



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**HANNA SOARES PEREIRA**

**Avaliação quantitativa do padrão de metilação das regiões DMRH19 e KVDMR em  
pacientes com possíveis alterações epigenéticas em 11p15.5**

**Orientador:** Prof. Dr. Hector Nicolas Seuànez Abreu

**Co-orientador:** Prof. Dr. Fernando Regla Vargas

**RIO DE JANEIRO**

**2013**



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

HANNA SOARES PEREIRA

**Avaliação quantitativa do padrão de metilação das regiões DMRH19 e KVDMR em pacientes com possíveis alterações epigenéticas em 11p15.5**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Hector Nicolas Seuànez Abreu

**Co-orientador:** Prof. Dr. Fernando Regla Vargas

**RIO DE JANEIRO**

**2013**

Pereira, Hanna Soares

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO PADRÃO DE METILAÇÃO DAS REGIÕES DMRH19 E KVDMMR EM PACIENTES COM POSSÍVEIS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM 11P15

Rio de Janeiro, 2013.

xv + 49 p.

Orientador: Dr. Hector Nicolas Seuánez Abreu

Co-orientador: Drº. Fernando Regla Vargas

Dissertação (Mestrado) - INCA/ Programa de Genética/ Pós-Graduação em Oncologia, 2013.

Referências Bibliográficas:

1. Tumor de Wilms
2. Metilação
3. Epigenética
4. Macrossomias
5. Síndrome de Beckwith-Widemann
6. Hemihiperplasia
7. MS-MLPA
8. Pirosequenciamento

I. Pereira, Hanna Soares

II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Pós-graduação em Oncologia, Programa de genética.

III. Mestrado



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

HANNA SOARES PEREIRA

**Avaliação quantitativa do padrão de metilação das regiões DMRH19 e KVDMR  
em pacientes com possíveis alterações epigenéticas em 11p15.5**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Hector Nicolas Seuànez Abreu**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Regla Vargas**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto - Presidente**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ester Silveira Ramos**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Tatiana de Almeida Simão – Suplente I**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira – Suplente II**

**RIO DE JANEIRO**

**2013**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por terem fundamentado a pessoa que sou e por nunca me deixarem faltar muito amor e exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Héctor N. Seuànez, pela orientação que me trouxe grandes ensinamentos, paciência e perseverança, pela amizade e por, agora, eu saber muito mais sobre uísque. Por todas as discussões filosóficas, pelos livros e filmes indicados, e pela excelente oportunidade de estar no laboratório de genética, onde pude desenvolver meu trabalho.

Ao Dr. Fernando Regla Vargas, pela co-orientação e por sempre apoiar e dar suporte ao meu trabalho.

À minha mãe, que é a mulher mais forte que conheço e que me amou, inspirou, apoiou e empurrou rumo ao meu aprendizado, e por todo carinho e esforço de ter criado seus dois filhos com o maior zelo e caráter. Eu te amo mais que tudo na minha vida. Obrigada por ter acreditado em mim!

À amiga Leila Cardoso, que me ajudou em todos os aspectos da minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelos momentos de análise e por fazer parte do meu crescimento.

Ao Dr. Miguel Ângelo por compartilhar comigo seu conhecimento tirando as minhas dúvidas e pelo apoio incondicional em diversas questões na minha jornada até aqui.

Às minhas amigas lindas, as mestrandas Marion e Priscila que tive a sorte de surgirem em minha vida e estarem aqui nesse mundo comigo. Obrigada por todos os nossos momentos. Eu amo vocês, meus presentinhos! Conseguimos afinal!!!

À minha irmãzinha, Gabrielle (macaca), por tudo! Simplesmente tudo! Eu amo você!

À amiga Adriana Reis, que traz doçura e força para meus dias!

À amiga Raissinha, pelo carinho, auxílio na leitura final e massagens para tirar os nós de tensão das costas.

À amiga Tatiana Carvalho, por sua irreverência nata que não deixa nenhuma peteca cair. Obrigada pelo carinho, pela chatice na medida certa, e por ter me ensinado o que é ser aluna do Hector desde o início do meu mestrado. Te amo, tsá tsá!

À amiga Rafaela que abriu seu coração e seu lar pra nossa grande amizade!

Ao meu amigo lindo, Rodrigo Agrellos (Drigo), pelo “bolsa família”, “auxílio moradia”, amor, carinho e todas as noites de conversa que me salvam sempre! Eu amo você bi!

Ao meu pai e ao meu irmão Hans, por sempre terem torcido pela minha vitória.

À Marcela, que mesmo tendo aparecido no finalzinho dessa dissertação, fez uma diferença muito grande na concepção final dela e nos meus dias até aqui. Obrigada pela revisão, pelo carinho e pela comida divina que você faz!

Ao meu caro amigo Albert, que é o salvador dos hardwares e softwares! Obrigada por todas as partidas de kinect e cerveja artesanal que relaxaram esses dois anos.

Aos meus amigos de laboratório Rejane, Paulinha, Maria Carolina, Régis, Sabrina, Lívia, e tantos outros, que fizeram os meus dias de trabalho mais leves, cheios de muitas risadas e café.

Aos meus primos Cacá e Joyce, que nunca me negaram abrigo e sempre me incentivaram, escutaram e ajudaram muito nessa caminhada.

Ao universo, por ter conspirado a meu favor e ter me presenteado com cada uma dessas pessoas que sempre me apoiam para que eu nunca desista dos meus sonhos.

EPÍGRAFE

*Nada que não seja natural será satisfatório.*

**Hanna Soares**

## SUMÁRIO

<b><u>FICHA CATALOGRÁFICA .....</u></b>	<b><u>III</u></b>
<b><u>DEDICATÓRIA .....</u></b>	<b><u>V</u></b>
<b><u>AGRADECIMENTOS .....</u></b>	<b><u>VI</u></b>
<b><u>EPÍGRAFE .....</u></b>	<b><u>VII</u></b>
<b><u>SUMÁRIO .....</u></b>	<b><u>VIII</u></b>
<b><u>LISTA DE FIGURAS .....</u></b>	<b><u>X</u></b>
<b><u>LISTA DE TABELAS .....</u></b>	<b><u>XII</u></b>
<b><u>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</u></b>	<b><u>XIII</u></b>
<b><u>RESUMO .....</u></b>	<b><u>XIV</u></b>
<b><u>ABSTRACT .....</u></b>	<b><u>XV</u></b>
<b><u>1. INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1 EPIGENÉTICA .....	1
1.2. IMPRINTING GENÔMICO: .....	5
1.3. HEMIHIPERTROFIA, MACROSSOMIAS, SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN (SBW) E SUA RELAÇÃO COM O TUMOR DE WILMS (TW) .....	6
1.4 INVESTIGAÇÕES EPIGENÉTICAS EM 11P15.5 .....	9
<b><u>2. OBJETIVOS: .....</u></b>	<b><u>13</u></b>
2.1. OBJETIVO GERAL: .....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	13
2.1.1. DETECTAR ALTERAÇÕES DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA REGIÃO 11P15.5 COM O USO DE MS-MLPA. ....	13

2.1.2. VALIDAR OS ACHADOS EPIGENÉTICOS DO MS-MLPA COM O PIROSEQUENCIAMENTO E ESTIMAR QUANTITATIVAMENTE OS PADRÕES DIFERENCIADOS DE METILAÇÃO, ENCONTRADOS EM DMRH19 E KvDMR.....	13
<b><u>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</u></b>	<b>14</b>
3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES: .....	14
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES:.....	17
3.3. AMOSTRAS CONTROLE:.....	17
3.4. DESENHO EXPERIMENTAL: .....	17
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:.....	18
3.6. MODIFICAÇÃO DO DNA POR BISSULFITO DE SÓDIO: .....	18
3.7. MS-MLPA (METHYLATION-SPECIFIC MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION): .....	19
3.8. PIROSEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES <i>DMRH19</i> E <i>KvDMR</i> :.....	20
<b><u>4. RESULTADOS.....</u></b>	<b>22</b>
<b><u>5. DISCUSSÃO.....</u></b>	<b>32</b>
<b><u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>41</b>
<b><u>ANEXO I.....</u></b>	<b>46</b>
<b><u>ANEXO II.....</u></b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração de algumas das modificações de histonas mais comuns em seus resíduos de aminoácidos específicos. <b>ph:</b> fosforilação; <b>me:</b> metilação; <b>ac:</b> acetilação; <b>R:</b> arginina <b>S:</b> serina; <b>K:</b> lisina (BHAUMIK et al, 2007). .....	2
<b>Figura 2:</b> Biogênese do miRNA. Adaptado de IORIO & CROCE, 2012b. ....	3
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de metilação e seus efeitos na cromatina. Adaptado de LUONG, 2009. ....	4
<b>Figura 4:</b> Fases do Ciclo do Imprintig. ....	5
<b>Figura 5:</b> Figura ilustrando a região 11p15.5. Domínio Centromérico (Centromeric Domain) ou Domínio 2 e Domínio Telomérico (Telomeric Domain) ou Domínio 1. Em roxo: proteína CTCF. Adaptado de (WEKSBERG et al., 2005) .....	7
<b>Figura 6:</b> Ilustração da técnica de MS-MLPA (MRC-Holland®). A parte superior da figura mostra dois tipos de sequências de DNA, uma contendo um sítio metilado (M) nas duas fitas, e a mesma região no outro alelo em que esse sítio não se encontra metilado. 1. Após desnaturação as sondas hibridizam em ambas regiões alélicas (a metilada e a não metilada). 2. As sondas são ligadas pela ligase e digeridas por uma endonuclease sensível a metilação que corta o DNA na região não metilada. 3. Amplificações por PCR com primers que anelam nas extremidades das sondas (X e Y). 4. São gerados fragmentos de diversos tamanhos contendo regiões que originalmente se encontravam metiladas. As diferenças de tamanho dos fragmentos amplificados devem-se às diferenças de tamanho das stuffer sequence derivadas do vetor M13 (em verde). ....	10
<b>Figura 7:</b> Reações químicas produzidas pelo bissulfito de sódio. Adaptado de (HAYATSU, 2008) .....	11
<b>Figura 8:</b> Ilustração do princípio da técnica de Pirosequenciamento. Adaptado de (ENGLAND; PETERSSON, 2005). ....	12
<b>Figura 9:</b> Desenho experimental do estudo. ....	17
<b>Figura 10:</b> (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH4 mostrando metilação normal de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 56%) e KvDMR ( <b>MMR</b> = 44%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH4, que mostra metilação normal de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 48%). (3) Pirograma do paciente LH4, que mostra metilação normal de KvDMR ( <b>MMR</b> = 51%). ....	27
<b>Figura 11:</b> Gráfico de MS-MLPA do paciente LH8 mostra metilação normal de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 62%) e hipometilação de KvDMR ( <b>MMR</b> = 7%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH8, que mostra metilação normal de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 48%). (3) Pirograma do paciente LH8, que mostra hipometilação de KvDMR ( <b>MMR</b> = 11%). ....	28
<b>Figura 12:</b> Gráfico de MS-MLPA do paciente LH2 mostrando metilação normal de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 45%) e hipometilação de KvDMR ( <b>MMR</b> = 14%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH2, mostrando hipermetilação de DMRH19 ( <b>MMR</b> = 81%). (3) Pirograma do paciente LH2, mostrando hipometilação de KvDMR ( <b>MMR</b> = 32%). ....	29
<b>Figura 13:</b> (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH9 apresentando hipometilação DMRH19 ( <b>MMR</b> = 25%) e metilação normal de KvDMR ( <b>MMR</b> = 49%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e	

as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH9, mostrando hipometilação de DMRH19 (**MMR** = 26%). (3) Pirograma do paciente LH9, mostrando metilação normal de KvDMR (**MMR** = 46%). ..... 30

**Figura 14:** (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH12 apresentando hipermetilação de DMRH19 (**MMR** = 79%) e metilação normal de KvDMR (**MMR** = 48%). As colunas verdes indicam porcentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH12, mostrando hipermetilação de DMRH19 (**MMR** = 78%). (3) Pirograma do paciente LH12, mostrando metilação normal de KvDMR (**MMR** = 47%). ..... 31

**Figura 15:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental proximal paterna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]). ..... 34

**Figura 16:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental distal materna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]). ..... 36

**Figura 17:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental distal paterna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]). ..... 38

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação dos pacientes contendo diagnóstico e informações de cada um, a instituição de origem, sexo e a idade. PN = Peso ao Nascimento; CN = Comprimento ao Nascimento; PCN = Perímetro Cefálico ao Nascimento. ( $> p95$ ) = Representa que o peso ou a estatura do paciente se encontra 95% acima do considerado normal para sua idade. .... 14
- Tabela 2:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR obtidos pelo MS-MLPA. Média de Metilação por Região (**MMR**) para cada paciente.  $\bar{X}_1$  = média de metilação por região, por paciente.  $\bar{X}_2$  = média de metilação por sonda. s.d.\* = desvio padrão da média de metilação de cada sonda. Os números circulados foram retirados do cálculo da média de metilação. O número destacado em vermelho representa uma discrepância entre técnicas (ver tabela 3). .... 22
- Tabela 3:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR, obtidos pelo pirosequenciamento. Metilação por sítio e média de metilação por região (**MMR**) do total de pacientes.  $\bar{X}_{1 e 2}$  = média de metilação por região e por sítio. O número destacado em vermelho representa uma discrepância entre as duas técnicas (ver tabela 2). s.d.\* = desvio padrão de cada sítio CpG. .... 24
- Tabela 4:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR, obtidos pelo pirosequenciamento. Metilação por sítio e média de metilação por região nos controles (**MMC**).  $\bar{X}$  = média de metilação por região e por sítio. s.d.\* = desvio padrão da média de cada sítio CpG. .... 25

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
pm	Picomol
CRI	Centro Regulador de <i>Imprinting</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1C</i>
COBRA	<i>Combined bisulphite restriction analysis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMR	<i>Differentially Methylated Region</i>
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
HHI	Hemihipertrofia Isolada
<i>IGF2</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IFF	Instituto Fernandes Figueira
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>KCNQ1</i>	<i>potassium voltage-gated channel</i>
KCNQ1OT1	<i>KCNQ1 overlapping transcript 1</i>
M	Molar
MS-MLPA	<i>Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pb	pares de base
<i>RFLP</i>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por Minuto
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SSR	Síndrome de Silver-Russel
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TW	Tumor de Wilms
V	Volts

## RESUMO

### **Avaliação quantitativa do padrão de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR em pacientes com possíveis alterações epigenéticas em 11p15.5**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Hanna Soares Pereira**

Hemihipertrofia, Macrossomias e a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (macrossomia associada à visceromegalia e hiperinsulinismo), são anormalidades associadas a alterações epigenéticas na região cromossômica 11p15.5 e com predisposição ao desenvolvimento de tumores embrionários, principalmente o Tumor de Wilms (TW). O domínio telomérico de 11p15.5 contém genes controlados por imprinting: *IGF2*, paternalmente expresso e que codifica um fator de crescimento fetal, e *H19*, maternalmente expresso, e que transcreve um RNA não codificante. A expressão de *IGF2* e *H19* é regulada pela região diferencialmente metilada H19 (DMRH19), que se encontra metilada no alelo paterno e demetilada no materno. A hipermetilação da DMRH19 leva a perda do imprinting de *IGF2* e à inativação aberrante do alelo materno deste gene. O domínio centromérico de 11p15.5 contém o cluster *KCNQ1*, de genes também regulados por imprinting a partir da região diferencialmente metilada *Kv* (KvDMR). A hipometilação de KvDMR leva à ativação aberrante do gene *KCNQ1*, e essa perda de imprinting de KvDMR está associada com 50% dos casos de SBW. Neste estudo, as alterações epigenéticas de DMRH19 e KvDMR foram detectadas utilizando um kit comercial de MS-MLPA, que avaliou o padrão de metilação comparando as áreas dos picos obtidas da análise de fragmento efetuada nas amostras de DNA digeridas e não-digeridas de cada paciente. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *Excel-in-house based software* (Meth-HULP v1.1). A validação do MS-MLPA foi realizada a partir do pirosequenciamento das mesmas regiões, utilizando iniciadores específicos que permitiram a análise dos índices de metilação de 4 sítios CpG em DMRH19 e 8 sítios em KvDMR. Os resultados de MS-MLPA dos 10 pacientes mostraram 5 padrões distintos de metilação: (I) metilação normal de DMRH19/KvDMR (n = 5), (II) metilação normal de DMRH19 com hipometilação de KvDMR (n = 1), (III) hipometilação de DMRH19 com metilação normal de KvDMR (n = 2), (IV) hipermetilação de DMRH19 com metilação normal de KvDMR (n = 1), e (V) hipermetilação de com hipometilação de KvDMR (n = 1). O pirosequenciamento confirmou os achados do MS-MLPA, exceto para LH2 com o padrão V que mostrou metilação normal de DMRH19 pelo MS-MLPA e hipermetilação dessa mesma região pelo pirosequenciamento. A hipermetilação de DMRH19 (em 2/10 pacientes) e hipometilação de KvDMR (em 2/10) foram as alterações mais frequentes, associadas a fenótipos de SBW e Hemihipertrofia. Os três pacientes com hipermetilação de DMRH19 podem estar sujeitos ao desenvolvimento de TW e um deles apresentou dissomia uniparental paterna (UPD). Isodissomias proximais e distais, sem reprogramação epigenética, foram postuladas como possíveis alternativas para explicar padrões de metilação em três pacientes.

## ABSTRACT

### **Quantitative evaluation of the methylation pattern of DMRH19 and KvDMR regions in patients with apparent epigenetic alterations in 11p15.5**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Hanna Soares Pereira**

Hemihypertrophy, macrosomic syndromes and Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) (macrosomy, hyperinsulinism and visceromegaly) comprise a set of abnormalities associated with epigenetic alterations in chromosome region 11p15.5 with predisposition to embryonic tumours, mainly Wilms tumour (WT). The telomeric 11p15.5 domain contains two imprinted genes: the paternally expressed *IGF2* encoding a foetal growth factor, and the maternally expressed *H19* that transcribes a noncoding RNA of unknown function. The expression of these genes is regulated by differential methylation of the H19 region (DMRH19) that is normally methylated only in the paternal allele. DMRH19 hypermethylation results in loss of *IGF2* imprinting and aberrant activation of the maternal *IGF2* allele. The 11p15.5 centromeric domain contains the *KCNQ1* cluster; hypomethylation of this region results in aberrant activation of the maternal allele of this gene. Loss of KvDMR imprinting is associated with 50% of BWS. Epigenetic alterations in DMRH19 and KvDMR were detected with a commercial MS-MLPA kit. MS-MLPA methylation patterns were detected by comparing peak areas from digested and non-digested blood DNA of 10 patients. Data were analysed with an Excel-in-house based software (Romanelli, 2011). MS-MLPA validation was performed by DMRH19 and KvDMR pyrosequencing with specific primers. Analyses of CpG methylation indices were carried out. Five different MS-MLPA profiles were observed: (I) normal DMRH19/KvDMR methylation (n = 5), (II) normal DMRH19 methylation with KvDMR hypomethylation (n = 1), (III) DMRH19 hypomethylation with normal KvDMR methylation (n = 2), (IV) DMRH19 hypermethylation with normal KvDMR methylation (n = 1), and (V) DMRH19 hypermethylation with KvDMR hypomethylation, this last one characterising a paternal UPD (n = 1). Pyrosequencing data were consistent with MS-MLPA findings except for LH2 patient with profile V who showed normal methylation of DMRH19 with MLPA but hypermethylation by pyrosequencing. These studies showed DMRH19 (in 2/10) hypermethylation and KvDMR (in 2/10) hypomethylation as the most frequent alteration associated with BWS and hemihypertrophy phenotypes. Three patients, with DMRH19 hypermethylation, were likely candidates to developing Wilms Tumour, and one of them UPD was diagnosed. Proximal and distal uniparental isodisomies were without epigenetic reprogramming were postulated as alternative mechanisms for explaining methylation profiles in three patients.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIGENÉTICA

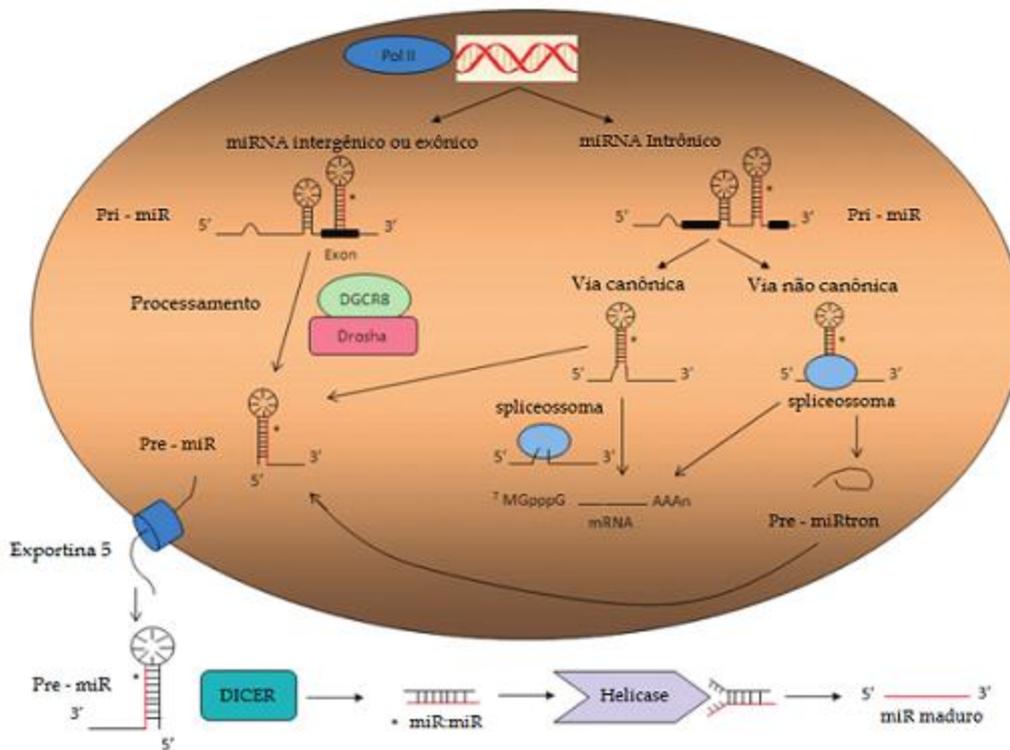
A epigenética estuda as alterações herdáveis que modificam a expressão gênica que não se devem a alterações na sequência de DNA. Originalmente, o termo foi criado em 1939 pelo embriologista Conrad Hal Waddington para descrever a interação causal entre genes e seus produtos levando à existência de diversos fenótipos (ESTELLER, 2008). Entre alguns dos principais mecanismos epigenéticos conhecidos estão:

**(I) A modificação de histonas (proteínas do octâmero do nucleossomo):** ocorre a partir dos processos de acetilação, metilação, sumoilação, ubiquitinação e fosforilação, que alteram a conformação dessas proteínas diminuindo ou aumentando sua afinidade pela molécula de DNA (figura 1). As alterações melhor descritas até o momento são a acetilação e a metilação de histonas. A primeira consiste na adição de um radical acetil às lisinas majoritariamente localizadas na cauda N-terminal das histonas levando ao relaxamento da dupla fita de DNA, o que facilita o acesso dos fatores de transcrição a este trecho de cromatina. Esta reação de acetilação é realizada pelas enzimas HATs (*Histone Acetyltransferases*). O oposto também ocorre, quando as HDACs (*Histone Deacetylases*) retiram o radical acetil das histonas elevando o nível de compactação da cromatina e, assim, reprimindo o processo de transcrição (HAKE *et al.*, 2004; DELAVAL *et al.*, 2007; SADIKOVIC *et al.*, 2008).

Já a metilação de histonas é um processo que pode ocorrer em resíduos de lisinas ou argininas. As histonas podem ser mono, di ou trimetiladas e as responsáveis pela adição dos radicais metil são as enzimas HMTs (*Histone Methyltransferases*). Essas alterações podem tanto favorecer a expressão, quanto silenciar a transcrição gênica, dependendo do resíduo metilado (HAKE *et al.*, 2004; ESTELLER, 2007).



diversos RNAs mensageiros alvo (LEE *et al.*, 2004; GARZON *et al.*, 2006; IORIO & CROCE, 2012a, 2012b).

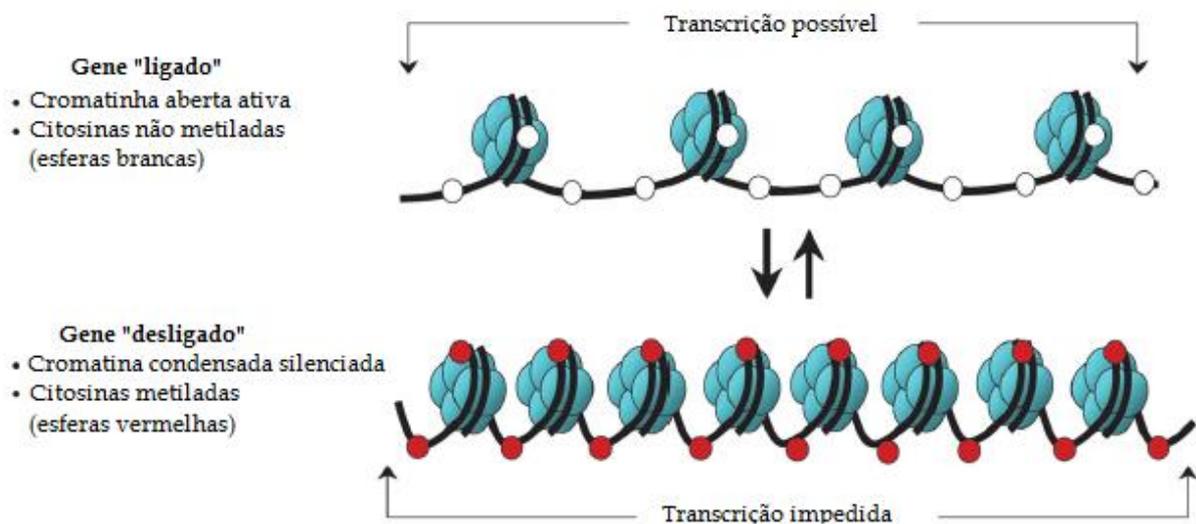


**Figura 2:** Biogênese do miRNA. Adaptado de IORIO & CROCE, 2012b.

**(III) Metilação do DNA:** sabe-se que hoje este é o mecanismo epigenético mais extensivamente estudado. O DNA é metilado através da adição de radicais metil às citosinas que precedem guaninas (sentido 5' → 3') nos chamados dinucleotídeos CpG (figura 3), e as enzimas responsáveis por esta reação são as DNA metil-transferases (DNMTs), que usam como doadora de grupamentos metil a molécula SAM (S-adenosilmetionina). Existem três classes principais de DNMTs. A DNMT1, denominada metiltransferase de manutenção, uma hemi-metilase envolvida no processo de metilação durante a replicação do DNA e responsável pela cópia do padrão de metilação da fita original. A DNMT2 ainda tem sua função biológica indefinida. Sua capacidade de se ligar fortemente à molécula de DNA, sendo resistente até mesmo à desnaturação, sugere que esta marque o genoma de maneira específica, a partir do reconhecimento de sequências alvo. Por fim, as DNMTs da classe três estão relacionadas à aquisição de metilação *de novo* do DNA durante o desenvolvimento embrionário (TRASLER *et al.*, 1996; BESTOR, 2000; BOURC'HIS *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2001; HOWELL *et al.*, 2001; DENIS *et al.*, 2011).

A porcentagem de nucleotídeos CpG no genoma é de 2 a 5%, sem distribuição uniforme. Sua localização se concentra nos SINEs (*short interspersed nuclear elements*) e LINEs (*long interspersed nuclear elements*), sequências DNA repetitivas. Além disso, estão presentes nas regiões promotoras dos genes, onde formam as ilhotas CpG presentes em aproximadamente 60% dos genes. Os nucleotídeos CpG localizados em sequências repetitivas costumam estar metilados em células normais, o que pode reprimir a expressão de retrotransposons colaborando para a estabilidade ao genoma. O oposto acontece com as ilhotas CpG, que se encontram em regiões promotoras, pois estas se encontram desmetiladas em células normais (BIRD, 2002; LAIRD, 2003; JONES *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2009).

Sabe-se que os mecanismos epigenéticos estão severamente alterados no câncer humano e, por esse motivo, o número de estudos que objetivam compreendê-los tem crescido consideravelmente. Atualmente, os avanços das tecnologias em ciência tem tornado possível analisar metilomas, histonomas, e transcriptomas de RNAs não-codificantes completos, tanto para sistemas biológicos normais, quanto para as doenças associadas a estes (ESTELLER, 2011).



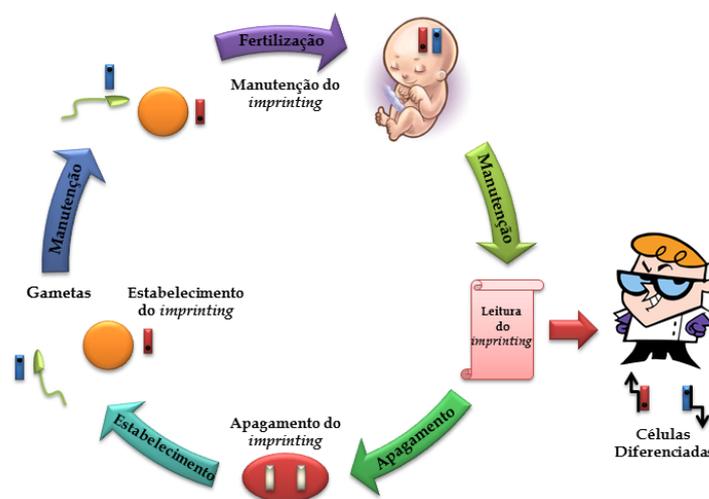
**Figura 3:** Mecanismos de metilação e seus efeitos na cromatina. Adaptado de LUONG, 2009.

## 1.2. IMPRINTING GENÔMICO:

Criado em 1950 pelo etologista Lorenz, o termo *imprinting* era utilizado para descrever o comportamento dos animais em resposta a estímulos do meio ambiente e em 1960 passa a ser utilizado como “*imprinting* específico de gametas” para caracterizar cromossomos que adquirem um padrão de *imprinting* na linhagem germinativa masculina com efeitos diferentes dos adquiridos pelo mesmo cromossomo na linhagem germinativa feminina (EFSTRATIADIS, 1994; HALL, 1990).

Sabe-se hoje que o mecanismo de *imprinting* genômico ou gamético ocorre devido à metilação do DNA, resultando na expressão monoalélica de um gene de acordo com sua origem parental e representa uma exceção à genética clássica (SOLTER, 2006; IDERAABDULLAH *et al.*, 2008). Os mecanismos pelos quais a metilação atua na expressão gênica são vários, sendo o exemplo mais simples através do silenciamento direto do promotor, impedindo a transcrição do alelo metilado e interferindo na ligação de fatores em *trans* (PAULER; BARLOW, 2006).

No mecanismo de *imprinting* gênico, a mesma sequência de DNA passa por ciclos de marcação epigenética, ora de origem materna, ora de origem paterna, em três fases distintas. A primeira fase é a do estabelecimento do *imprinting* parental específico na linhagem germinativa, seguida da manutenção e leitura do *imprinting* em células somáticas da prole, e por fim há a retirada das marcas epigenéticas pré-existentes e o re-estabelecimento de novos *imprintings* nas células germinativas da prole. As marcas epigenéticas são mantidas e lidas nas células somáticas do indivíduo, enquanto que nas células germinativas estas marcas são apagadas e estabelecidas de maneira sexo-específica (Figura 4) (SHA, 2008).



**Figura 4:** Fases do Ciclo do *Imprinting*.

Inúmeras características diferenciam os genes que sofrem *imprinting* dos que não sofrem. Os primeiros são conhecidos por conterem íntrons menores e menos frequentes em relação aos outros (HURST, *et al* 1996). Além disso, pesquisas genômicas comparativas afirmam que os genes que sofrem *imprinting* costumam ter um grau maior de sequências repetitivas como resultado da presença de uma alta proporção de elementos de retrotransposição (NEUMANN, *et al* 1995). Outra peculiaridade destes genes é o fato de o *imprinting* ocorrer sempre em *clusters* (grupos de genes em *tandem*) que costumam ter tamanho superior à 1Mb. Atualmente são conhecidos pelo menos 1.000 genes potencialmente regulados por *imprinting*. Estudos que tentam comprovar este número afirmam um erro de 80% na identificação destes genes, pois as técnicas atualmente disponíveis para realizar essas análises ainda são insatisfatórias (DEVEALE, *et al* 2012; KELSEY, *et al* 2012; WEKSBERG, 2003).

O estudo do *imprinting*, em organismos de diferentes espécies, aponta para um mecanismo que envolve a compactação da cromatina com atuação de elementos *cis*-atuantes como. Em geral, o alelo metilado sofre silenciamento através da metilação direta do seu promotor, ou por metilação de um Centro Regulador de *Imprinting* (CRI) que são regiões diferencialmente metiladas, *cis*-atuantes e ricas em ilhas CpG, responsáveis por coordenar a expressão dos genes presentes no *cluster* (REINHART, *et al* 2002; SOLTER, 2006). Um exemplo deste controle ocorre no gene *KCNQ1* (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1*) em mamíferos, que contém um CRI chamado CRI2, regulando o *imprinting* dos genes de seu *cluster* (MANCINI-DINARDO, 2003; FITZPATRICK, *et al* 2002; HORIKE *et al.*, 2000;).

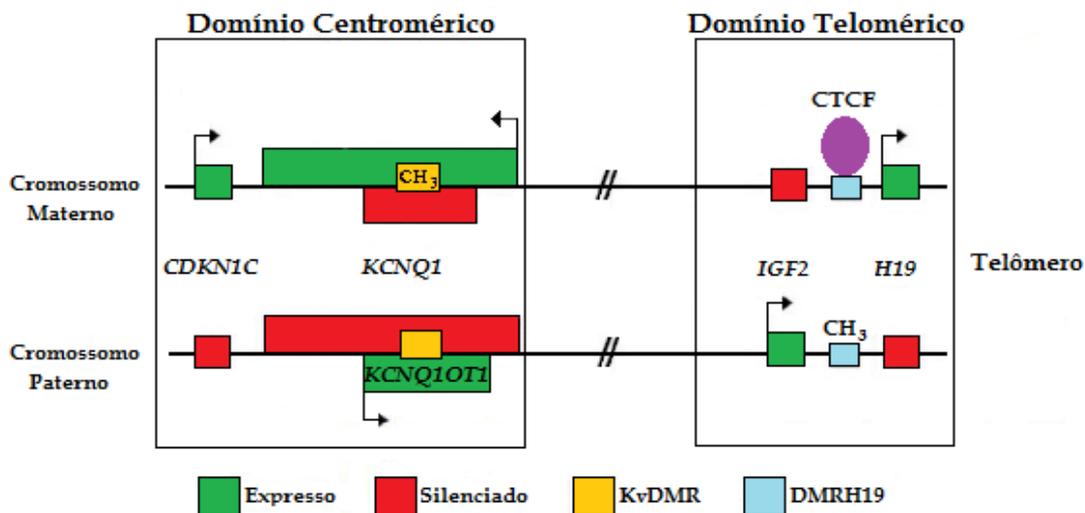
Os genes que sofrem *imprinting* estão envolvidos em muitos estágios do desenvolvimento, incluindo crescimento fetal, placentário e a proliferação celular. Consequentemente, alterações nos padrões normais de *imprinting* podem originar diversas doenças genéticas humanas, incluindo o câncer (FALLS *et al.*, 1999).

### 1.3. HEMIHIPERTROFIA, MACROSSOMIAS, SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN (SBW) E SUA RELAÇÃO COM O TUMOR DE WILMS (TW)

A hemihipertrofia (ou hemihiperplasia) possui incidência de 1:86.000 nascidos vivos. Esta anomalia pode ser isolada (HHI), ou associada à Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) ou a outras síndromes macrossômicas e está relacionada à expressão aumentada do gene *IGF2* e a um fenótipo de crescimento assimétrico e anormal do indivíduo (GOMES *et al.*, 2005). Alterações no padrão de metilação tanto da *KvDMR*, quanto da *DMRH19* foram

encontradas em 29,6% dos casos(8/27) de hemihiperplasia estudados por Martin e cols (2005), sendo três desses, associados a dissomia uniparental paterna (UPD), quatro apresentaram hipometilação de KvDMR e um apresentou hipermetilação isolada de DMRH19. Além disso, Niemitz e cols (2005) encontraram hipermetilação da *DMRH19*, em 20% (3/15) de crianças com hemihiperplasia isolada e TW sendo esta porcentagem igual a 79% (11/14) para as crianças com SBW e TW.

A SBW (*Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM*) é uma síndrome de anomalias congênitas relacionadas a alterações no *imprinting* de regiões diferentemente metiladas. Suas características clínicas gerais são: a macrossomia, macroglossia, defeitos na parede abdominal e apresentar de 7 à 21% de chance de se desenvolver câncer embrionário, principalmente TW (WEKSBERG *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2005). Diversas alterações em um *cluster* gênico, que normalmente sofre *imprinting* na região cromossômica 11p15.5 (Figura 5), têm sido encontradas em SBW. Essa região do cromossomo 11 contém pelo menos 12 genes epigeneticamente silenciados, subdivididos em dois domínios (SMITH *et al.*, 2007).



**Figura 5:**Figura ilustrando a região 11p15.5. Domínio Centromérico (Centromeric Domain) ou Domínio 2 e Domínio Telomérico (Telomeric Domain) ou Domínio 1. Em roxo: proteína CTCF. Adaptado de (WEKSBERG *et al.*, 2005)

O domínio 1, também conhecido como Domínio Telomérico, contém os genes *IGF2* (*Insulin-like Growth Factor 2*) e *H19* (*H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)*), além do CRI chamado *DMRH19*. No cromossomo materno, *DMRH19* não é

metilado, permitindo a ligação de uma proteína do tipo dedos-de-zinco chamada CTCF. A ligação de CTCF bloqueia o acesso ao promotor de *IGF2* pelos acentuadores (*enhancers*) localizados a jusante do gene *H1*. O gene *H19*, é deste modo expresso somente no alelo materno, transcrevendo um longo RNA não codificante, enquanto o gene *IGF2* é inativado (SMITH *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2005; SZABO *et al.*, 2004). A função desse RNA ainda não é clara, mas acredita-se que ele interaja com os alelos *IGF2* formando estruturas em loop que auxiliam na regulação da expressão deste gene. Recentemente, foi observado que este RNA não codificante está envolvido na regulação da expressão de uma rede de genes relacionados ao desenvolvimento e crescimento embrionário, através da produção de miRNAs a partir de seu longo transcrito (BUCKBERRY *et al.*, 2012; STECK *et al.*, 2012; CAI; CULLEN, 2007; GABORY *et al.*, 2006).

Contrariamente, no cromossomo paterno DMRH19 é metilado, impedindo a ligação de CTCF, e permitindo a transcrição de *IGF2* que codifica um fator de crescimento fetal. Além disso, a metilação de DMRH19 se estende até o promotor de *H19*, impedindo sua expressão (SMITH *et al.*, 2007).

Algumas características de SBW, como super-crescimento e macroglossia, foram observadas em camundongos transgênicos com alta expressão de *IGF2* (SUN *et al.*, 1997). Em humanos, a expressão aumentada de *IGF2* está relacionada à SBW e ao desenvolvimento de uma diversidade de tumores (CHAO; D'AMORE, 2009). Esta super-expressão de *IGF2* pode também estar associada à duplicação da região 11p15.5 no cromossomo paterno, à isodissomia uniparental (UDP) paterna, ou à hipermetilação do DMRH19 materno que inativa o gene *H19* e permite a expressão de *IGF2* no cromossomo materno, resultando em expressão bialélica desse gene (MURRELL *et al.*, 2008; SCOTT *et al.*, 2008; OHLSSON *et al.*, 1994).

O domínio 2, ou Domínio Centromérico, contem seis genes que sofrem *imprinting*, incluindo *CDKN1C* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), expresso somente no cromossomo materno e que codifica um inibidor ciclina-dependente de quinase, regulando de forma negativa a proliferação celular. O CRI deste domínio, chamada KvDMR, localiza-se no íntron 10 do gene *KCNQ1* (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1*) que não se encontra metilado no alelo paterno, permitindo a expressão de um longo transcrito não codificante denominado *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*), também conhecido como LIT1 (GOMES *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2005). Este transcrito, com uma origem próxima a região KvDMR, no sentido antisenso em relação ao gene *KCNQ1*, interage com a cromatina, com as histonas metiltransferases e outros complexos

proteicos que reprimem a expressão gênica, e exercem um importante papel no silenciamento transcricional do *cluster* que contém *KCNQ1*, regulando a metilação de histonas (KANDURI, 2011). A metilação materna de KvDMR silencia a expressão de *KCNQ1OT1* e permite a expressão de *KCNQ1* e *CDKN1C* (SMITH *et al.*, 2007). Mutações no alelo materno de *CDKN1C* foram encontradas em 10% dos casos esporádicos de SBW. Os casos esporádicos onde o alelo materno está hipometilado em KvDMR são os mais frequentes, ocorrendo em aproximadamente 50% dos pacientes. Porém, entre 10 e 15% dos casos de SBW possuem etiologia ainda desconhecida (WEKSBERG *et al.*, 2005).

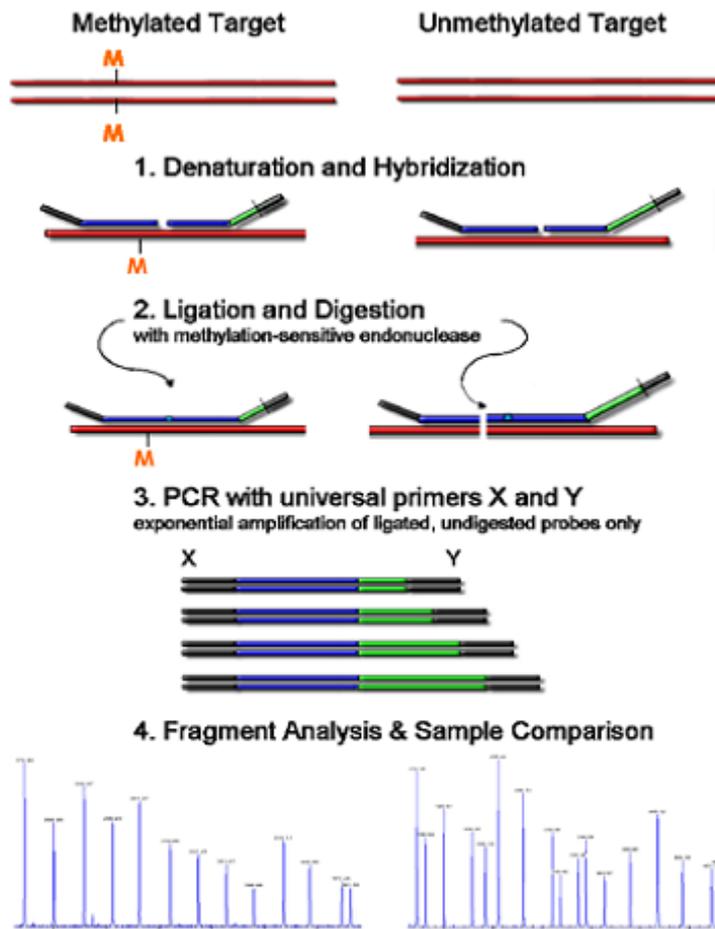
A perda de *imprinting* de *IGF2* foi primeiramente descrita no TW, tumor renal maligno mais frequente na infância, com uma incidência de 1/10.000. O TW é primordialmente uma doença esporádica, e apenas 1 a 2% dos indivíduos apresentam um parente com TW. Em 5% dos casos ambos os rins são afetados (SCOTT *et al.*, 2006). O TW apresenta dois tipos distintos de histopatologia, originando-se de restos nefrogênicos perilobulares ou intralobulares. Erros no *imprinting* de *IGF2* que levam à expressão de ambos os alelos deste gene, associam-se a tumores que surgem de restos nefrogênicos perilobulares nas células nefrogênicas progenitoras, localizadas na periferia do lóbulo renal em desenvolvimento (BJORNSSON *et al.*, 2007). Esta alteração epigenética é observada em aproximadamente 40% dos TWs. Este tumor também é observado em 5% dos casos de SBW (DAVIDOFF, 2010).

#### 1.4 INVESTIGAÇÕES EPIGENÉTICAS EM 11p15.5

Com o intuito de estudar as causas que levam a perda de *imprinting* em pacientes com SBW e síndromes macrossômicas, o padrão de metilação de *IGF2* e/ou *H19* têm sido muito estudado nos últimos seis anos por diversos métodos, tais como RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) (GOMES *et al.*, 2005), COBRA (*combined bisulphite restriction analysis*) (MURRELL *et al.*, 2008; SATOH *et al.*, 2006), sequenciamento de amostras modificadas por bissulfito (Wu *et al.*, 2008), MS-MLPA (*Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (SCOTT *et al.*, 2008) e pirosequenciamento de amostras modificadas por bissulfito, que é a técnica padrão ouro para a análise de metilação de DNA modificado por bissulfito de sódio (RONAGHI, 2001).

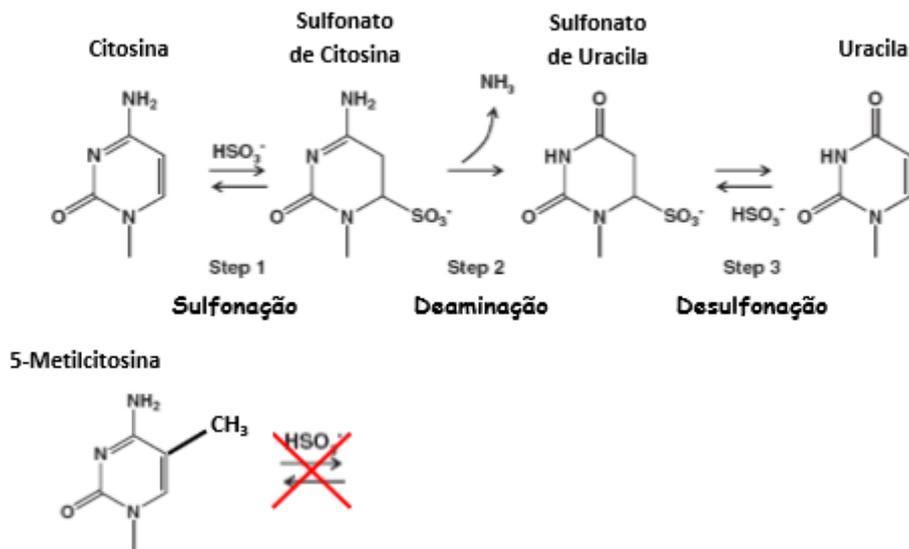
Uma técnica utilizada neste trabalho (MS-MLPA) consiste de amplificações utilizando múltiplas sondas (multiplex) de pequeno tamanho, que anelam a regiões já descritas como passíveis de se encontrarem metiladas, seguida de uma digestão por uma endonuclease sensível

a metilação. As regiões não metiladas serão clivadas, não permitindo sua amplificação por PCR. As regiões que se encontravam originalmente metiladas serão amplificadas (Figura 6).



**Figura 6:** Ilustração da técnica de MS-MLPA (MRC-Holland®). A parte superior da figura mostra dois tipos de sequências de DNA, uma contendo um sítio metilado (M) nas duas fitas, e a mesma região no outro alelo em que esse sítio não se encontra metilado. 1. Após desnaturação as sondas hibridizam em ambas regiões alélicas (a metilada e a não metilada). 2. As sondas são ligadas pela ligase e digeridas por uma endonuclease sensível a metilação que corta o DNA na região não metilada. 3. Amplificações por PCR com primers que anelam nas extremidades das sondas (X e Y). 4. São gerados fragmentos de diversos tamanhos contendo regiões que originalmente se encontravam metiladas. As diferenças de tamanho dos fragmentos amplificados devem-se às diferenças de tamanho das stuffer sequence derivadas do vetor M13 (em verde).

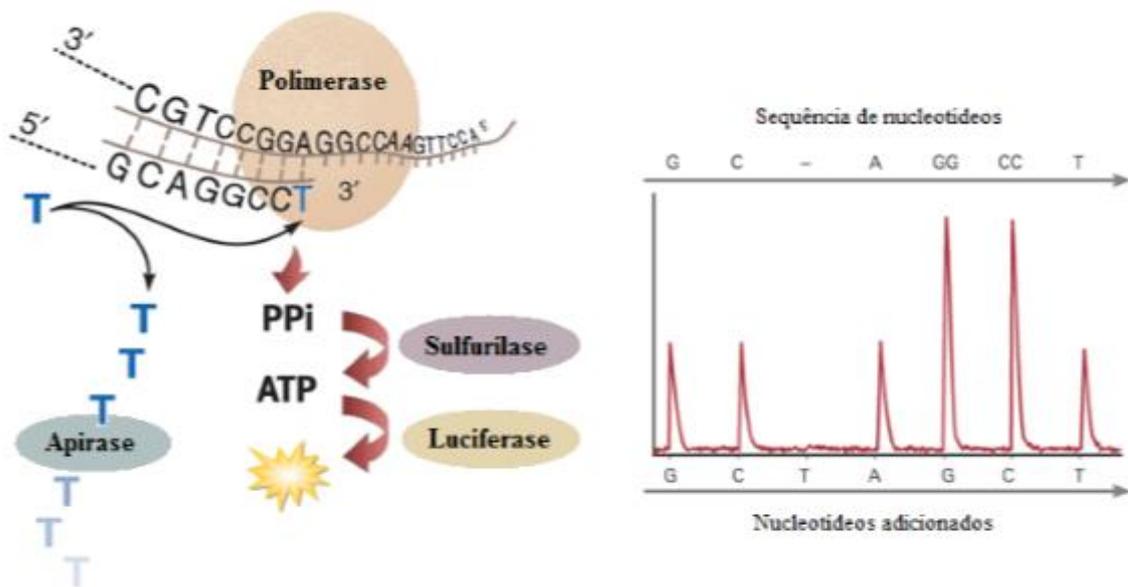
A segunda técnica utilizada neste trabalho foi a modificação do DNA por bissulfito de sódio seguida de pirosequenciamento. Esta técnica consiste em um procedimento químico de sulfonação, deaminação e desulfonação das citosinas não metiladas, que serão convertidas em uracilas. Contrariamente, as citosinas metiladas não sofrem alteração, pois não são suscetíveis à conversão (HAYATSU, 2008) (Figura 7).



**Figura 7:** Reações químicas produzidas pelo bissulfito de sódio. Adaptado de (HAYATSU, 2008)

Após tratamento com bissulfito, uma reação de PCR amplificará o DNA que continha o sítio metilado com G em uma fita e C na outra, enquanto que o sítio não metilado terá A em uma fita e T na outra.

O pirosequenciamento é uma técnica baseada na detecção de pirofosfato (PPi) liberado durante a síntese de DNA. Numa cascata de reações enzimáticas é gerada luz visível proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (Figura 8). A cascata se inicia com a reação de polimerização de um ácido nucléico, em que o pirofosfato inorgânico é liberado como resultado da incorporação de um nucleotídeo pela polimerase. O pirofosfato liberado é subsequentemente convertido em ATP, pela enzima ATP sulfurilase, e promove a energia para a luciferase oxidar luciferina e gerar luz. Como o nucleotídeo adicionado é conhecido, a sequência da fita molde pode ser determinada. Por sua especificidade na incorporação nucleotídica, o pirosequenciamento é capaz de quantificar os sítios CpG metilados a partir de uma sequência de referência que mostra onde estes sítios estão localizados. O software então conta quantas incorporações de timinas e de citosinas aconteceram e gera uma porcentagem de metilação para estes sítios (RONAGHI, 2001).



**Figura 8:** Ilustração do princípio da técnica de Pirosequenciamento. Adaptado de (ENGLAND; PETTERSSON, 2005).

O entendimento dos mecanismos moleculares associados à etiologia de SBW e das síndromes macrossômicas, é importante para o acompanhamento adequado e aconselhamento genético dos pacientes envolvidos e de seus familiares. Portanto, este trabalho pretende comprovar que a técnica de MS-MLPA é eficaz para o rastreamento das alterações epigenéticas em 11p15.5, para que futuramente esta possa ser utilizada na rotina do aconselhamento genético, para agilizar o atendimento, possibilitar um pré-diagnóstico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com SBW e síndromes macrossômicas que se encontram em risco de desenvolver Tumor de Wilms.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar possíveis alterações epigenéticas nas regiões DMRH19 e KvDMR em pacientes com hemihipertrofia, síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) e síndromes macrossômicas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.1.1. Detectar alterações do padrão de metilação da região 11p15.5 com o uso de MS-MLPA.

2.1.2. Validar os achados epigenéticos do MS-MLPA com o pirosequenciamento e estimar quantitativamente os padrões diferenciados de metilação, encontrados em DMRH19 e KvDMR.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES:

Foram estudados catorze (14) pacientes com hemihipertrofia, SBW e síndromes macrossômicas, porém sem TW, cuja idade variou de 0 a 59 anos (Tabela 1). Além disso, outros dois pacientes do aconselhamento genético que não faziam parte da casuística desse trabalho, pois apresentavam Síndrome de Silver-Russel (SSR) e necessitavam da avaliação das regiões DMRH19 e KvDMR, foram incluídos no estudo (Tabela 1). O tema desta dissertação está incluído no Projeto “Correlação de alterações genéticas, somáticas e constitutivas, com achados clínicos e histopatológicos em indivíduos com tumor de Wilms” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (registro CEP 087/08) incluindo os pacientes deste estudo na caracterização amostral (anexos I e II).

**Tabela 1:** Relação dos pacientes contendo diagnóstico e informações de cada um, a instituição de origem, sexo e a idade. PN = Peso ao Nascimento; CN = Comprimento ao Nascimento; PCN = Perímetro Cefálico ao Nascimento. (> p95) = Representa que o peso ou a estatura do paciente se encontra 95% acima do considerado normal para sua idade.

<b>PACIENTE-IDADE</b>	<b>DIAGNÓSTICO CLÍNICO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS APRESENTADAS</b>	<b>INSTITUIÇÃO DE ORIGEM</b>
<b>LH1 Sexo feminino IDADE = 19 ANOS</b>	Macrossomia/ Hemihipertrofia	PN = 3900g; Elevado peso ao nascer; atraso psicomotor; assimetria facial; face triangular; columela estende-se abaixo das acinas nasais; assimetria de membros inferiores; desenvolveu astocitoma policístico; PC aos 15 anos = 56 cm (>p95);	INCA

<b>LH2</b> <b>Sexo masculino</b> <b>IDADE = 7 ANOS</b>	SBW	PN = 1745g; CN = 46cm; Mão é pés com formação normal e tamanho acima do normal; macrosomia; leve hidrocele escrotal; discreta hérnia umbilical; macroglossia discreta; fígado aumentado; orelhas e lóbulos grandes; prega na parte posterior do lóbulo; PC em 2012 = 46cm;	INCA
<b>LH3</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 13</b>	Macrossomia	PN = 3980g; CN = 54cm; Peso atual = 65,6kg (>p95); Estatura: 1,62m (>p95); mancha hipocrômica no tórax; gonadoblastoma; hidronefrose à direita; cariótipo XY; PC em 2012 = 59cm	INCA
<b>LH4</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 4,5 ANOS</b>	Macrossomia	PN = 4030g; CN = ?; PCN = 36cm; hemangioma em face direita; hemihipertrofia em face; sem indentação posterior de orelha; PC em 2010 = 48cm;	INCA
<b>LH7</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 59 ANOS</b>	Macrossomia	Sem indentação em lobo posterior na orelha; duas manchas café com leite na região lateral do abdômen; nevis múltiplos;	INCA
<b>LH8</b> <b>Sexo masculino</b> <b>IDADE = 8 ANOS</b>	Hemihipertrofia	PN = 3055g; CN = ?; Nascimento aos oito meses; Cariótipo normal; lipoma em dorso; hipertrofia em membro inferior direito; mancha café com leite na face, respeitando a linha média; assimetria em membros inferiores; submetido à retirada de testículo; PC em 2012 = 53cm;	INCA

<b>LH9</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 4 ANOS</b>	SSR	PN = 1390g; CN = 38cm; PCN = 30 cm; aversão alimentar; face triangular; orelhas antevertidas e baixo implantadas; sem dentes; palato íntegro; genitália feminina; não tem clinodactilia;	INCA
<b>LH12</b> <b>Sexo masculino</b> <b>IDADE = ?</b>	SBW	PN = 4730g; PCN = 38cm; C = 52cm; sinais de macrosomia; polidactilia; baço acessório; atraso motor; pavilhão auricular dobrado; lábio fino; macroglossia; face alongada; hidrocele; testículos em bolsa; diástase de retos abdominais; sulcos em região posterior da orelha; epicanto; hemangioma em região posterior; fontanela anterior palpável;	INCA
<b>LH13</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 11,5 ANOS</b>	SSR	PN = 1560; PCN = 31,5; C = 39,5cm; nascimento prematuro aos seis meses; sindactilia levíssima dos artelhos 3 e 4; mancha café com leite na frente e próximo ao ombro direito; abdome levemente distendido;	INCA
<b>LH14</b> <b>Sexo feminino</b> <b>IDADE = 16 ANOS</b>	Macrossomia	PN = 3800g; CN = 49cm; Peso atual = 72,5kg (>p95); Estatura atual = 1,65m (>p75); Apresenta clinodactilia do IV e V dedo dactilos; indentação posterior de orelha; PC em 2012 = 56,5cm;	INCA

### 3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES:

As amostras de DNA dos pacientes foram obtidas a partir de sangue periférico, extraído pelo serviço da instituição, em tubo de EDTA estéril. Após a extração, o DNA obtido foi dividido em duas alíquotas: (1) para a técnica de MS-MLPA e (2) para modificação pelo bissulfito de sódio e pirosequenciamento.

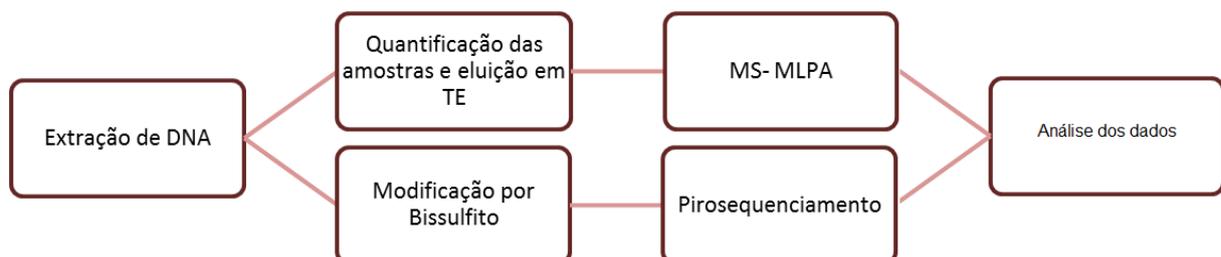
### 3.3. AMOSTRAS CONTROLE:

Amostras de DNA controle foram obtidas a partir de sangue periférico de indivíduos saudáveis, extraído pelo serviço do banco de sangue do INCA em tubo de EDTA estéril. Estas amostras pertencem ao do banco de controles do Programa de Genética do Centro de Pesquisas do INCA.

Seis amostras controle foram utilizadas para testar cada região de imprinting simultaneamente às amostras dos pacientes, por MS-MLPA e pirosequenciamento. Além disso, nas análises de pirosequenciamento foram utilizados dois controles comerciais, um de hipermetilação e outro de hipometilação (EpiTect Control DNA-QIAGEN®).

### 3.4. DESENHO EXPERIMENTAL:

Este estudo foi delineado para avaliar quantitativamente o estado metilacional das duas regiões, DMRH19 e KvDMR nos pacientes com possíveis alterações epigenéticas em 11p15.5 (Figura 9). Na primeira etapa foi utilizada a técnica de MS-MLPA para rastrear a metilação e na segunda etapa, os resultados foram validados por pirosequenciamento.



**Figura 9:** Desenho experimental do estudo.

### 3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:

As amostras de DNA dos 10 pacientes e dos 6 controles foram obtidas a partir de extração salina (MILLER *et al.*, 1988). O sangue periférico, coletado em tubo com EDTA, foi diluído em tampão de lise de hemácias (155mM NH<sub>4</sub>Cl; 10mM KHCO<sub>3</sub>; 1mM EDTANa<sub>2</sub> pH 7.4) mantendo a proporção de 35mL de tampão para cada 10mL de sangue em tubo de polipropileno de 50mL. A solução foi homogeneizada e o tubo incubado por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida, o material foi centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante descartado, o sedimento lavado em 10mL do mesmo tampão e centrifugado novamente a 3.000 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspense em 3mL de tampão de lise de núcleos (10mM Tris HCl ; 400mM NaCl ; 2mM EDTA pH 8.2), adicionando-se, em seguida, 150µL de SDS 20% e 20µL de Proteinase XIV (50µg/ml; Invitrogen ®). Homogeneizou-se levemente o material até o desaparecimento do sedimento e incubou-se a 37°C por 12 horas. Após a incubação, foi adicionado 1mL de NaCl 5M, o tubo foi homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 3.000rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, centrifugado por mais 10 minutos, a fim de eliminar quaisquer resíduos indesejáveis, e transferido novamente para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto mantido a -20 °C e recuperado por centrifugação a 3.000rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, em seguida, o sedimento foi lavado com 5mL de etanol 70% mantido a -20 °C por 5 minutos. Mais uma vez o DNA foi recuperado por centrifugação a 3.000rpm por 10 minutos e diluído em 1mL de água obtida do purificador Milli-Q (Direct - Q<sup>TM</sup>, Millipore). As amostras foram armazenadas em criotubos a 4°C para posterior análise.

### 3.6. MODIFICAÇÃO DO DNA POR BISSULFITO DE SÓDIO:

Cerca de 2,0 µg de DNA genômico de cada paciente e controle foi tratado com bissulfito de sódio utilizando o kit EpiTect Bisulfite (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA genômico tratado com o agente químico foi estocado a -20°C, e eluído em 40 µL de água deionizada (MiliQ).

### 3.7. MS-MLPA (METHYLATION-SPECIFIC MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION):

Para este estudo, utilizou-se o Kit ME030BWS/SRS (MRC-Holland®) que contém 45 sondas, sendo 27 delas específicas para a região SBW/Silver-Russel Syndrome (SRS) localizada em 11p15.5, e 18 sondas controle que hibridizam em outras regiões do genoma. Dentro das 27 sondas específicas, cinco hibridizam na região DMRH19 e outras quatro na região KvDMR e são específicas para detectar metilação. As outras 18 sondas específicas, junto com as sondas para outras regiões do genoma, são utilizadas para monitorar a dosagem alélica das regiões de interesse. Cada sonda consiste de duas sequencias nucleotídicas distintas: uma sintética, com região alvo a ser analisada e uma cauda terminal, e outra, derivada do vetor M13, com uma região alvo a ser analisada, uma sequencia de diferente tamanho (*stuffer sequence*) e uma cauda terminal. As duas partes de uma sonda hibridizam com sequências alvos adjacentes e são ligadas por uma ligase termo estável.

Nesta técnica de MS-MLPA o DNA (de 20 à 200ng) de cada paciente foi eluído em TE até um volume final de 5µL e submetido a uma desnaturação a 98°C por 10 min, seguida da hibridização com 1,5µL da mistura de sondas do kit e 1,5µL do tampão de MLPA, por 16h a 60°C. Em temperatura ambiente, adicionou-se a esta mistura de DNA hibridizado, 3µL do tampão ligase-A e 10µL de água deionizada. A solução foi subsequentemente dividida em duas alíquotas de igual volume (10,5µL) que foram aquecidas a 49°C. Em um dos tubos adicionou-se 10µL de uma solução (*mix*) contendo 0,25µL de ligase, 1,5µL de tampão ligase-B e 8,25µL de água. Ao segundo tubo, foi adicionado 10µL de uma solução (*mix*) contendo 0,25µL de ligase, 1,5µL de tampão ligase-B e 7,75µL de água e 0,5µL de endonuclease *HhaI*. Todos os tubos foram incubados a 49°C por 30min. Um volume de 5µL de cada tubo foi utilizado para reações de PCR com iniciadores universais nas seguintes condições: 35 ciclos de 30s a 95 °C; 30s a 60 °C; 60s a 72°C e incubação final de 20min a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em uma plataforma ABI 3130 (Applied Biosystems®). Os dados obtidos nesta plataforma (em arquivos *.txt*) mostraram a área dos picos de cada sonda (1) após amplificação de DNA digerido e de DNA não digerido de cada paciente, (2) após amplificação de DNA digerido e de DNA não digerido de cada controle.

Esses dados foram colocados em uma planilha de Microsoft Excel desenvolvida no Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) do Hospital Universitario La Paz (Madrid, Espanha), por Romanelli *et al.* (2011), para análise de dados obtidos com o kit Kit

ME030BWS/SRS (MRC-Holland®). Os recursos dessa planilha permitiram estimar a porcentagem de metilação das regiões alvo das nove sondas específicas para metilação nos pacientes e nos controles externos, de acordo com as especificações do kit utilizado. Os valores médios de metilação de cada uma das nove sondas específicas nos seis controles foram obtidos diretamente da planilha a partir das áreas dos picos de cada sonda. Esses valores médios foram comparados com os valores de cada paciente. Ao mesmo tempo, a planilha mostrou a dosagem alélica determinada pelas 27 sondas específicas para a região SBW/Silver-Russel Syndrome (SRS) e as 18 sondas para outras regiões cromossômicas.

As quantidades relativas dos produtos de amplificação foram utilizadas para estimar o número relativo de cópias das sequências alvo que se encontravam metiladas (Schouten *et al.* 2002). As porcentagens de metilação de cada sequência alvo foram utilizadas para estimar a média de metilação por região (**MMR**) e o desvio padrão (por região) entre amostras, que foi calculado com os valores de metilação das nove sondas dos 14 pacientes e dos seis controles, com o auxílio do aplicativo DESVEST .P do software Excel.

### 3.8. PIROSEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES *DMRH19* E *KvDMR*:

Os pares de iniciadores para pirosequenciamento, complementares ao DNA modificado por bissulfato, foram desenhados utilizando o programa PyroMark Q24 MDx Software 2.0 (QIAGEN®), com o intuito de localizar ilhas CpGs nas regiões *DMRH19* e *KvDMR*. A região *DMRH19*, aproximadamente de 2K a montante do gene *H19* (NCBI: NG\_016165.1), contém quatro sítios CpG em um produto de PCR de 126pb. A região *KvDMR* (NCBI: NG\_008935.1), localizada no gene *KCNQ1* e compreendendo também, o final do gene *KCNQ1OT1*, contém oito sítios CpG em um produto de PCR de 148pb. Os fragmentos que incluem essas regiões de interesse foram amplificados com os seguintes pares de iniciadores:

*DMRH19*-F: GGGGTTATTTGGGAATAGGATAT;

*DMRH19*-R: TAACTTAAATCCCAAACCATAACA (biotinilado na extremidade 5’);

*KvDMR*-F: TGTTTAGGTTAGGTTGTATTGTTG;

*KvDMR*-R: CCCATCTCTCTAAAAAATTT (biotinilado na extremidade 5’).

As amplificações foram realizadas, para cada região, nas seguintes condições: 30ng de DNA modificado pelo bissulfato, 7,5pmol de cada iniciador (Roche Applied Science®), 7,5mM dNTPs (Roche®), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM de Tris HCl (pH 8,0), 25µM KCl e 0,5U de Taq DNA polimerase (Roche®), para um volume final de 30µl. O protocolo da PCR para *DMRH19* foi:

denaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 45 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s, seguidos de 10 min a 72°C. Para a região KvDMR seguiu-se o seguinte protocolo: denaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 45 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 30s, 72°C por 30s, seguidos de 10min a 72°C.

As sequencias amplificadas a partir de um iniciador biotilado foram utilizadas como fita molde na reação de pirosequenciamento preparada na plataforma PyroMark Q24 MDx (QIAGEN®) com o kit PyroMark Q24 de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR biotilados no extremo 5' foram imobilizados por micro-esferas cobertas por streptavidina (*streptavidin-coated Sepharose High Performance beads, Amersham Biosciences®*), e o pirosequenciamento foi realizado automaticamente com o programa PSQHS96A Pyrosequencing®.

Para o pirosequenciamento foram utilizados os seguintes iniciadores:

*DMRH19-SF* GAATAGGATATTTATGGGAG;

*KvDMR-SF* GGGTATATAGTTTATTTTAGTA;

Os sítios ricos em dinucleotídios CpG foram analisados e a porcentagem de metilação final foi calculada a partir da média da porcentagem de cada pico CpG mostrado nos pirogramas (CARDOSO *et al.*, 2012). Os dados foram analisados utilizando o software PyroMark Q24 Software 2.0 (QIAGEN®). Para diferenciar os padrões de metilação encontrados nas amostras de interesse dos padrões normais de metilação das duas regiões estudadas, seis amostras controle foram usadas. A porcentagem de metilação por sítio CpG e a **MMR** (média de metilação por região) foram estimadas para pacientes e controles. O desvio padrão de cada região foi estimado em todas as amostras utilizando o aplicativo DESVEST .P do software Excel.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados de MS-MLPA e Pirosequenciamento foram coincidentes para os 10 pacientes estudados, mostrando 5 padrões distintos de metilação, sendo estes: (I) metilação normal de DMRH19/KvDMR (n = 5), (II) metilação normal de DMRH19 com hipometilação de KvDMR (n = 1), (III) hipometilação de DMRH19 com metilação normal de KvDMR (n = 2), (IV) hipermetilação de DMRH19 com metilação normal de KvDMR (n = 1), e (V) hipermetilação de DMRH19 com hipometilação de KvDMR (n = 1). As tabelas 2 e 3 descrevem os percentuais de metilação encontrados em todos os pacientes e os desvios padrões (s.d. – *standard deviation*) calculados.

**Tabela 2:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR obtidos pelo MS-MLPA. Média de Metilação por Região (**MMR**) para cada paciente.  $\bar{X}_1$  = média de metilação por região, por paciente.  $\bar{X}_2$  = média de metilação por sonda. s.d.\* = desvio padrão da média de metilação de cada sonda. Os números circulados foram retirados do cálculo da média de metilação. O número destacado em vermelho representa uma discrepância entre técnicas (ver tabela 3).

MS-MLPA													
Pacientes	Sondas da região DMRH19 (%)					MMR (%)	$\bar{X}_1$	Sondas da região KvDMR (%)				MMR (%)	$\bar{X}_1$
	1	2	3	4	5			1	2	3	4		
LH1	43	116	44	54	59	52		136	131	50	58	54	
LH2	45	45	45	45	43	45		23	13	9	13	14	
LH3	45	39	63	62	68	55		45	54	42	60	50	
LH4	53	45	55	65	61	56		41	46	39	49	44	
LH7	51	47	57	62	70	57		39	54	43	58	48	
LH8	46	56	70	71	69	62		13	7	3	5	7	
LH9	11	9	21	23	59	25		37	48	48	64	49	
LH12	82	60	85	90	76	79		45	47	62	38	48	
LH13	8	14	27	23	47	24		41	54	48	61	51	
LH14	58	45	61	60	43	53		55	45	37	64	50	
$\bar{X}_2$	44	48	53	56	60	51		47	50	38	50	42	
$\pm$ s.d.*(%)	21,5	29,1	19,3	20,7	11,8			11,5	17,9	18,3	21,6		
<b>MMC (%)</b>	48	66	51	52	86	61		67	63	53	47	58	

A tabela anterior mostra uma constância no padrão de metilação das sondas utilizadas no MS-MLPA, quando analisadas individualmente. Os s.d. de cada sonda foram calculados e se mostraram baixos ( $< 29,1\%$ ). Para o cálculo da MMR do paciente LH1, artefatos (números circulados) foram retirados para não comprometer os resultados, pois surgiram devido uma possível má leitura pela plataforma ABI 3130. Apenas uma discordância, em vermelho, foi encontrada entre os dois métodos no cálculo das médias de metilação por região, no paciente LH2, na região DMRH19 (resultado mostrado posteriormente na figura 12).

A tabela 3 descreve as médias de metilação dos pacientes analisados através do pirosequenciamento, por região e por sítio CpG. Foi estimada a média e o s.d. dos valores dos sítios em cada região, e a média e o s.d. dos valores totais de metilação de cada região em cada paciente. As médias por sítio foram semelhantes dentro de cada região, apesar do grande intervalo entre os valores máximos e mínimos de metilação de cada sítio (s.d. entre 13,8% e 22,7% para a região DMRH19; e 11,9% e 17,4% para a região KvDMR). Os valores de metilação dentro de uma mesma região, em cada paciente, mostraram valores de s.d. ainda menores, entre 2,1 e 12,5 para DMRH19 e de 1,5 a 7,7 para KvDMR indicando o estado global de metilação de cada região.

**Tabela 3:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR, obtidos pelo pirosequenciamento. Metilação por sítio e média de metilação por região (MMR) do total de pacientes.  $\bar{X}_{1\ e\ 2}$  = média de metilação por região e por sítio. O número destacado em vermelho representa uma discrepância entre as duas técnicas (ver tabela 2). s.d.\* = desvio padrão de cada sítio CpG.

Pacientes	Pirosequenciamento															
	Sítios CpG da região DMRH19 (%)				MMR (%)	$\pm$ s.d. (%)	Sítios Cpg da região KvDMR (%)								MMR (%)	$\pm$ s.d. (%)
	1	2	3	4	$\bar{X}_1$		1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{X}_1$	
LH1	63	70	73	73	<b>70</b>	<b>4,7</b>	62	65	59	50	57	58	68	74	<b>62</b>	<b>7,4</b>
LH2	79	83	85	75	<b>81</b>	<b>4,4</b>	33	36	30	25	29	29	33	37	<b>32</b>	<b>4,0</b>
LH3	59	62	64	61	<b>62</b>	<b>2,1</b>	46	51	44	38	45	44	51	54	<b>47</b>	<b>5,1</b>
LH4	35	42	51	64	<b>48</b>	<b>12,5</b>	50	54	51	43	50	49	55	58	<b>51</b>	<b>4,5</b>
LH7	59	63	62	59	<b>61</b>	<b>2,1</b>	48	52	45	38	45	46	52	56	<b>48</b>	<b>5,6</b>
LH8	39	44	51	59	<b>48</b>	<b>8,7</b>	11	13	10	9	10	10	11	13	<b>11</b>	<b>1,5</b>
LH9	19	21	28	37	<b>26</b>	<b>8,1</b>	46	49	45	38	46	45	49	52	<b>46</b>	<b>4,1</b>
LH12	75	82	85	68	<b>78</b>	<b>7,6</b>	46	51	45	38	45	45	51	56	<b>47</b>	<b>5,4</b>
LH13	16	22	27	34	<b>25</b>	<b>7,6</b>	53	58	51	44	52	53	57	61	<b>54</b>	<b>5,2</b>
LH14	69	71	73	66	<b>70</b>	<b>3,0</b>	59	66	57	46	56	57	65	71	<b>60</b>	<b>7,7</b>
$\bar{X}_2$	51	56	60	60	<b>57</b>		45	50	44	37	44	44	49	53	<b>46</b>	
$\pm$ s.d.* (%)	22,6	22,7	20,8	13,8			14,5	15,4	14,3	11,9	14,1	14,4	16,4	17,4		

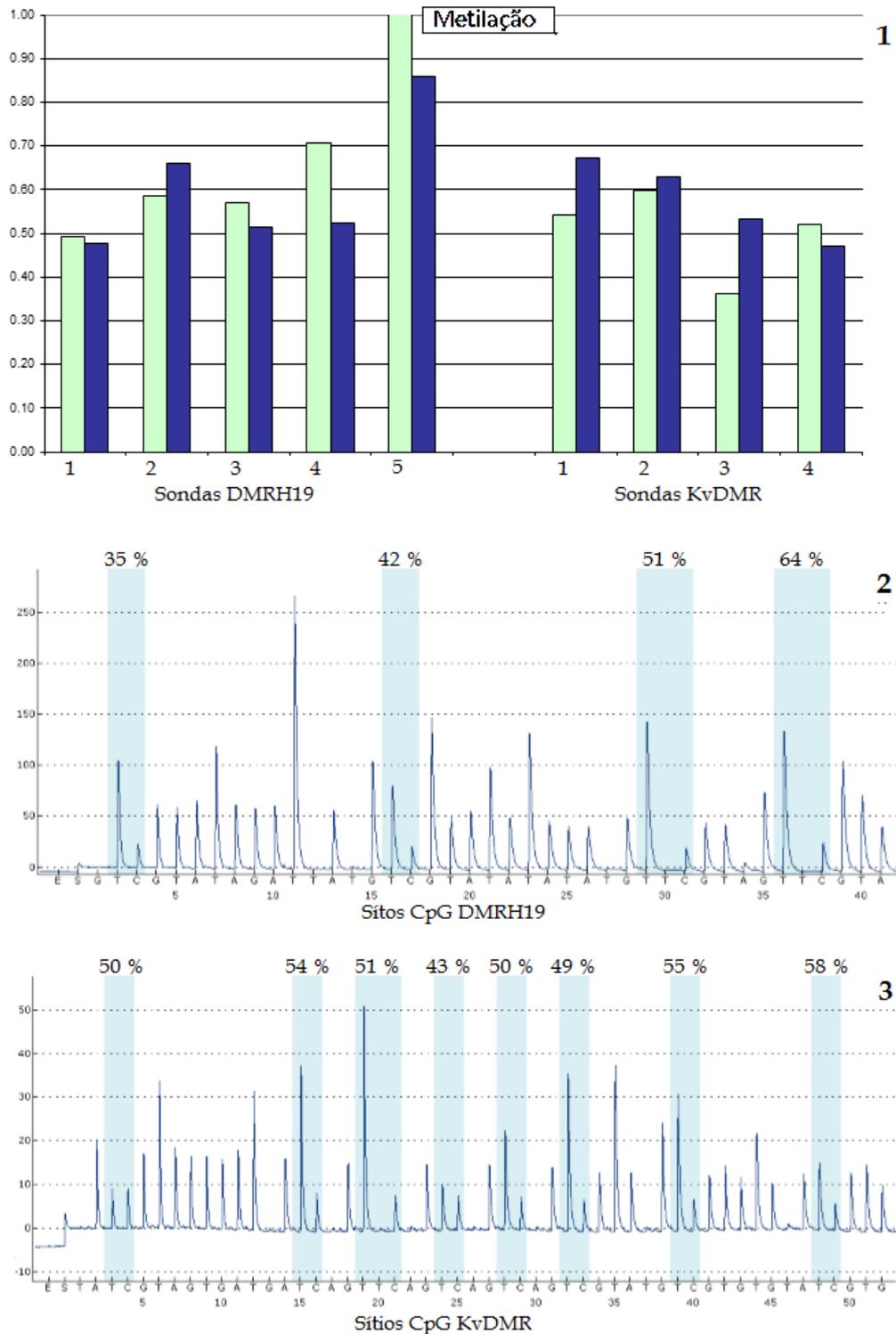
A tabela 4 mostra a média de metilação por sítio e por região nos controles. A metilação da região DMRH19 variou entre 57 e 65% e a região KvDMR entre 50% e 59%. A média de metilação por sítio de cada região, como esperado, mostrou valores de s.d. baixos ( $\leq 7,7$  para DMRH19 e de 3,9 para KvDMR).

**Tabela 4:** Percentuais de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR, obtidos pelo pirosequenciamento. Metilação por sítio e média de metilação por região nos controles (MMC).  $\bar{X}$  = média de metilação por região e por sítio. s.d.\* = desvio padrão da média de cada sítio CpG.

Pirosequenciamento														
MMC					MMC									
Sítios CpG da região DMRH19 (%)					Sítios Cpg da região KvDMR (%)									
Controles	1	2	3	4	$\bar{X}_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{X}_1$
SC2	51	59	63	55	57	49	53	49	42	49	48	52	59	50
SC3	59	61	63	65	62	55	58	53	46	53	53	57	65	55
SC4	58	61	62	61	61	52	55	50	43	51	49	54	61	52
SC5	58	61	63	63	61	51	56	48	43	48	49	54	61	51
SC7	55	57	65	75	63	53	57	51	47	53	52	57	60	54
SC8	56	61	67	74	65	58	61	56	50	57	57	63	66	59
$\bar{X}_2$	56	60	64	66	61	53	57	51	45	52	51	56	62	53
$\pm$ s.d.*														
(%)	2,9	1,7	1,8	7,7		3,2	2,7	2,9	3,1	3,3	3,4	3,9	2,8	

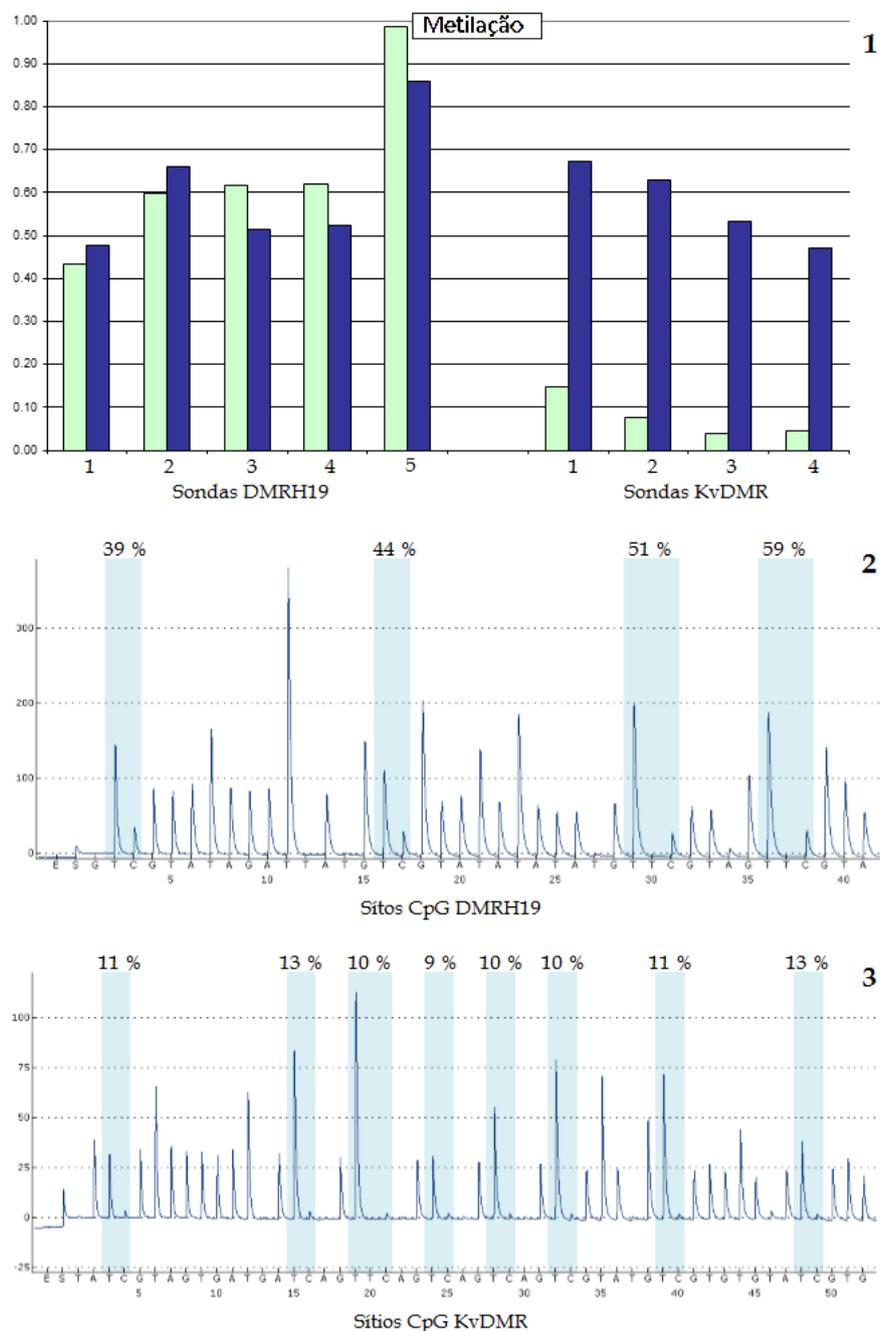
Para determinar o estado de metilação dos pacientes, para cada região, foi estimada uma média de metilação normal nos controles a partir do somatório de todos os valores de MMC (média de metilação dos controles) dividido pelo número total de controles ( $n = 6$ ). Para cada região, foi estimada uma média geral, a partir do somatório de todos os valores de MMR e de MMC divididos pelo N total de indivíduos analisados ( $n = 16$ ), estimando-se também o s.d. dessas médias. O desvio padrão da região DMRH19 foi de  $\pm 15$  e de  $\pm 12,2$  para KvDMR. Esses valores foram aplicados às médias de metilação normal dos controles em cada região (61% para DMRH19 e 53% para KvDMR), respectivamente, determinando os limites de normalidade. Os valores das médias de metilação por região, em cada paciente, foram comparados aos valores de normalidade para definir se a região se encontrava hipo ou hipermetilada. Os desvios padrão foram maiores no pirosequenciamento que no MS-MLPA, provavelmente, devido à maior sensibilidade do primeiro.

As principais alterações encontradas, comparando as duas técnicas, são mostradas a seguir (figuras de 10 a 14). A figura 10 ilustra os resultados encontrados no paciente LH4, que mostrou metilação normal para as regiões DMRH19 e KvDMR (padrão I). Os resultados do MS-MLPA e pirosequenciamento deste paciente foram coincidentes. O mesmo foi observado nos pacientes LH1, LH3, LH7 e LH14.



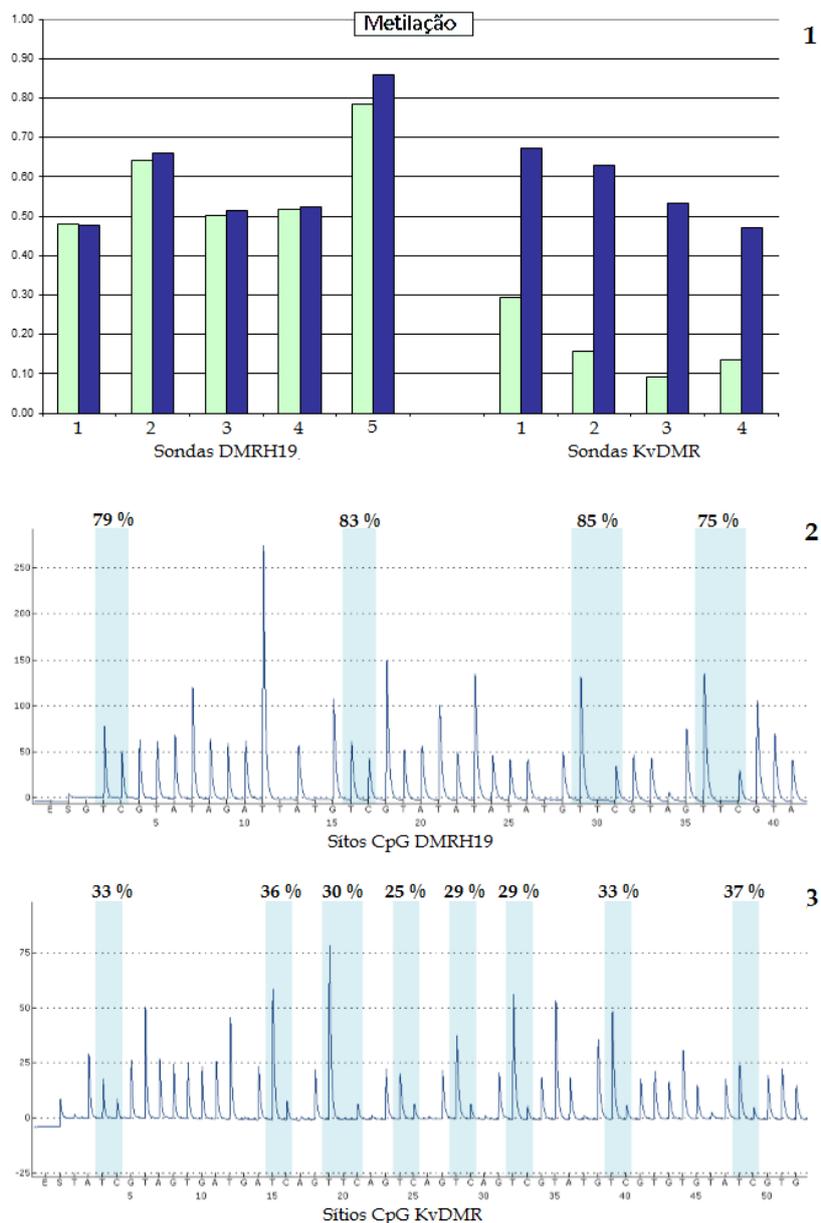
**Figura 10:** (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH4 mostrando metilação normal de DMRH19 ( $MMR = 56\%$ ) e KvDMR ( $MMR = 44\%$ ). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a percentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH4, que mostra metilação normal de DMRH19 ( $MMR = 48\%$ ). (3) Pirograma do paciente LH4, que mostra metilação normal de KvDMR ( $MMR = 51\%$ ).

A figura 11 ilustra o resultado obtido do paciente LH8, que mostrou um padrão de metilação normal para DMRH19 e hipometilação de KvDMR. Os resultados das duas técnicas foram coincidentes para este paciente que somente apresentou este padrão de metilação (padrão II).



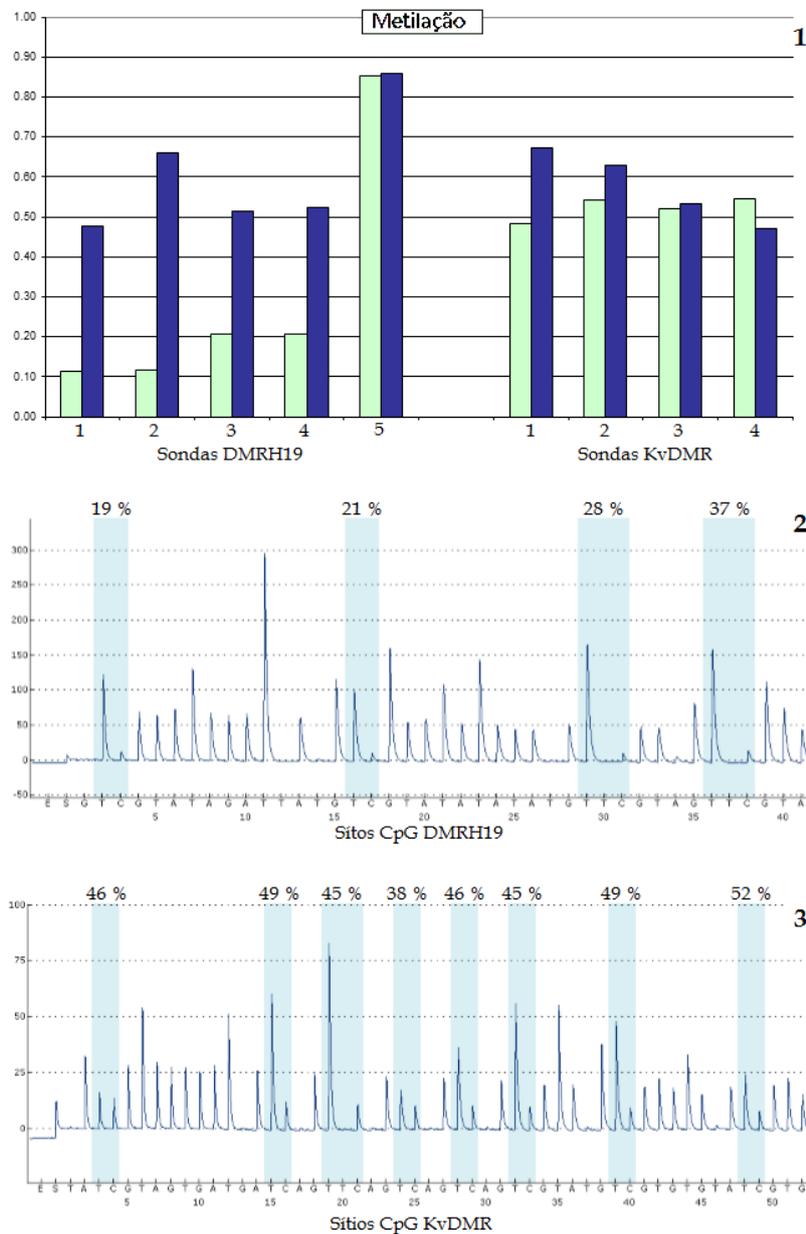
**Figura 11:** Gráfico de MS-MLPA do paciente LH8 mostra metilação normal de DMRH19 (**MMR** = 62%) e hipometilação de KvDMR (**MMR** = 7%). As colunas verdes indicam porcentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a porcentagem de metilação nos controles. **(2)** Pirograma do paciente LH8, que mostra metilação normal de DMRH19 (**MMR** = 48%). **(3)** Pirograma do paciente LH8, que mostra hipometilação de KvDMR (**MMR** = 11%).

O padrão de metilação do paciente LH2 foi o padrão V, com hipermetilação de DMRH19 e hipometilação de KvDMR. No paciente LH2 (figura 12) o resultado do MS-MLPA divergiu do pirosequenciamento no padrão de metilação de DMRH19. A primeira técnica mostrou metilação normal e no pirosequenciamento, a mesma região encontrou-se hipermetilada. Possivelmente, esta diferença se deve a um desempenho inadequado de uma das técnicas.



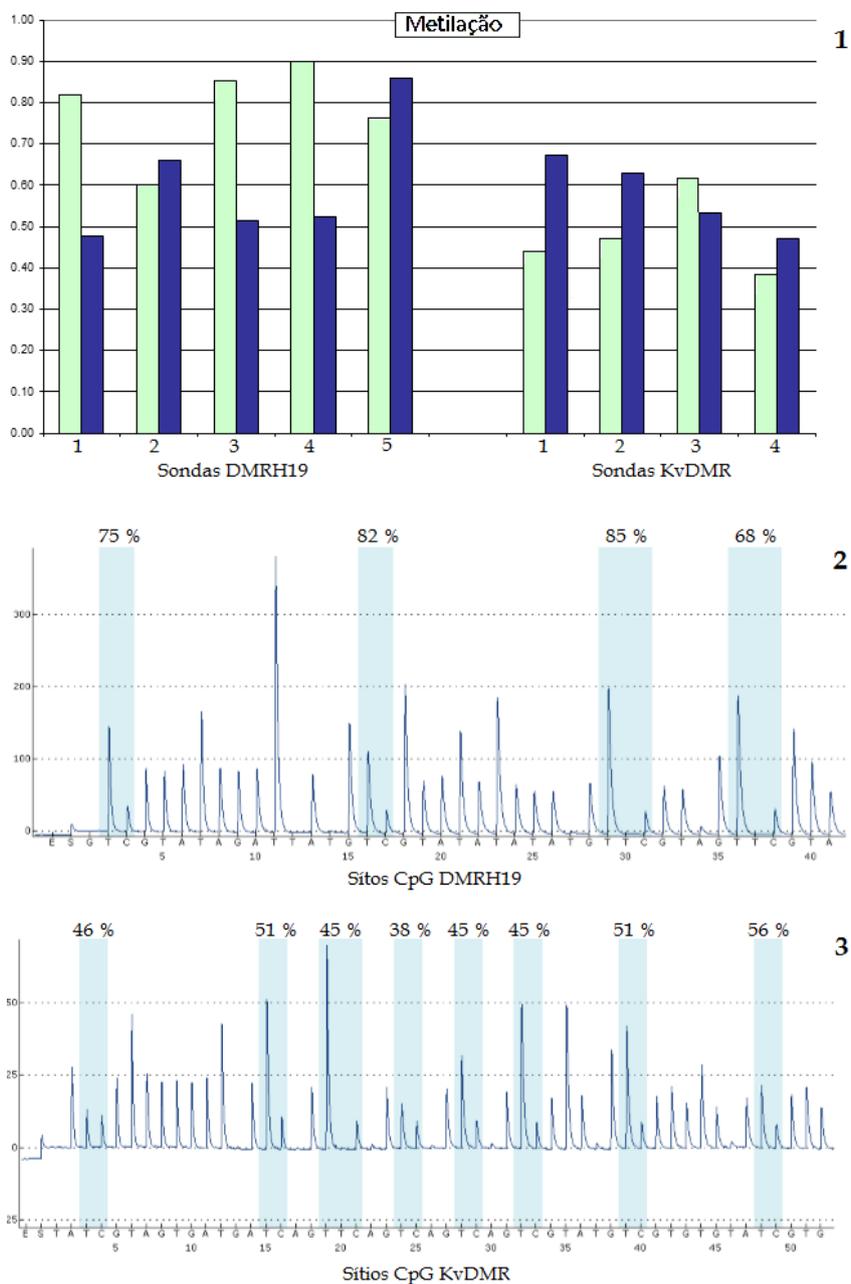
**Figura 12:** Gráfico de MS-MLPA do paciente LH2 mostrando metilação normal de DMRH19 ( $MMR = 45\%$ ) e hipometilação de KvDMR ( $MMR = 14\%$ ). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a percentagem de metilação nos controles. **(2)** Pirograma do paciente LH2, mostrando hipermetilação de DMRH19 ( $MMR = 81\%$ ). **(3)** Pirograma do paciente LH2, mostrando hipometilação de KvDMR ( $MMR = 32\%$ ).

A figura 13 mostra o resultado encontrado em LH9, que apresentou hipometilação de DRMH19 e metilação normal de KvDMR tanto no MS-MLPA quanto no pirosequenciamento. O paciente LH3 apresentou este mesmo padrão (III) de metilação com ambas as técnicas.



**Figura 13:** (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH9 apresentando hipometilação DMRH19 (MMR = 25%) e metilação normal de KvDMR (MMR = 49%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a percentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH9, mostrando hipometilação de DMRH19 (MMR = 26%). (3) Pirograma do paciente LH9, mostrando metilação normal de KvDMR (MMR = 46%).

O paciente LH12 (figura 14) foi o único a apresentar hipermetilação isolada de DMRH19 com metilação normal de KvDMR (padrão IV). Os resultados de MS-MLPA foram confirmados pelo pirosequenciamento.



**Figura 14:** (1) Gráfico de MS-MLPA do paciente LH12 apresentando hipermetilação de DMRH19 (MMR = 79%) e metilação normal de KvDMR (MMR = 48%). As colunas verdes indicam percentagem de metilação no paciente e as colunas azuis indicam a percentagem de metilação nos controles. (2) Pirograma do paciente LH12, mostrando hipermetilação de DMRH19 (MMR = 78%). (3) Pirograma do paciente LH12, mostrando metilação normal de KvDMR (MMR = 47%).

## 5. DISCUSSÃO

A técnica de MLPA tem sido amplamente utilizada para detectar perdas alélicas ou pequenas deleções difíceis de serem detectadas por sequenciamento tradicional, sendo sua utilização para a detecção de metilação mais recente (NYGREN *et al.*, 2005; SCHOUTEN *et al.*, 2002). Na rotina, esta técnica tem sido usada por poucos grupos, como o INGEMM, do Hospital Universitario La Paz (Madrid, Espanha) (ROMANELLI *et al.*, 2011). A partir dos achados do presente trabalho, pode-se propor que esta técnica seja também adotada na rotina do Programa de Aconselhamento Genético do INCA, para o rastreamento de alterações epigenéticas em 11p15.5, nos pacientes portadores de síndromes que predisponham o desenvolvimento de TW ou matriculados por apresentarem outros tipos de tumor associado às síndromes macrossômicas.

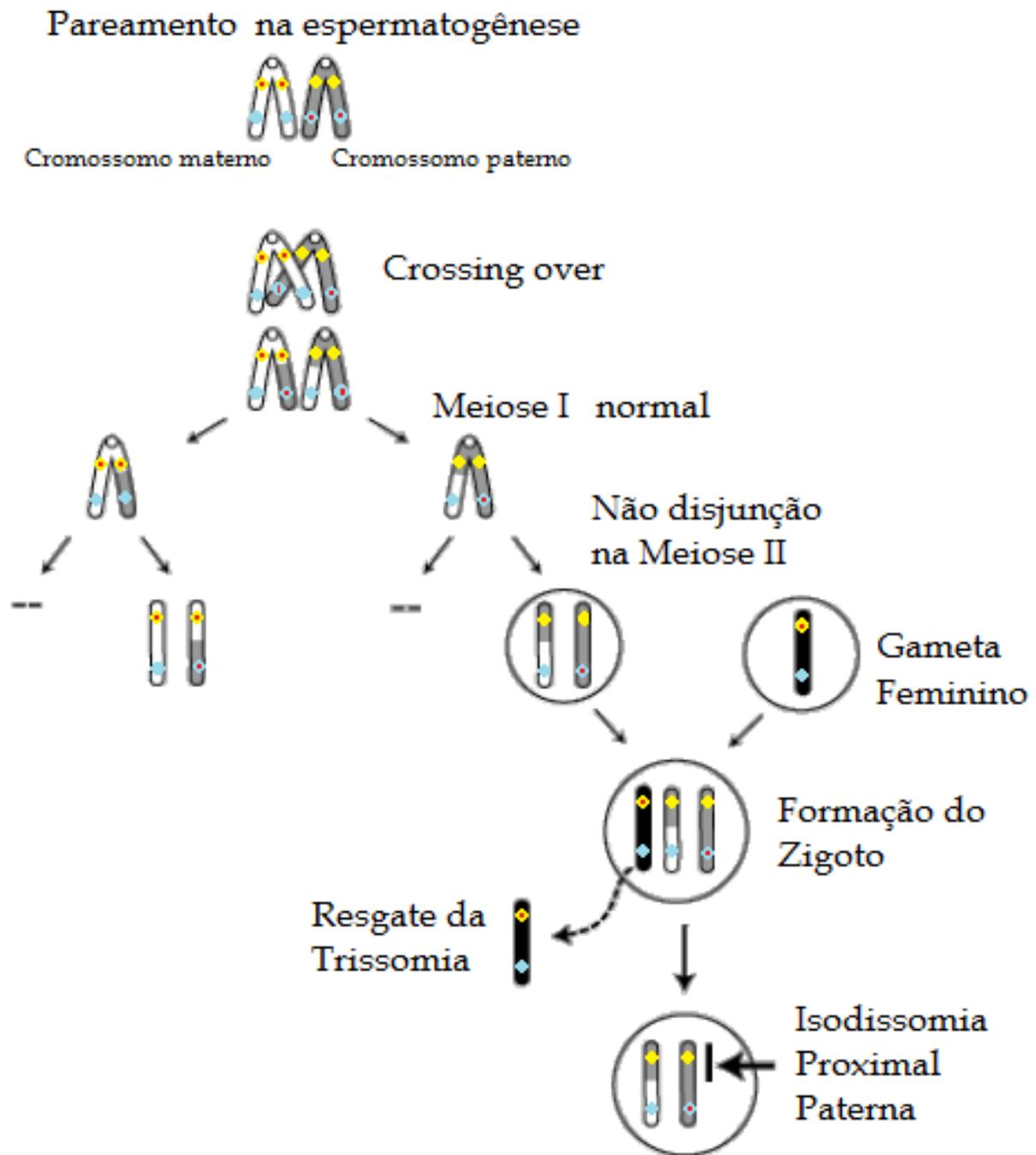
Os resultados mostram que a técnica de MS-MLPA é eficiente no rastreamento de alterações nos padrões de metilação das regiões DMRH19 e KvDMR, uma vez que estes foram majoritariamente confirmados pelo pirosequenciamento. A única exceção ocorreu na avaliação da DMRH19 no paciente LH2, onde o MS-MLPA mostrou a região com metilação normal, enquanto que o pirosequenciamento mostrou esta região hipermetilada. Tal discordância pode se dever a um artefato na técnica de MS-MLPA (sinal menor no momento de leitura da sonda) ou a diferenças de localização da sonda de MS-MLPA em relação aos iniciadores utilizados no pirosequenciamento, pois essas diferenças de localização podem gerar uma variação na cobertura de sítios CpG avaliados. No entanto, o paciente LH2 é portador de SWB, o que sugere a presença de hipermetilação na região de DMRH19, de acordo com os resultados de pirosequenciamento. Além disso, a robustez de ambas as técnicas também se confirmam a partir da homogeneidade dos valores de metilação encontrados para as sondas de MS-MLPA e para os sítios CpG quantificados pelo pirosequenciamento, tanto na avaliação destes por região (DMRH19 e KvDMR), quanto na avaliação individual de cada sonda e cada sítio CpG dentro do número amostral total, incluindo casos e controles, confirmados pelos baixos valores de s.d. encontrados em nossos cálculos.

Entre os pacientes avaliados neste estudo, cinco (50%) mostraram padrões normais de metilação de DMRH19 e KvDMR com dosagem alélica normal, sendo as 5 do sexo feminino e todas apresentando fenótipos macrossômicos, exceto a paciente LH1, que, além de macrossomia, apresenta trações de HHI. Estes achados sugerem que a relação entre as síndromes macrossômicas e alterações epigenéticas nas regiões estudadas é fraca,

confirmando a falta de dados sobre essa relação na literatura. Usualmente, macrosomias acompanham outras síndromes ou aparecem associadas à SBW (SMITH *et al.*, 2007).

O paciente LH8 apresentou padrão normal de metilação de DMRH19 e hipometilação de KvDMR, com dosagem alélica normal. A causa desta condição pode se explicar devido a um erro no estabelecimento da metilação dessa região ou a uma isodissomia uniparental proximal paterna resultante de uma não disjunção na segunda divisão meiótica (figura 15), sem reprogramação epigenética. Em um estudo do nosso grupo, foram encontrados dois pacientes com TW apresentando, constitutivamente, hipermetilação isolada de DMRH19 associada ao fenótipo SBW. Além disso, essa mesma alteração foi encontrada em amostras tumorais de 16 de 34 pacientes avaliados (CARDOSO *et al.*, 2012).

## Mecanismo para isodissomia proximal paterna



■ KvDMR não metilada  
 ■ DMRH19 não metilada

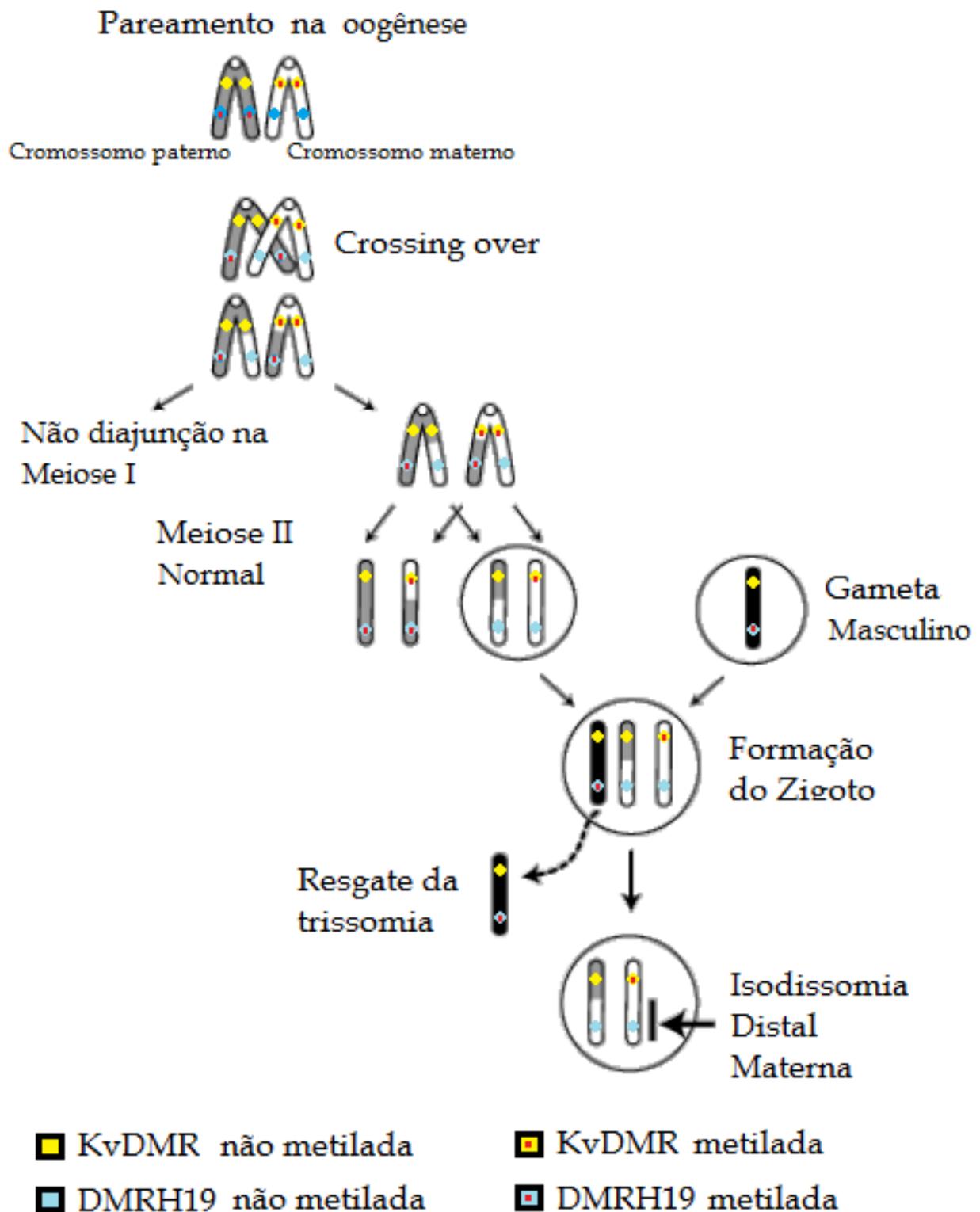
■ KvDMR metilada  
 ■ DMRH19 metilada

**Figura 15:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental proximal paterna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]).

O paciente LH2 apresentou hipermetilação de DMRH19 e hipometilação de KvDMR, com dosagem alélica normal e possui fenótipo SBW. A causa desta condição deve-se, provavelmente, a uma UPD paterna, que decorreu de uma duplicação do cromossomo 11 paterno no zigoto concomitante com uma deleção completa do cromossomo 11 materno. Esse paciente representa 10% dos casos analisados. Ainda em nosso estudo, o grupo encontrou 12 dos 34 casos de pacientes com TW, uma UPD paterna, sendo um deles associado ao fenótipo SBW (CARDOSO *et al.*, 2012).

Os pacientes LH9 e LH13 apresentaram hipometilação de DMRH19 e metilação normal de KvDMR, com dosagem alélica normal e possuem fenótipo SSR. Barthold e cols. (2009), encontraram em uma coorte de 201 pacientes com SSR, uma porcentagem de 40% destes apresentando perda de metilação em DMRH19, sendo esse tipo de alteração associada à um fenótipo mais severo da doença. A causa desta condição deve-se, provavelmente a um erro no estabelecimento de metilação em DMRH19, ou uma isodissomia uniparental distal materna resultante de não disjunção na primeira divisão meiótica (figura 16) sem reprogramação epigenética.

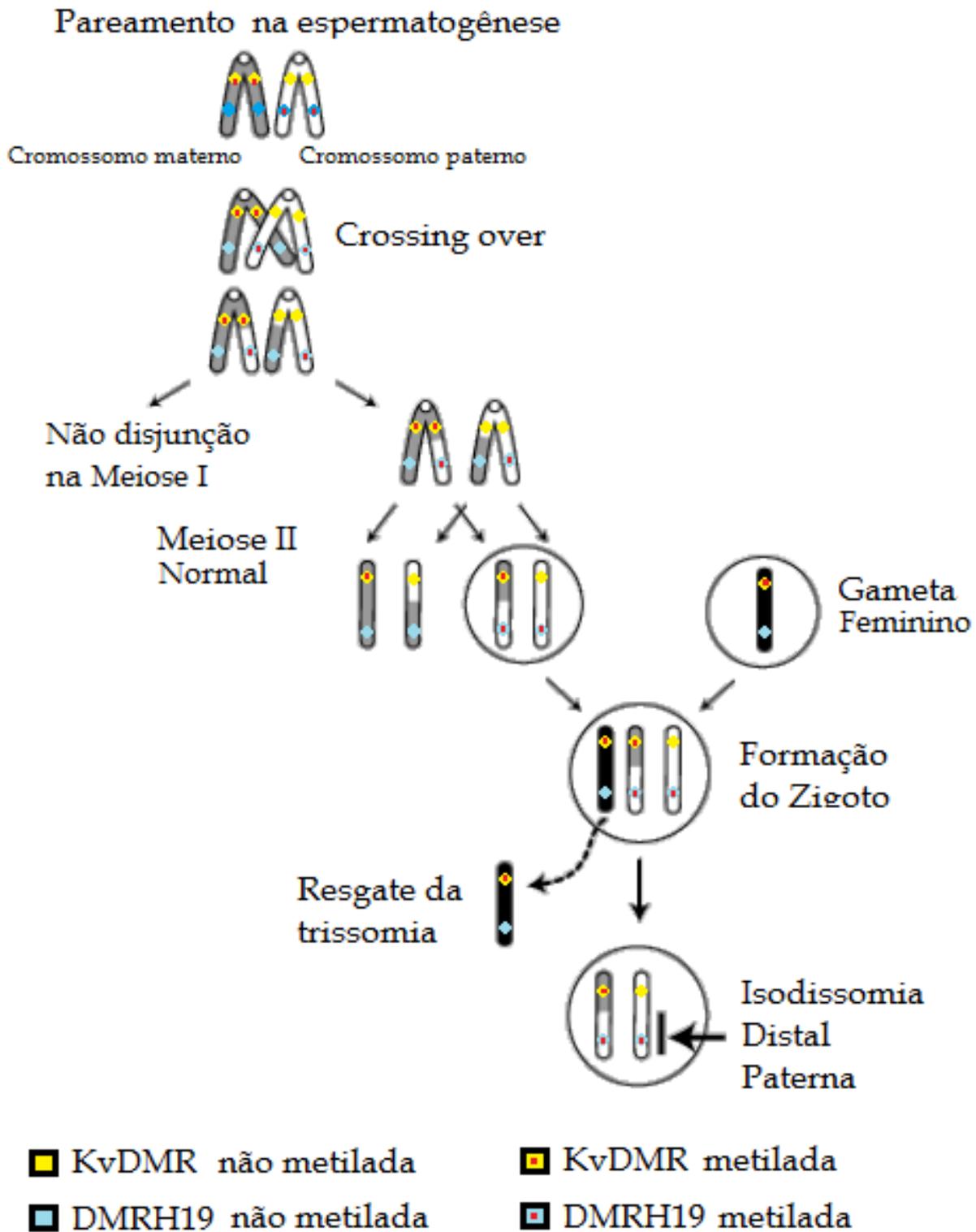
## Mecanismo para isodissomia distal materna



**Figura 16:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental distal materna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]).

O paciente LH12 apresentou hipermetilação de DMRH19 e metilação normal de KvDMR, com dosagem alélica normal. A causa desta condição deve-se, provavelmente a incremento de metilação em DMRH19, ou isodissomia unipareta distal paterna resultante de não disjunção na primeira divisão meiótica (figura 17), sem reprogramação epigenética. Cerca de 10% dos casos de SBW tem etiologia desconhecida e aproximadamente 7% dos casos são devido à hipermetilação isolada de DMRH19 (GOMES *et al.*, 2005; WEKSBERG *et al.*, 2005).

## Mecanismo para isodissomia distal paterna



**Figura 17:** Ilustração de uma Isodissomia uniparental distal paterna. Adaptado (Fonte: [http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental\\_disomy.html](http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/Uniparental_disomy.html)[12/03/2013 16:55:40]).

A dissomia uniparental consiste na herança de dois cromossomos do mesmo progenitor, que pode ocorrer de duas formas diferentes: heterodissomia uniparental, quando existe presença de dois cromossomos homólogos de um mesmo progenitor e isodissomia uniparental, quando existe presença de dois cromossomos idênticos de um mesmo progenitor. A isodissomia uniparental é comum em síndromes como a de Prader-Willi, onde 29% dos pacientes apresentam dissomia uniparental materna do cromossomo 15, e a síndrome de Angelman, onde 2% dos casos apresentam UPD paterna também do cromossomo 15 (HORSTHEMKE E WAGSTAFF, 2008).

O presente trabalho difere da literatura na distribuição das alterações, porém isso pode se dever ao pequeno número amostral ou a diferença entre populações avaliadas, uma vez que não existem muito poucos estudos sobre alterações epigenéticas em pacientes sindrômicos ou com SBW no Brasil. As contribuições deste trabalho para a pesquisa se encerram no estabelecimento da técnica de MS-MLPA, que é robusta e sensivelmente mais barata do que o pirosequenciamento, para o diagnóstico na rotina do aconselhamento genético do INCA, e na importância de mais grupos estarem avaliando o impacto de alterações epigenéticas na etiologia de diversos tumores.

## 6. CONCLUSÕES

- A técnica de MS-MLPA se mostrou eficiente na detecção de alterações epigenéticas nos CRIs DMRH19 e KvDMR, tendo quase que 100% de seus resultados sido confirmados por pirosequenciamento, que é a técnica padrão ouro para avaliar este tipo de alteração.
- Entre nossos pacientes, 50% apresentaram padrões de metilação normal para ambas as regiões e destes, todos eram do sexo feminino e apresentavam Macrosomias.
- Um paciente apresentou uma UPD, representando 10% dos casos e um apresentou hipermetilação isolada de DMRH19, também representando 10% dos casos.
- Os dois pacientes do aconselhamento genético que não pertenciam à casuística deste estudo e apresentavam SSR, apresentaram, como esperado, hipometilação de DMRH19.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTHOLDI, D. et al. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 3, p. 192-7, mar. 2009.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 16, p. 2395-402, out. 2000.
- BHAUMIK, S. R.; SMITH, E.; SHILATIFARD, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 11, p. 1008-16, nov. 2007.
- BJORNSSON, H. T. et al. Epigenetic specificity of loss of imprinting of the IGF2 gene in Wilms tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 16, p. 1270-3, 15 ago. 2007.
- BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5551, p. 2536-9, 21 dez. 2001.
- BUCKBERRY, S. et al. Quantitative Allele-Specific Expression and DNA Methylation Analysis of H19, IGF2 and IGF2R in the Human Placenta across Gestation Reveals H19 Imprinting Plasticity. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e51210, 2012.
- CAI, X.; CULLEN, B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. **RNA**, v. 13, n. 3, p. 313-316, 2007.
- CARDOSO, L. C. A. et al. Constitutional and somatic methylation status of DMRH19 and KvDMR in Wilms tumor patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 714-724, 2012.
- CHAO, W.; D'AMORE, P. A. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111-120, 2009.
- DAVIDOFF, A. M. WILMS TUMOR. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, n. 3, p. 357-364, 2010.
- DELAVAL, K. et al. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. **The EMBO journal**, v. 26, n. 3, p. 720-9, 7 fev. 2007.
- DENIS, H.; NDLOVU, M. N.; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION reports**, v. 12, n. 7, p. 647-656, 2011.
- DEVEALE, B.; KOOY, D. VAN DER; BABAK, T. Critical Evaluation of Imprinted Gene Expression by RNA – Seq : A New Perspective. **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002600, 2012.

DONG, A et al. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 2, p. 439-48, 15 jan. 2001.

EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of autosomal mammalian genes. **Current opinion in genetics & development**, v. 4, p. 265-280, 1994.

ENGLAND, R.; PETTERSSON, M. Pyro Q-CpG<sup>TM</sup>: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. **Nature Methods**, n. September, p. i-ii, 2005.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286-98, abr. 2007.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148-59, 13 mar. 2008.

ESTELLER, M. Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next? **Genes & Cancer**, v. 2, n. 6, p. 604-606, 2011.

FALLS, J. G. et al. Genomic imprinting: implications for human disease. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 3, p. 635-47, mar. 1999.

FITZPATRICK, G. V; SOLOWAY, P. D.; HIGGINS, M. J. Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. **Nature genetics**, v. 32, n. 3, p. 426-31, nov. 2002.

GABORY, A et al. The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA. **Cytogenetic and genome research**, v. 113, n. 1-4, p. 188-93, jan. 2006.

GARZON, R. et al. MicroRNA expression and function in cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 12, n. 12, p. 580-7, dez. 2006.

GOMES, M. V et al. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 471-477, 2009.

GOMES, M. V; AVELINO, S.; RAMOS, E. S. H19DMR methylation analysis in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome and isolated hemihyperplasia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 210-213, 2005.

HAKE, S. B.; XIAO, A.; ALLIS, C. D. Linking the epigenetic "language" of covalent histone modifications to cancer. **British journal of cancer**, v. 90, n. 4, p. 761-769, 23 fev. 2004.

HALL, J. G. Genomic Imprinting : Review and Relevance to Human ; Diseases. **American journal of human genetics**, v. 46, n. 1, p. 857-873, 1990.

HAYATSU, H. Review Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil , the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 84, n. 8, p. 2-11, 2008.

HORIKE, S. et al. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith – Wiedemann syndrome. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 14, p. 2075-2084, 2000.

HORSTHEMKE, B.; WAGSTAFF, J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 146A, n. 16, p. 2041-52, 15 ago. 2008.

HOWELL, C. Y. et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 829-38, 23 mar. 2001.

HURST, L. D.; MCVEAN, G.; MOORE, T. Imprinted genes have few and small introns. **Nature**, v. 12, p. 234-237, 1996.

IDERAABDULLAH, F. Y.; VIGNEAU, S.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. **Mutation research**, v. 647, n. 1-2, p. 77-85, 1 dez. 2008.

IORIO, M. V; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO molecular medicine**, v. 4, n. 3, p. 143-59, mar. 2012a.

IORIO, M. V; CROCE, C. M. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 6, p. 1126-33, jun. 2012b.

JONES, P. A; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-92, 23 fev. 2007.

KANDURI, C. Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 22, n. 4, p. 343-50, jun. 2011.

KELSEY, G.; BARTOLOMEI, M. S. Imprinted Genes ... and the Number Is ? **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. 3-4, 2012.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, 13 out. 2004.

LOPEZ, J. et al. The context and potential of epigenetics in oncology. **British journal of cancer**, v. 100, n. 4, p. 571-7, 24 fev. 2009.

LUONG, L. D. **Basic Principles of Genetics**. [S.l: s.n.].

MANCINI-DINARDO, D. A differentially methylated region within the gene Kcnq1 functions as an imprinted promoter and silencer. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 3, p. 283-294, 1 fev. 2003.

MARTIN, R. A et al. LIT1 and H19 methylation defects in isolated hemihyperplasia. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 134A, n. 2, p. 129-31, 15 abr. 2005.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MURRELL, A. et al. Distinct methylation changes at the IGF2-H19 locus in congenital growth disorders and cancer. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1849, jan. 2008.

NEUMANN, B.; KUBICKA, P.; BARLOW, D. P. Characteristics of imprinted genes. **Nature genetics**, v. 9, n. 1, p. 12-13, 1995.

NIEMITZ, E. L. et al. Children with idiopathic hemihypertrophy and beckwith-wiedemann syndrome have different constitutional epigenotypes associated with wilms tumor. **American journal of human genetics**, v. 77, n. 5, p. 887-91, nov. 2005.

NYGREN, A. O. H. et al. Methylation-Specific MLPA ( MS-MLPA ): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 14, p. 1-9, 2005.

OHLSSON, R. et al. Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n. 2, p. 361-8, fev. 1994.

**Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM.** Disponível em:  
<<http://omim.org/entry/130650#reference155>>. Acesso em: 23 fev. 2013.

PAULER, F. M.; BARLOW, D. P. Imprinting mechanisms--it only takes two. **Genes & development**, v. 20, n. 10, p. 1203-6, 15 maio. 2006.

REINHART, B.; ELJANNE, M.; CHAILLET, J. R. Shared Role for Differentially Methylated Domains of Imprinted Genes. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 2089-2098, 2002.

ROMANELLI, V. et al. Beckwith Wiedemann syndrome and Uniparental Disomy 11p: Fine mapping of the recombination breakpoints and evaluation of several techniques. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 19, n. 416-421, 2011.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, v. 11, p. 3-11, 2001.

SADIKOVIC, B. et al. Genome-wide H3K9 Histone Acetylation Profiles Are Altered in Benzopyrene-treated MCF7 Breast Cancer Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 7, p. 4051-4060, 2008.

SATOH, Y. et al. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. **British journal of cancer**, v. 95, n. 4, p. 541-7, 21 ago. 2006.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. 1-13, 2002.

SCOTT, R. H. et al. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 9, p. 705-15, set. 2006.

SCOTT, R. H.; DOUGLAS, J.; BASKCOMB, L.; NYGREN, A O. et al. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. **Journal of medical genetics**, v. 45, n. 2, p. 106-13, fev. 2008.

SCOTT, R. H.; DOUGLAS, J.; BASKCOMB, L.; HUXTER, N. et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. **Nature genetics**, v. 40, n. 11, p. 1329-34, nov. 2008.

SHA, K. A mechanistic view of genomic imprinting. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 9, p. 197-216, jan. 2008.

SMITH, A. C. et al. Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. **Pediatric research**, v. 61, n. 5 Pt 2, p. 43R-47R, maio. 2007.

SOLTER, D. Imprinting today: end of the beginning or beginning of the end? **Cytogenetic and genome research**, v. 113, n. 1-4, p. 12-6, jan. 2006.

STECK, E. et al. Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic in vitro conditions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, p. 1185-1195, 2012.

SUN, F. et al. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith – Wiedemann syndrome. **Nature**, v. 389, n. October, p. 809-815, 1997.

SZABO, P. E. et al. Role of CTCF Binding Sites in the Igf2 / H19 Imprinting Control Region †. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 11, p. 4791-4800, 2004.

TRASLER, J. M. et al. DNA methyltransferase in normal and Dnmtn/Dnmtn mouse embryos. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 206, n. 3, p. 239-247, jul. 1996.

WEKSBERG, R. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 1, p. R61-R68, 2 abr. 2003.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; BECKWITH, J. B. Beckwith-Wiedemann syndrome. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 18, n. 1, p. 8-14, jan. 2010.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; SMITH, A. C. Beckwith-Wiedemann syndrome. **American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics**, v. 137C, n. 1, p. 12-23, 15 ago. 2005.

ANEXO I



A(o): Dr. Fernando Regla Vargas  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 87/08** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**Título do Estudo:** Correlação de Alterações Genéticas Somáticas e Constitutivas com Achados Clínicos e Histopatológicos em Indivíduos com Tumor de Wilms

Prezado Pesquisador,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise, o estudo intitulado: **Correlação de Alterações Genéticas Somáticas e Constitutivas com Achados Clínicos e Histopatológicos em Indivíduos com Tumor de Wilms** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os responsáveis pelos pacientes (versão 2)**, **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o uso de imagem para os pacientes (versão 2)**, **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o uso de imagem para os adolescentes (versão 2)** e **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os adolescentes (versão 2)**, em 26 de janeiro de 2009.

**Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo. As datas previstas são: julho/2009 e janeiro/2010.**

A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/c – Dra. Marisa M<sup>a</sup> Breitenbach – Coordenadora de Pesquisa/CPQ

## ANEXO II



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de Pesquisa:** Correlação de Alterações Genéticas, Somáticas e Constitutivas, com Achados Clínicos e Histopatológicos em Indivíduos com Tumor de Wilms.

**Pesquisador Responsável:** Fernando Regla Vargas

**Colaborador Responsável:** Hanna Soares Pereira

**Instituição Responsável pela Pesquisa:** Instituto Nacional de Câncer

**Endereço:** Rua André Cavalcanti, 37, 4º andar – Centro. 20231-050 – Rio de Janeiro – RJ.

**Telefone:** (021) 3207-6594

**Nome do paciente:**

**Prontuário:** \_\_\_\_\_; **Identificação no estudo:** \_\_\_\_\_

Eu, Fernando Regla Vargas, venho pedir que voluntariamente permita a participação da pessoa pela a qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável na pesquisa intitulada “Correlação de Alterações Genéticas, Somáticas e Constitutivas, com Achados Clínicos e Histopatológicos em Indivíduos com Tumor de Wilms”.

Leia com atenção as informações abaixo antes de concordar.

1 - Esta pesquisa tem como objetivo o estudo molecular da criança pela qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável, portador de tumor de Wilms com a finalidade de detectar possíveis alterações cromossômicas e gênicas, associados ao desenvolvimento da doença.

2 – A criança pela qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável será acompanhado, no Serviço de Pediatria, como já vem acontecendo, sendo que este acompanhamento será mantido mesmo após o término dessa pesquisa.

**3 - Para a realização da pesquisa genética será necessária a coleta de 5ml de sangue da criança pela qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável, utilizando-se material estéril e descartável próprio para este fim.**

**4 – Será necessária autorização para utilização dos dados constantes no prontuário hospitalar do paciente.**

**5 – Será necessária a coleta de uma amostra proveniente do tecido tumoral caso a criança pela qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável ainda não tenha passado pela cirurgia. É importante salientar que: 1) a coleta desta amostra não implicará em nova punção ou procedimento, sendo a mesma retirada no momento da cirurgia do tumor da criança pela qual o (a) Sr.º (Sr.ª) é responsável, 2) a quantidade de amostra tumoral a ser retirada para este estudo genético é bem pequena, e NÃO impedirá a realização dos estudos posteriores que são fundamentais para a definição histopatológica do tumor. Da amostra coletada serão extraídas as células tumorais para o estudo em questão. A análise dos materiais será realizada na Divisão de Genética - INCA e os dados serão usados apenas para os fins dessa pesquisa.**

**6 – Será realizada uma consulta de aconselhamento genético, na qual serão discutidos com os responsáveis os principais achados da avaliação e seu impacto potencial no aconselhamento genético.**

**7 – O (a) senhor (a) poderá optar por retirar sua autorização para participação do menor nesse estudo no momento que desejar, assim como pedir qualquer tipo de informação que julgar necessária durante e após a realização da pesquisa. Importante salientar que mesmo com a retirada da criança do estudo, lhe será garantido o acompanhamento médico oferecido pelo Instituto Nacional de Câncer.**

**8 – A identidade da criança será mantida em segredo (sigilo), e as amostras coletadas serão identificadas por código numérico específico.**

**9 – Há a possibilidade de exames laboratoriais, que não são efetuados no Brasil, serem feitos no exterior para aprimorar o estudo em questão. Para isso as amostras de DNA, resultantes do processamento do material coletado, poderão ser enviadas, por correio ou via o colaborador responsável, Hanna Soares Pereira, com os cuidados ideais de armazenamento e envio, permanecendo sempre em segredo (sigilo) a identidade da**

**criança. As amostras NÃO ficaram armazenadas na Instituição estrangeira em hipótese alguma. Após as análises feitas no exterior, elas serão enviadas de volta ao país de origem, para a Divisão de Genética do INCA, via correio ou pelo colaborador responsável.**

10 - Os resultados do estudo serão apresentados em um ou mais artigos a serem publicados em revistas científicas (nacionais e internacionais), e divulgados em congressos, simpósios, reuniões científicas, conferências, mesas redondas (nacionais e internacionais) dentre outros meios de divulgação, mantendo-se o sigilo de identidade.

Quaisquer dúvidas podem ser esclarecidas através do telefone (21) 3207-6594, Divisão de Genética, Instituto Nacional de Câncer.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado (a), autorizo voluntariamente a participação da criança pela qual sou responsável nessa pesquisa. Declaro que li e entendi todas as informações referentes a ela e que todas as minhas perguntas foram claramente respondidas.

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável

\_\_\_\_\_  
**Assinatura e RG** do responsável

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data