuário, o paciente P2, atualmente com 7 anos de idade, ainda se encontra sob risco de desenvolvimento do TW.

Com intuito de melhor caracterizar a UDP encontrada por MS-MLPA na amostra do paciente P2, foi realizada a genotipagem com microssatélites para região 11p15.5 e a presença de dois alelos distintos para ambos marcadores utilizados sugere que a UPD seja oriunda de uma alteração epigenética, onde o cromossomo materno recebeu um padrão de metilação característico do cromossomo paterno, o que não caracteriza uma dissomia uniparental propriamente dita. Baskin *et al* (2014) reportaram 41 casos de UPD registradas por MS-MLPA e dessas, 37 foram confirmadas como UPDp, por análise de microssatélites, sendo as quatro restantes oriundas de erros de metilação.

As amostras dos pais do paciente P2 não estavam disponíveis, dificultando uma conclusão sobre a origem parental de cada alelo identificado pela genotipagem da região 11p15.5. Apesar de ser menos frequente, existe a possibilidade de ambos alelos encontrados

terem origem paterna, ainda que sejam alelos diferentes. Em decorrência de um hipotético evento pré-zigótico, no qual o gameta paterno carregasse os dois alelos encontrados, devido algum erro de não disjunção, fecundando um possível ovócito normal e, secundariamente, ocorrendo a perda do alelo materno (Tuna *et al*, 2009). Contudo, casos de UPDp em SBW tem sido descritos com presença de mosaïcismo, o que sugere que essas alterações ocorram em um evento pós-zigótico (Romanelli *et al*, 2011b). Uma explicação que sustenta a ocorrência de UPDp em mosaïcismo, para um cromossomo inteiro ou parte dele, é o fato de que a ausência de um ou mais genes maternalmente expressos por esse cromossomo pode levar o embrião a óbito (Cooper *et al*, 2007). Diante dessas informações o resultado encontrado pela genotipagem sustenta o fato de que no paciente P2, em algum momento do desenvolvimento, a região 11p15.5 materna perdeu seu padrão de metilação característico, recebendo o padrão de metilação paterno.

Os pacientes que não apresentaram alterações no perfil de metilação e que tiveram o diagnóstico clínico confirmado como SBW tiveram suas amostras de DNA submetidas à amplificação do gene *CDKN1C* para posterior sequenciamento. O gene *CDKN1C*, expresso de forma monoalélica, pelo alelo materno, em condições normais, possui um importante papel no crescimento como um todo, atuando de forma inibitória na progressão do ciclo celular em diversos tecidos (Hamajiima *et al*, 2013). Um total de 8 pares de iniciadores foram desenhados para a amplificação desse gene, rico em regiões repetitivas e com alto conteúdo de dinucleotídeos CpG. Dos pares de iniciadores que apresentaram padronização adequada, amplificando o produto esperado, nenhuma mutação foi encontrada. Desse modo, a etiologia molecular de SBW para os pacientes P3, P4 e P19 permanece desconhecida.

O sequenciamento de *CDKN1C* ao longo da história, desde Hatada *et al* (1996) até o momento presente, identificou aproximadamente 30 mutações nesse gene. Essas mutações são descritas como trocas de base pontuais acarretando perda de função, ocorrendo

principalmente no éxon 2, região codificadora do domínio cdk, responsável pela inibição de ciclinas, principal função da proteína CDKN1C, além de um menor número menor de mutações no éxon 3, região codificadora do domínio PCNA (Soejuna & Higashimoto, 2013).

Estudos como o de Baskin *et al* (2014) indica como a etiologia molecular de SBW pode ser ampla. Amostras de 434 pacientes não aparentados com SBW foram testadas para alterações epigenéticas e variações no número de cópias. Desse grupo investigado, amostras de 267 pacientes não apresentaram nenhum tipo de alterações procuradas.

CONCLUSÃO

Com o intuito de melhor compreender a complexa etiologia molecular na SBW novas séries de casos devam ser investigados, tendo em vista que, especialmente para os casos esporádicos, a causa ainda permanece desconhecida na maioria das vezes. Os casos de SBW com alterações no padrão de metilação investigados indicam que a hipometilação isolada de IC2, encontrada em 58.8% dos pacientes, não somente corrobora com os achados na literatura científica, mas também reforça o papel do gene CDKN1C no desenvolvimento dessa síndrome, considerando a ausência da expressão desse gene em pacientes com hipometilação em IC2. A hipermetilação em IC1 juntamente com a hipometilação em IC2 foi avaliada como uma alteração epigenética, considerando a presença de dois alelos distintos de 11p15.5. Por fim, a deleção encontrada nos casos familiares de SBW, pacientes P10, P11 e P12 deve ser confirmada por segunda técnica, com o intuito de reforçar tais resultados.

Os resultados encontrados neste estudo reforçam a complexidade molecular da SBW e foram incluídos nos laudos dos pacientes. Novas investigações acerca da etiologia da SBW devem continuar tendo em vista a falta de diagnóstico molecular de grande parte dos casos esporádicos. Este foi o primeiro estudo epigenético acerca dos casos de SBW acompanhados no Centro de Genética Médica do IFF e ressalta a importância da implementação de técnicas como o MS-MLPA, utilizadas para o diagnóstico molecular. O acompanhamento médico desses pacientes, assim como, a estratificação das diversas etiologias moleculares associadas à SBW tem um valor prognóstico especialmente referente a formação de tumores embrionários especialmente o TW. Por fim, o aconselhamento genético é essencial no planejamento familiar dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abi Habib W, Azzi S, Brioude F, Steunou V, Thibaud N, Das Neves C, Le Jule M, Chantot-Bastaraud S, Keren B, Lyonnet S, Michot C, Rossi M, Pasquier L, Gicquel C, Rossignol S, Le Bouc Y, Netchine I. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet.* 2014;23(21):5763-73.

Algar E, Dagar V, Sebah M, Pachter N. An 11p15 imprinting centre region 2 deletion in a family with Beckwith Wiedemann syndrome provides insights into imprinting control at CDKN1C. *PLoS One.* 2011;(12):e29034.

Bachmann N, Crazzolara R, Bohne F, Kotzot D, Maurer K, Enklaar T, Prawitt D, Bergmann C. Novel deletion in 11p15.5 imprinting center region 1 in a patient with Beckwith Wiedemann syndrome provides insight into distal enhancer regulation and tumorigenesis. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(3).

Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):a002592.

Baskin B, Choufani S, Chen YA, Shuman C, Parkinson N, Lemyre E, Micheil Innes A, Stavropoulos DJ, Ray PN, Weksberg R. High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith Wiedemann syndrome. *Hum Genet.* 2014 Mar;133(3):321-30

Bliek J, Snijder S, Maas SM, Polstra A, van der Lip K, Alders M, Knegt AC, Mannens MM. Phenotypic discordance upon paternal or maternal transmission of duplications of the 11p15 imprinted regions. *Eur J Med Genet.* 2009;52(6):404-8.

Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*. 1991;64(6):1123-34.

Browne DL, Smith EA, Dietz-Band J, Riethmann HC, Phromchotikul T, Litt M. Dinucleotide repeat polymorphism at the human chromosome 11p telomere (D11S2071). *Genomics*. 1995;25(2):600-1

Cardoso LC, Tenorio Castaño JA, Pereira HS, Lima MA, Dos Santos AC, de Faria PS, Ferman S, Seuánez HN, Nevado JB, de Almeida JC, Lapunzina P, Vargas FR. Constitutional and somatic methylation status of DMRH19 and KvDMR in Wilms tumor patients. *Genet Mol Biol*. 2012;35(4):714-24.

Cooper WN, Curley R, Macdonald F, Maher ER: Mitotic recombination and uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genomics* 2007; 89: 613–617.

De Crescenzo A, Coppola F, Falco P, Bernardo I, Ausanio G, Cerrato F, Falco L, Riccio A. A novel microdeletion in the IGF2/H19 imprinting centre region defines a recurrent mutation mechanism in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Med Genet*. 2011;54(4):e451-4.

Dome JS, Huff V. Wilms Tumor Overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CB, Stephans K, eds. *GeneReviews* [publicação na internet]. Seattle: University of Washington; 2013[acesso em 12 Jan 2015]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1294>.

Eggermann T, Begemann M, Binder G, Spengler S. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:19.

Eggermann T, Binder G, Brioude F, Maher ER, Lapunzina P, Cubellis MV, Bergadá I, Prawitt D, Begemann M. CDKN1C mutations: two sides of the same coin. *Trends Mol Med*. 2014;20(11):614-22.

Eggermann K, Bliet J, Brioude F, Algar E, Buiting K, Russo S, Tümer Z, Monk D, Moore G, Antoniadis T, Macdonald F, Netchine I, Lombardi P, Soellner L, Begemann M, Prawitt D, Maher ER, Mannens M, Riccio A, Weksberg R, Lapunzina P, Grønsvold K, Mackay DJ, Eggermann T. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of chromosome 11p15 imprinting disorders: Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(10):1377-87.

Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Vazquez MP, Gicquel C. Assessment of p57(KIP2) gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Horm Res.* 2000;54(1):1-5.

Girardot M, Feil R, Llères D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics.* 2013;5(6):715-28.

Grossniklaus U, Kelly WG, Kelly B, Ferguson-Smith AC, Pembrey M, Lindquist S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nat Rev Genet.* 2013;14(3):228-35

Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, Nakanishi M, Saitoh S. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One.* 2013 30;8(9):e75137.

Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y, Kaneko Y, Inoue M, Komoto Y, Okada A, Ohishi S, Nabetani A, Morisaki H, Nakayama M, Niikawa N, Mukai T. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1996;14(2):171-3

Ibrahim A, Kirby G, Hardy C, Dias RP, Tee L, Lim D, Berg J, MacDonald F, Nightingale P, Maher ER. Methylation analysis and diagnostics of Beckwith-Wiedemann syndrome in 1,000 subjects. *Clin Epigenetics.* 2014;6(1):11.

Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):826-40.

Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20(1):85-93.

Kelsey G, Feil R. New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013 5;368(1609):20110336.

Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(10):a003236.

Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 2;93(7):3026-30.

Milani D, Pezzani L, Tabano S, Miozzo M. Beckwith-Wiedemann and IMAGE syndromes: two very different diseases caused by mutations on the same gene. *Appl Clin Genet*. 2014 Sep 16;7:169-75. doi: 10.2147/TACG.S35474. Review. PubMed PMID: 25258553; PubMed Central PMCID: PMC4173641.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007 18;129(4):665-79.

Mussa A, Di Candia S, Russo S, Catania S, De Pellegrin M, Di Luzio L, Ferrari M, Tortora C, Meazzini MC, Brusati R, Milani D, Zampino G, Montirosso R, Riccio A, Selicorni A, Cocchi G, Ferrero GB. Recommendations of the Scientific Committee of the Italian Beckwith-Wiedemann Syndrome Association on the diagnosis, management and follow-up of the syndrome. *Eur J Med Genet*. 2016;59(1):52-64.

Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM [homepage na internet], [acesso em 15 jan 2015]. Disponível em: <http://www.omim.org/entry/130650> e <http://www.omim.org/entry/180860>.

- Öunap K. Silver-Russell Syndrome and Beckwith-Wiedemann Syndrome: Opposite Phenotypes with Heterogeneous Molecular Etiology. *Mol Syndromol*. 2016;7(3):110-21.
- Patten MM, Ross L, Curley JP, Queller DC, Bonduriansky R, Wolf JB. The evolution of genomic imprinting: theories, predictions and empirical tests. *Heredity (Edinb)*. 2014;113(2):119-28
- Pires ND, Grossniklaus U. Different yet similar: evolution of imprinting in flowering plants and mammals. *F1000Prime Rep*. 2014; 1;6:63.
- Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):299-310.
- Pfeifer K. Mechanisms of genomic imprinting. *Am J Hum Genet*. 2000;67(4):777-87.
- Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem*.2006;52(7):1276-83.
- Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Laganà C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(5):565-71.
- Romanelli V, Nevado J, Fraga M, Trujillo AM, Mori MÁ, Fernández L, Pérez de Nanclares G, Martínez-Glez V, Pita G, Meneses H, Gracia R, García-Miñaur S, García de Miguel P, Lecumberri B, Rodríguez JI, González Neira A, Monk D, Lapunzina P. Constitutional mosaic genome-wide uniparental disomy due to diploidisation: an unusual cancer-predisposing mechanism. *J Med Genet*. 2011a ;48(3):212-6.
- Romanelli V, Meneses HN, Fernández L, Martínez-Glez V, Gracia-Bouthelie R, F Fraga M, Guillén E, Nevado J, Gean E, Martorell L, Marfil VE, García-Miñaur S,Lapunzina P. Beckwith-Wiedemann syndrome and uniparental disomy 11p: fine mapping of the

recombination breakpoints and evaluation of several techniques. *Eur J Hum Genet.* 2011b;19(4):416-21.

Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Masaki Z, Uozumi J, Kaneko Y, Mukai T, Soejima H. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer.* 2006;95(4):541-7.

Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, Huxter N, Barker K, Hanks S, et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumour. *Nat Genet* 2008;40:1329-34.

Scott RH, Murray A, Baskcomb L, Turnbull C, Loveday C, Al-Saadi R, et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* 2012;3:327-35.

Schönherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann HA, Eggermann T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2007;44(1):59-63.

Shuman C, Beckwith JB, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann Syndrome. 2000 Mar 3 [updated 2016 Aug 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1394/> PubMed PMID: 20301568.

Smith AC, Choufani S, Ferreira JC, Weksberg R. Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res* 2007;61:43-7.

Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet.* 2013;58(7):402-9.

Sparago A, Russo S, Cerrato F, Ferraiuolo S, Castorina P, Selicorni A, Schwienbacher C, Negrini M, Ferrero GB, Silengo MC, Anichini C, Larizza L, Riccio A. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet.* 2007 1;16(3).

Tuna M, Knuutila S, Mills GB. Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):120-8.

Udayakumaran S, Onyia CU. Beckwith-Wiedemann syndrome and Chiari I malformation--a case based review of central nervous system involvement in hemihypertrophy syndromes. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(5):637-41.

Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet*2005;137C:12-23.

Zimmerman DL, Boddy CS, Schoenherr CS. Oct4/Sox2 binding sites contribute to maintaining hypomethylation of the maternal igf2/h19 imprinting control region. *PLoS One.* 2013; 6;8(12):e81962.

ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação epigenética de 11p15 e DMR6p21.32 e sua correlação com o gene OCT4 em pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedemann

Pesquisador: Juan Clinton Llerena Junior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 58515516.8.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.959.026

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda à este Estudo, já analisado e aprovado por este CEP, no qual o autor faz um estudo observacional das alterações epigenéticas de 11p15.5 e DMR 6p21.32 e alterações genéticas do gene OCT4 em pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedemann e casos de hemihipertrofia isolada.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar alterações epigenéticas no locus WT2 e na região DMR6p21.32, assim como averiguar a relação de alterações em OCT4 com as DMRH19 e DMR6p21.32 em pacientes com SBW.

Objetivo Secundário:

1) Investigar possíveis alterações epigenéticas no locus WT2 (DMRH19 e KvDMR) a partir da técnica de MS-MLPA e na DMR6p21.32, com o uso da técnica de pirosequenciamento;

2) Nos casos em que for registrada UPD paterna em 11p15.5, averiguar se esta alteração é epigenética ou estrutural (ou seja, oriunda da presença de dois alelos paternos) a partir da genotipagem dessas famílias com o uso de marcadores de microssatélites de

11p15.5;

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.959.026

3) Rastrear mutações no gene OCT4, via sequenciamento direto, e investigar, com o uso de microssatélites de 6p21.33 (OCT4), possíveis perdas de heterozigosidade (LOH).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados e aprovados pelo CEP/IFF.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Apresentação ao CEP da assistente de pesquisa clínica Dra. Residente Luiza Lorena Pires Ramos e seu projeto de Trabalho de Conclusão de Curso. Está integrada junto ao projeto de pesquisa de pós-graduação do aluno Leonardo Lima de Faria com seu projeto já aprovado CAAE: 58515516.8.0000.5269. Tanto o projeto como carta do supervisor estão inclusos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Aprovado.

Recomendações:

- OBSERVAR AS RECOMENDAÇÕES DA RESOLUÇÃO 466/12.
- COMUNICAR AO CEPIFF O INICIO E ENCERRAMENTO DO PROJETO EM NOTIFICAÇÃO
- É OBRIGATÓRIO APRESENTAR OS RELATÓRIOS SEMESTRAIS E FINAIS ATRAVÉS DA NOTIFICAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_867836 E2.pdf	15/02/2017 15:02:41		Aceito
Declaração de Pesquisadores	2017_Carta_de_Apresentacao_ao_CEP_Luiza_Lorena.doc	15/02/2017 14:59:37	Juan Clinton Llerena Junior	Aceito
Outros	Projeto_TCC_Beckwith.docx	15/02/2017 14:37:25	Juan Clinton Llerena Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Autorizacaoparausodeimagem.docx	30/11/2016 13:41:37	Leonardo Lima de Faria	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.959.026

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Autorizacaousodeimagem2.docx	13/10/2016 13:25:07	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Orçamento	Orcamentoprojeto.docx	16/09/2016 14:12:04	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado2.doc	16/09/2016 14:05:23	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Brochura Pesquisa	brochuradepesquisa2.doc	16/09/2016 14:04:58	Leonardo Lima de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEResponsaveis.doc	16/09/2016 14:04:39	Leonardo Lima de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpaisbiologicos.doc	16/09/2016 14:04:17	Leonardo Lima de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLConsoles.doc	16/09/2016 14:02:49	Leonardo Lima de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEcriancas.doc	16/09/2016 14:01:51	Leonardo Lima de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEadolescentes.doc	16/09/2016 14:01:40	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaViceDiretoriaPesquisa.jpg	09/08/2016 10:12:09	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartaInfraestrutura.jpg	09/08/2016 10:11:52	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	18/07/2016 14:25:38	Leonardo Lima de Faria	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	05/07/2016 15:16:16	Leonardo Lima de Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: oepiff@iff.fiocruz.br